VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences

Journal homepage: https://js.vnu.edu.vn/MPS

Original Article

Development of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Cryptochlorogenic Acid, Rutin, Isoquercitrin in Leaves of *Morus alba*

Nguyen Thi Minh Diep[1], Kieu Thi Thu Huong[1], Ha Thanh Hoa[1], Tran Thi Van Anh[1], Nguyen Thanh Hai[2], Phi Thi Mai Huong[1], Nguyen Van Thang[3], Pham Quoc Tuan[1,*]

[1]*Phu Tho College of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong, Viet Tri, Phu Tho, Vietnam*

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

[3]*Tan Trao University, Trung Mon 16, Minh Xuan, Tuyen Quang, Vietnam*

Received 18th June 2025
Revised 24th July 2025; Accepted 25th September 2025

Abstract: An HPLC-DAD method was developed for the simultaneous quantification of four main substances in leaves of *Morus alba*: chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, and isoquercitrin. The method was executed on a Phenomenex C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm) with a mobile phase solvent system of acetonitrile and 0.1% formic acid in water, eluted according to a gradient program. The flow rate was maintained at 0.85 mL/min, with an injection volume of 10 µL. Detection wavelengths were set at 324 nm for chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and 353 nm for rutin, isoquercitrin. This analytical method was validated and met the requirements according to the ICH guidelines on specificity, system suitability, linearity range, precision, and accuracy. The established method was applied to determine the content of eight leaf samples of *Morus alba* collected from Phu Tho, Hanoi. The results indicated that the average content of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, and isoquercitrin in these samples was respectively 11.96 - 12.72, 1.81 - 2.63, 1.66 - 1.81, 6.09 - 6.29 mg/g based on dry leaf weight.

Keywords: Chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, isoquercitrin, HPLC, *Morus alba* leaves.

* Corresponding author.
E-mail address: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4800

Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid cryptochlorogenic, rutin, isoquercitrin trong lá dâu tằm bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Minh Diệp[1], Kiều Thị Thu Hường[1], Hà Thanh Hòa[1], Trần Thị Vân Anh[1], Nguyễn Thanh Hải[2], Phí Thị Mai Hương[1], Nguyễn Văn Thắng[3], Phạm Quốc Tuấn[1,*]

[1]*Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ, 2201 Hùng Vương, Việt Trì, Phú Thọ, Việt Nam*

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

[3]*Trường Đại học Tân Trào, Trung Môn 16, Minh Xuân, Tuyên Quang, Việt Nam*

Nhận ngày 18 tháng 6 năm 2025
Chỉnh sửa ngày 24 tháng 7 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 9 năm 2025

Tóm tắt: Phương pháp định lượng đồng thời 4 chất chính trong lá cây dâu tằm (*Morus alba*) gồm acid chlorogenic, acid cryptochlorogenic, rutin, isoquercitrin bằng phương pháp HPLC-DAD được xây dựng. Phương pháp được thực hiện trên cột Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm) với hệ dung môi pha động là acetonitril : acid formic trong nước 0,1% được rửa giải theo chương trình gradient. Tốc độ dòng duy trì ở 0,85 ml/min. Thể tích tiêm là 10 µl; bước sóng phát hiện được cài đặt ở 324 nm đối với acid chlorogenic, acid cryptochlorogenic và 353 nm đối với rutin, isoquercitrin. Phương pháp phân tích được thẩm định và đạt các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng. Áp dụng phương pháp đã xây dựng được để xác định hàm lượng 8 mẫu lá dâu tằm thu hái tại các tỉnh Phú Thọ, Hà Nội. Kết quả cho thấy hàm lượng trung bình các chất acid chlorogenic, acid cryptochlorogenic, rutin, isoquercitrin trong các mẫu lá dâu tằm lần lượt là 11,96 - 12,72, 1,81 - 2,63, 1,66 - 1,81, 6,09 - 6,29 mg/g tính theo khối lượng lá khô.

Từ khóa: acid chlorogenic, acid cryptochlorogenic, rutin, isoquercitrin, HPLC, lá dâu tằm.

1. Mở đầu*

Dâu tằm có tên khoa học là *Morus alba*, thuộc họ Dâu tằm (Moraceae). Là loài đặc hữu của Trung Quốc, nhưng hiện nay được trồng trọt khắp thế giới [1]. Ở Việt Nam, dâu tằm được trồng khắp nơi lấy lá nuôi tằm và dùng làm thuốc. Cây dâu tằm có nhiều bộ phận dùng làm thuốc như tang chi (cành non), tang diệp (lá), tang bạch bì (vỏ rễ), tang thầm (quả kép chín đỏ) [2].

Theo Y học cổ truyền, lá dâu tằm có vị cam, khổ, tính hàn, quy vào các kinh phế, can; có công năng sơ tán phong nhiệt, thanh can, minh mục; chủ trị: Cảm mạo phong nhiệt, phế nhiệt ho ráo, chóng mặt, nhức đầu hoa mắt, mắt sây sẩm, đau mắt đỏ [2].

Từ những công trình nghiên cứu về hóa học đã công bố cho thấy, lá dâu tằm chứa các nhóm chất chính là flavonoid (rutin, isoquercitrin, astragalin,…) [3], phenolic (dẫn xuất của các

* Tác giả liên hệ.
Địa chỉ email: phamquoctuan@duocphutho.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4800

acid caffeoyl quinic, acid coumaric,…) [4-5], coumarin [6], lignan [7], tinh dầu [8],… Cao chiết và các chất phân lập được từ dâu tằm sở hữu nhiều tác dụng sinh học hữu ích như chống viêm [9], độc với tế bào, chống ung thư [10], chống oxy hóa [11], chống đái tháo đường [12],... Hiện tại, chuyên luận lá dâu tằm trong Dược điển Việt Nam V chưa có chỉ tiêu định lượng các chất chính [2]. Tuy nhiên Dược điển Trung Quốc (ChP) 2020 có quy định hàm lượng rutin không dưới 0,1% trong lá dâu tằm khô [13], nhưng chất marker này không đặc hiệu, có chứa trong nhiều dược liệu. Để góp phần nâng cao chất lượng dược liệu lá dâu tằm và các chế phẩm bào chế từ dược liệu này, chúng tôi thực hiện nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời 4 chất chính, gồm 2 flavonoid (rutin, isoquercitrin) và 2 acid caffeoyl quinic (acid chlorogenic, acid cryptochlorogenic) trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD (HPLC-DAD).

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

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

08 mẫu nghiên cứu là lá bánh tẻ phơi sấy khô của cây Dâu tằm (*Morus alba*) thu hái tại tỉnh Phú Thọ (mới): 07 mẫu, gồm 05 mẫu tại tỉnh Phú Thọ (cũ) (số hiệu mẫu: DT.01 - DT.05), 02 mẫu thuộc tỉnh Vĩnh Phúc (cũ) và Hòa Bình (cũ) (DT.07 - DT.08); và 01 mẫu thu hái tại Hà Nội (DT.06).

Tất cả các mẫu thu hái vào tháng 5/2023 và được thẩm định tên khoa học chính xác là loài *Morus alba,* họ Dâu tằm (Moraceae) bởi TS. Trần Thị Ngọc Diệp - Phó trưởng khoa Nông - Lâm - Ngư, Trường Đại học Hùng Vương (Phú Thọ). Các mẫu lá dâu tằm rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 50-55 ^{o}C (độ ẩm <12%), xay mịn và được bảo quản trong 2 lần túi PE, tránh ánh sáng.

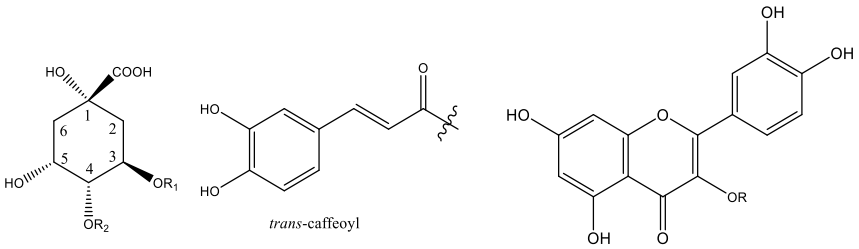
Mẫu DT.01 được sử dụng cho công việc xây dựng và thẩm định phương pháp.

2.1.2. Hóa chất, dung môi

Các dung môi, hóa chất sử dụng nghiên cứu gồm: acetonitril (MeCN), methanol (MeOH) được mua của hãng Merck KGaA (Đức), dùng cho HPLC; acid formic (≥ 88,0%) cung cấp bởi Xilong Scientific Co., Ltd. (Trung Quốc); nước cất hai lần (H_2O). Chất chuẩn: acid chlorogenic (**1**), acid cryptochlorogenic (**2**), isoquercitrin (**4**) do hãng ChemFaces – Trung Quốc, có độ tinh khiết lần lượt là 98,0%, 99,4% và 98,1%; rutin (**3**) do Công ty TNHH Thiết bị Khoa học Thịnh Phát cung cấp, độ tinh khiết 98,0%.

2.2. Máy móc, thiết bị

Hệ thống HPLC: CBM-20A (Shimazu, Nhật Bản) detector Diode Array SPD-M20A, cột sắc ký Phenomenex C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm); bể chiết siêu âm D-78224 (Đức); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản); tủ sấy chân không LabTech (Hàn Quốc) và các dụng cụ thủy tinh chính xác theo quy định.



	R_1	R_2
1	*trans*-caffeoyl	H
2	H	*trans*-caffeoyl

	R
3	rutinosyl
4	glucosyl

Hình 1. Cấu trúc hóa học của **1-4.**

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký được khảo sát về bước sóng phát hiện, thành phần, tỷ lệ pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu, từ đó lựa chọn điều kiện phù hợp nhất.

2.3.2. Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu

Quy trình chuẩn bị mẫu được khảo sát với mẫu dược liệu DT.01 dựa trên phương pháp chiết siêu âm với hệ dung môi MeOH : H_2O, thời gian, nhiệt độ, số lần chiết chiết khác nhau. Tiến hành sắc ký ở điều kiện lựa chọn và tìm ra các thông số chiết xuất tối ưu.

2.3.3. Chuẩn bị dung dịch

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: cân và pha chính xác lượng chất chuẩn **1** - **4** trong MeOH 80% để được các dung dịch có nồng độ chính xác 1000 µg/ml. Từ những dung dịch trên pha loãng thành các dãy dung dịch chuẩn: 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/ml (chất **1**); 10, 25, 50, 150, 200, 250 µg/ml (chất **2**); 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg/ml (chất **3**); 50, 100, 200, 250, 300, 350 µg/ml (chất **4**).

Chuẩn bị dung dịch thử: cân chính xác khoảng 1,25 g bột dược liệu cho vào bình nón có nút mài, thêm 50 ml MeOH 80%, chiết siêu âm 150 min ở nhiệt độ 55 ºC. Lọc bỏ bã và lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiến hành sắc ký.

2.3.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp phân tích được thẩm định theo các hướng dẫn của ICH, AOAC với các tiêu chí: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) [14, 15].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Tiến hành quét phổ UV của từng dung dịch chất chuẩn riêng biệt ở 200 - 400 nm. Kết quả thu được bước sóng hấp thụ cực đại của chất **1** là 218, 325 nm; chất **2** là 219, 324 nmm; các chất **3-4** là 255, 353 nm. Để tránh sai số trong quá trình phân tích, chúng tôi lựa chọn bước sóng 324 nm để phân tích **1-2** và 353 nm để phân tích **3-4**.

3.1.2. Lựa chọn pha động, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu

Thực hiện khảo sát các tỷ lệ hệ dung môi pha động MeCN (A) - H_2O chứa 0,1% acid formic (B), tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu. Kết quả điều kiện lựa chọn được điều kiện sắc ký thích hợp như sau:

Bảng 1. Kết quả lựa chọn điều kiện sắc ký

Các điều kiện	Kết quả
Cột	Phenomenex C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)
Hệ dung môi (chương trình rửa giải gradient)	0-25 min: từ 7 →10% A, 83 → 90% B; 25 - 40 min: từ 10 - 30% A, 90-70% B; 40-45 min: 30% A, 70% B; 45-55 min: 30-50% A, 70-50% B
Tốc độ dòng	0,85 ml/min
Thể tích tiêm	10 µl
Bước sóng phát hiện	324 nm với các chất **1** - **2** và 353 nm với các chất **3- 4**
Nhiệt độ cột	30 ºC

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 1,25 g bột dược liệu, thêm 50 ml dung môi MeOH ở các nồng độ 50, 60, 80, 100%. Cân khối lượng cả bình nón, tiến hành chiết siêu âm ở nhiệt độ 40 ºC trong 120 min. Để nguội, cân lại bình nón và bổ sung lượng dung môi có nồng độ tương ứng đã hao hụt. Tiến hành phân tích, kết quả thấy rằng diện tích pic (Spic) của các chất (**1** - **4**) tăng dần cao nhất là nồng độ MeOH 80%, sau đó không tăng ($p>0,05$). Vì vậy, dung môi MeOH 80% được lựa chọn nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng thời gian và nhiệt độ đến hiệu suất chiết suất

Cân chính xác khoảng 1,25 g bột dược liệu, chiết với 50 ml MeOH 80% ở nhiệt độ 40 ºC trong các khoảng thời gian: 60, 90, 120, 150, 180

min. Kết quả S_{pic} của các chất tăng dần theo thời gian từ 60 - 150 min ($p<0,05$), sau nếu tiếp tục tăng thời gian chiết, Spic hầu như không tăng hoặc giảm. Do vậy, thời gian 150 min là tối ưu cho chiết xuất các chất.

Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất chiết, các nhiệt độ nghiên cứu được thực hiện là 45, 50, 55, 60 ^oC trong 150 min. Thực nghiệm cho thấy S_{pic} tăng dần từ 40 đến 55 ^oC, sau đó không tăng, thậm chí có xu hướng giảm. Vì vậy, nhiệt độ thích hợp nhất cho chiết xuất các chất **1 - 4** là 55 ^oC.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng số lần chiết đến hiệu suất chiết

- Chiết một lần: cân chính xác khoảng 1,25 g bột dược liệu, cho vào bình nón chiết với 50 ml MeOH 80% ở nhiệt độ 55 ^oC, trong 150 min. Cô quay chân không thu được cắn. Hòa tan cắn và cho vào bình định mức 50 ml, bổ sung MeOH 80% đến vạch 100 ml.

- Chiết hai lần: tiến hành chiết dược liệu lần 1, bã thu được cho 50 ml MeOH 80% và tiến hành chiết lần 2 như chiết lần 1. Gộp dịch chiết lần 1, 2. Tiến hành cô chân không và pha dung dịch thử như chiết một lần.

Tiến hành sắc ký các mẫu thu được chiết một lần, chiết hai lần. Kết quả chỉ ra rằng Spic chiết một lần, chiết hai lần của cả 4 chất không khác nhau có ý nghĩa thống kê. Vì vậy thấy rằng chiết một lần ở điều kiện lựa chọn đã kiệt các chất **1 - 4** cần nghiên cứu.

Tóm lại, điều kiện chiết xuất các chất tối ưu được lựa chọn là: khối lượng dược liệu 1,25 g; thời gian chiết là 150 min; nhiệt độ chiết là 55 ^oC; dung môi chiết là 50 ml MeOH 80%; số lần chiết: một lần.

3.3. Thẩm định phương pháp định lượng

3.3.1. Tính thích hợp của hệ thống

Phân tích 6 lần lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp chất **1 - 4** có nồng độ mỗi chất là 50 µg/ml ở điều kiện sắc ký đã lựa chọn. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy các RSD đối với t_R < 1% và S_{pic} của **1 - 4** < 2%. Như vậy, hệ thống phù hợp cho việc xác định đồng thời hàm lượng hỗn hợp các chất **1 - 4** có trong lá dâu tằm.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp hệ thống

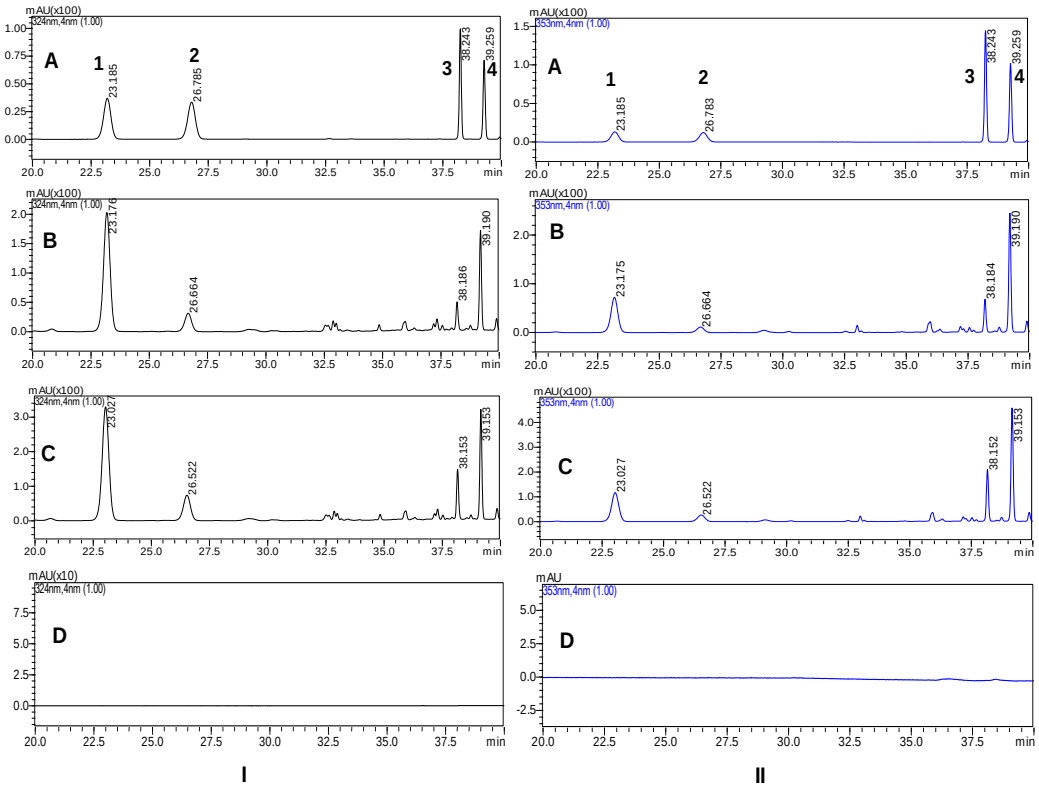
Chất phân tích	Thời gian lưu (t_R)		Diện tích pic (S_{pic})	
	M ± SD (min)	RSD (%)	M ± SD (mAU.s)	RSD (%)
1	23,186 ± 0,025	0,099	456518 ± 5377	1,178
2	26,778 ± 0,029	0,001	387072 ± 6664	1,722
3	38,242 ± 0,028	0,074	544555 ± 7486	1,375
4	39,154 ± 0,045	0,114	356472 ± 2459	0,690

3.3.2. Độ đặc hiệu

Chạy sắc ký dung dịch hỗn hợp các chất chuẩn **1-4** có nồng độ mỗi chất là 50 µg/ml, mẫu thử, thử thêm chuẩn và mẫu trắng (MeOH 80%) ở điều kiện sắc ký đã lựa chọn ở *mục 3.1.* Kết quả cho thấy tại các bước sóng khảo sát, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không có pic tạp tại thời gian lưu của các chất chuẩn; đồng thời xuất hiện các pic đồng dạng đối với các chất **1-4** của mẫu hỗn hợp chất chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn và thời gian lưu trùng nhau ($p > 0,05$). Bên cạnh đó, độ tinh khiết pic của các chất trong dung dịch chuẩn, mẫu thử đều gần bằng 1 (≥ 0,9998) (Hình 3). Do vậy, điều kiện phân tích này đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu.

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

Pha chế dãy 6 dung dịch hỗn hợp các chất **1 - 4** như mục 2.3.3. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã khảo sát, ghi kết quả, xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính, xác định hệ số tương quan. Giá trị LOD, LOQ của **1 - 4** được xác định dựa trên tỷ lệ tín hiệu chất phân tích so với nhiễu đường nền (S/N) lần lượt là 3 và 10. Kết quả thực nghiệm được ở Bảng 3.



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC của hỗn hợp chất chuẩn (A), mẫu thử (B), thêm chuẩn (C), mẫu trắng (D); I, II: lần lượt đo ở bước sóng 324, 353 nm

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LOD, LOQ của **1-4**

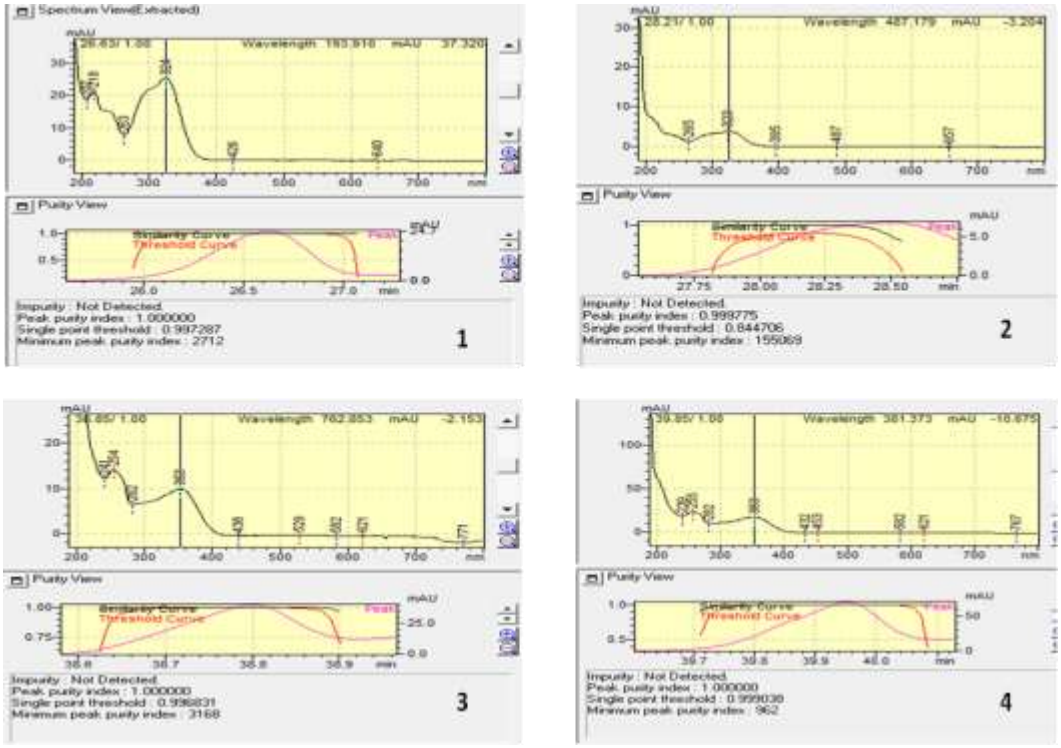
Chất phân tích	Nồng độ (µg/ml)	Phương trình hồi quy (y = ax + b)	Hệ số tương quan (R^2)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1	100-600	y = 9129,5x + 2632,7	0,9995	0,081	0,270
2	10-250	y = 8006,4x - 5613,9	0,9999	0,090	0,301
3	10-200	y = 11401x + 6202,4	0,9990	0,050	0,170
4	50-350	y = 7240,1x - 4425,4	0,9991	0,055	0,180

Kết quả khảo sát chỉ ra rằng, trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt ($R^2 \geq 0,9990$) giữa diện tích pic và nồng độ của **1 - 4**. LOD lần lượt là 0,050 - 0,090 µg/ml; LOQ lần lượt là 0,170 - 0,301 µg/ml đối với **1-4**.

3.3.4. Độ lặp lại và độ lặp lại trung gian

Độ lặp lại và độ lặp lại trung gian được thực hiện với 6 mẫu dược liệu phân tích trong ngày và 6 mẫu thực hiện khác ngày và khác người thực hiện, mỗi mẫu cân chính xác khoảng 1,25 g theo điều kiện phân tích và quy trình chiết xuất tối ưu đã khảo sát. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 4.

Từ kết quả ở Bảng 4 chỉ ra rằng, phương pháp phân tích đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại và độ lặp lại trung gian theo hướng dẫn của AOAC với RSD về hàm lượng của 4 chất trong lá dâu tằm qua 6 thí nghiệm trong ngày, khác ngày và 12 thí nghiệm trong ngày, khác ngày và khác người thực hiện đều < 2%. Mặt khác, giá trị trung bình về hàm lượng của các thí nghiệm trong ngày và khác ngày không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, độ chính xác của phương pháp đáp ứng được yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC [14].



Hình 3. Độ tinh khiết của pic chất **1** - **4** trên sắc ký đồ của mẫu thử.

Bảng 4. Kết quả xác định độ lặp lại và độ lặp lại trung gian của phương pháp

Mẫu	Kết quả phân tích trong ngày (mg/g)				Kết quả phân tích khác ngày (mg/g)			
	1	**2**	**3**	**4**	**1**	**2**	**3**	**4**
1	12,03	2,58	1,71	6,17	12,25	2,64	1,74	6,11
2	12,58	2,57	1,70	6,11	12,54	2,63	1,74	6,12
3	12,23	2,59	1,70	6,33	12,36	2,61	1,75	6,13
4	12,44	2,57	1,73	6,02	12,46	2,60	1,73	6,10
5	12,37	2,64	1,75	6,06	12,56	2,58	1,70	6,18
6	12,24	2,69	1,70	6,17	12,40	2,65	1,72	6,11
TB	12,32	2,61	1,72	6,14	12,43	2,62	1,73	6,13
SD	0,19	0,05	0,02	0,11	0,12	0,03	0,02	0,03
RSD (%)	1,55	1,86	1,21	1,78	0,94	1,01	1,03	0,47
p(trong ngày, khác ngày)	p(**1**)= 0,24; (**2**): 0,62; (**3**):0,21; (**4**): 0,70							
n =12	(**1**): TB = 12,37 ± 0,16 mg/g, RSD =1,31% ; (**2**): TB= 2,61 ± 0,04 mg/g, RSD = 1,44%; (**3**): TB = 1,72 ± 0,02 mg/g, RSD = 1,16% (**4**): TB= 6,13 ± 0,08, RSD =1,25%							

3.3.6. Độ đúng

Cân chính xác khoảng 1,25 g dược liệu, tiến hành chiết theo quy trình đã tối ưu hóa Mục 3.2. Sau đó lấy chính xác các thể tích dung dịch chuẩn **1** - **4** có nồng độ sao cho tương ứng bằng khoảng 50; 100; 150 % so với nồng độ các chất phân tích có trong mẫu thử (đã định lượng để biết trước nồng độ), tại mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Sau đó cô khô, cắn thu được hòa tan trong nền mẫu thử (dịch chiết mẫu thử pha loãng 1:1 với dung môi chiết). Kết quả trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Chất phân tích	Hàm lượng mẫu thử (µg/ml)	Nồng độ thêm chuẩn (µg/ml)	Nồng độ trung bình tìm lại (µg/ml)	Độ thu hồi (%)
1	139,40	70	69,04 ± 0,50	98,63 ± 0,78
		140	139,45 ± 1,50	99,60 ± 1,10
		210	209,07 ± 2,90	99,56 ± 1,38
2	29,94	15	14,91 ± 0,10	99,42 ± 0,94
		30	29,62 ± 0,20	98,87 ± 0,72
		45	44,78 ± 0,72	99,52 ± 0,71
3	19,88	10	9,96 ± 0,13	99,58 ± 1,31
		20	20,04 ± 0,14	100,21 ± 0,68
		30	29,86 ± 0,12	99,52 ± 0,38
4	68,20	30	29,62 ± 0,26	98,74 ± 0,86
		75	74,07 ± 1,24	98,75 ± 1,66
		105	103,95 ± 0,96	99,00 ± 0,92

Bảng 6. Kết quả định lượng **1- 4** trong các mẫu lá dâu tằm

Số TT	Mẫu	Hàm lượng (mg/g); (n=3)			
		1	2	3	4
1	DT.01	12,64 ± 0,10	2,57 ± 0,04	1,77 ± 0,10	6,09 ± 0,09
2	DT.02	12,19 ± 0,09	2,63 ± 0,04	1,66 ± 0,06	6,22 ± 0,10
3	DT.03	12,72 ± 0,02	2,58 ± 0,06	1,77 ± 0,04	6,29 ± 0,06
4	DT.04	12,16 ± 0,09	2,55 ± 0,04	1,66 ± 0,07	6,27 ± 0,10
5	DT.05	11,96 ± 0,15	2,58 ± 0,07	1,81 ± 0,10	6,18 ± 0,07
6	DT.06	12,63 ± 0,10	2,57 ± 0,09	1,70 ± 0,09	6,17 ± 0,13
7	DT.07	12,29 ± 0,05	1,81 ± 0,11	1,70 ± 0,12	6,22 ± 0,10
8	DT.08	12,58 ± 0,03	2,50 ± 0,05	1,72 ± 0,11	6,12 ± 0,14

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất thu hồi của **1 - 4** nằm trong khoảng 95,0-105,0% đáp ứng yêu cầu độ thu hồi theo hướng dẫn của AOAC [14]. Như vậy, phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng thông qua đánh giá hiệu suất thu hồi.

3.4. Ứng dụng định lượng các chất trong một số mẫu lá dâu tằm

08 mẫu lá dâu tằm thu hái tại địa bàn tỉnh Phú Thọ, Hà Nội được sấy khô và định lượng các chất theo quy trình phân tích đã thẩm định ở trên. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Từ kết quả Bảng 6 cho thấy, hàm lượng trong lá dâu tằm của chất **1** cao nhất, tiếp đến chất **4**, **2, 3**. Hàm lượng chất trong các mẫu không dao động nhiều và hàm lượng chất **3** đạt yêu cầu của ChP 2020.

4. Bàn luận

Hiện nay có một số công trình đã công bố về nghiên cứu định tính, định lượng các chất trong lá dâu tằm, sử dụng phương pháp HPLC [4, 13, 16, 17] hoặc HPLC-MS [18]. Các chất marker thường được lựa chọn để phân tích là polyphenol như flavonoid, dẫn xuất acid caffeoylquinic, coumarin,… [4, 17].

Ở Việt Nam, theo tra cứu của chúng tôi, hiện chỉ có công trình nghiên cứu định lượng đồng thời moracin M và oxy-transresveratrol trong lá dâu tằm bằng HPLC [19]. Ngoài nước có các công trình nghiên cứu: W. J. Lee và cs (2012) đã xây dựng phương pháp định lượng 6 polyphenol trong lá dâu tằm bằng HPLC, trong đó có chất **1**, **3-4**. Bước sóng phát hiện của **1** ở 310 nm và **3-4** ở 370 nm, hệ dung môi: acid phosphoric 0,05% và MeCN, chạy gradient tuyến tính với tốc độ

dòng 0,8 ml/min. Hàm lượng các chất phụ thuộc vào thời gian thu mẫu, thứ, chế biến nhiệt, trong đó: **1** (3,28 - 12,60 mg/g), **3** (0,20 - 2,51 mg/g), **4** (0,27-1,09 mg/g) [16]. Năm 2017 G. Ganzon và cs đã phân lập và xây dựng phương pháp định lượng được 5 phenolic trong lá dâu tằm gồm: **1**-**4**, gastrodin với điều kiện: Cột pha đảo Purosphere STAR RP-18, bước sóng phát hiện ở 280 nm, pha động là TFA trong nước 0,05% - MeCN (tt/tt) theo chương trình rửa giải gradient, tốc độ dòng duy trì 1,0 ml/min, và nhiệt độ cột là 40 ^{o}C. Kết quả, hàm lượng các chất **1**-**4** trong lá giữa lần lượt là 0,33 ± 0,12, 0,51 ± 0,16, 0,16 ± 0,09, 0,39 ± 0,27 mg/g lá khô [4]. J. H. Kim và cs. (2020) đã tối ưu hóa chiết xuất và định lượng 12 marker (skimmin, mulberrosid A, **1**, acid 4-hydroxycinnamic, **3**-**4**, taxifolin, oxyresveratrol, astragalin, quercitrin, kuwanon G, morusin) trong các phần (lá, thân, cành, quả) của dâu tằm. Kết quả dung môi MeOH 70% chiết siêu âm trong 30 min cho hiệu quả chiết các marker tối ưu nhất. Mặt khác, nhóm tác giả cũng xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng các marker này bằng HPLC-DAD với các điều kiện sắc ký như sau: Cột C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 µm) ở 35 ^{o}C. Tốc độ dòng 1 ml/min và thể tích tiêm 10 µl. Pha động gồm TFA 0,1% (A) và MeCN (B), chạy gradient với bước sóng phân tích: 255 nm (**3**-**4**), 325 nm (**1**). Kết quả xác định được hàm lượng **1**, **3**-**4** trong lá lớn nhất, lần lượt 19,99 ± 9,36, 3,25 ± 1,47, 3,83 ± 2,42 mg/g [17].

Dựa vào sự tham khảo các công trình nghiên cứu và điều kiện thực tế tại phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn các chất **1**-**4** làm marker để xây dựng phương pháp định lượng đồng thời bằng phương pháp HPLC. Điều kiện chiết siêu âm tối ưu khảo sát được là MeOH 80%, tỷ lệ dung môi/dược liệu là 1,25 g/50 ml; thời gian chiết là 150 min; nhiệt độ chiết là 55 ^{o}C. Phương pháp định lượng các chất sử dụng hệ dung môi MeCN - H_2O chứa 0,1% acid formic, chạy gradient với thời gian 60 min được thẩm định và đạt các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại. Mặt khác, phương pháp này đơn giản, chính xác, và t_R thích hợp, tương đồng với một số nghiên cứu đã công bố [4, 17], do đó có thể dễ dàng triển khai áp dụng vào thực tiễn vì tính khả thi. Ứng dụng kết quả định lượng, xác định hàm lượng các chất trong các mẫu lá dâu tằm thu hái tại 07 địa điểm khác nhau tại tỉnh Phú Thọ (mới) [05 mẫu tỉnh Phú Thọ (cũ); Vĩnh Phúc (cũ), Hòa Bình (cũ) mỗi tỉnh 01 mẫu] và 01 mẫu tại Hà Nội cho thấy hàm lượng các chất **1** - **4** tương đối ổn định, không dao động nhiều, và hàm lượng chất **3** thấp nhất, tiếp đến chất **2**, **4**, **1**. So với nghiên cứu G. Ganzon và cs. [4] thì hàm lượng các chất **1** - **4** của nghiên cứu này lớn hơn rất nhiều, tuy nhiên so với nghiên cứu của J. H. Kim và cs. (2020) [17] thì hàm lượng chất **1**, **3** thấp hơn, nhưng chất **4** cao hơn. Ngoài ra, hàm lượng chất **3** của các mẫu nghiên cứu đều đạt yêu cầu của ChP 2020 (> 0,1%) [14]. Từ những kết quả nghiên cứu ở trên, là cơ sở khoa học gợi ý đến việc bổ sung chỉ tiêu hàm lượng trong tiêu chuẩn chất lượng lá dâu tằm thu hái tại Việt Nam, góp phần nâng cao chất lượng dược liệu và các sản phẩm chứa lá dâu tằm lưu hành trên thị trường.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời acid chlorogenic, acid crytochlorogenic, rutin, isoquercitrin trong lá dâu tằm bằng phương pháp HPLC-DAD sử dụng cột sắc ký pha đảo. Phương pháp được thẩm định và đạt các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH, AOAC về độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng. Quy trình phân tích được áp dụng để đánh giá 08 mẫu lá dâu tằm, gồm 05 mẫu thu hái tại Phú Thọ (cũ); Hà Nội, Vĩnh Phúc (cũ) và Hòa Bình (cũ) mỗi nơi 01 mẫu. Kết quả cho thấy hàm lượng acid chlorogenic, acid crytochlorogenic, rutin, isoquercitrin lần lượt nằm trong khoảng, 11,96 - 12,72, 1,81 - 2,63, 1,66 - 1,81, 6,09 - 6,29 mg/g tính theo khối lượng lá khô.

Tài liệu tham khảo

[1] Z. Wu, P. H. Raven, Flora of China, Missouri Botanical Garden Press, Vol. 5, 2003.

[2] Vietnamese Ministry of Health, Vietnamese Pharmacopoeia V, Hanoi: Medical Publishing House, 2017, Vol. 2 (in Vietnamese).

[3] T. Katsube, N. Imawaka, Y. Kawano, Y. Yamazaki, K. Shiwaku, Y. Yamane, Antioxidant Flavonol Glycosides in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves Isolated Based on LDL Antioxidant Activity, Food Chemistry, Vol. 97, No. 1, 2006, pp. 25-31.

[4] J. G. Ganzon, L. G. Chen, C. C. Wang, 4-*O*-Caffeoylquinic Acid as an Antioxidant Marker for Mulberry Leaves Rich in Phenolic Compounds, Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 26, No 3, 2018, pp. 985-993.

[5] M. Kujawska, M. Ewertowska, T. Adamska, E. Ignatowicz, E. Flaczyk, M. Przeor, M. Kurpik, J. J.Liebert, Protective Effect of *Morus alba* Leaf Extract on N-Nitrosodiethylamine-induced Hepatocarcinogenesis in Rats, In Vivo, Vol. 30, No. 6, 2016, pp. 807-812.

[6] H. X. Li, M. Heo, Y. Go, Y. S. Kim, Y. H. Kim, S. Y. Yang, Li W., Coumarin and Moracin Derivatives from Mulberry Leaves (*Morus alba* L.) with Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitory Activity, Molecules, Vol. 25, No. 17, 2020, https://doi.org/10.3390/molecules25173967.

[7] C. Y. Chen, C. L. Kao, H. C. Yeh, P. L. Song, R. J. Lin, H. T. Li, Chemical Constituents of *Morus alba*, *C*hemistry of Natural Compounds, Vol. 56. No. 5, 2020, pp. 904-905.

[8] N. S. Radulović, V. M. Miljković, M. Z. Mladenović, G. S. Nikolić, Essential Oils of *Morus alba* and *M. nigra* Leaves: Effect of Drying on the Chemical Composition, Natural Product Communications, Vol. 12, No. 1, 2017, pp. 115-118.

[9] X. H. Gao, S. D. Zhang, L. T. Wang, L. Yu, X. L. Zhao, H. Y. Ni, Y. Q. Wang, J. D. Wang, C. H. Shan, Y. J. Fu, Anti-Inflammatory Effects of Neochlorogenic Acid Extract from Mulberry Leaf (*Morus alba* L.) Against LPS-Stimulated Inflammatory Response through Mediating the AMPK/Nrf2 Signaling Pathway in A549 Cells, *Molecules*, Vol. 25, No. 6, 2020, https://doi.org/10.3390/molecules25061385.

[10] Y. Yang, X. Yang, B. Xu, G. Zeng, J. Tan, X. He, C. Hu, Y. Zhou, Chemical Constituents of *Morus alba* L. and their Inhibitory Effect on 3T3-L1 Preadipocyte Proliferation and Differentiation, *Fitoterapia*, Vol. 98, 2014, pp. 222-227.

[11] D. S. Castillo, J. J. Q. Mesa, Y. J. R. Alvear, M. Rodríguez, Chemical Evaluation and Anti-radical Activity of Varieties of *Morus alba* l. (Morera, Moraceae) from Venezuela, *Bionatura*, Vol. 6, No. 1, 2021, https://doi.org/10.21931/rb/2021.06.01.21.

[12] J. Y. Jeong, Y. H. Jo, S. B. Kim, Q. Liu, J. W. Lee, E. J. Mo, K. Y. Lee, B. Y. Hwang, M. K. Lee, Pancreatic Lipase Inhibitory Constituents from *Morus alba* Leaves and Optimization for Extraction Conditions, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 25, No. 11, 2015, pp. 2269-2274.

[13] Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, China Medical Sicence Press, Vol. 1, 2020 (in Chinese).

[14] AOAC International. Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, AOAC Official Methods of Analysis, 2016, pp. 2.

[15] ICH, Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.

[16] W. J. Lee, S. W. Choi, Quantitative Changes of Polyphenolic Compounds in Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves in Relation to Varieties, Harvest Period, and Heat Processing, Preventive Nutrition and Food Science, Vol. 17, No. 4, 2012, pp. 280-2855.

[17] J. H. Kim, E. J. Doh, G. Lee, Quantitative Comparison of the Marker Compounds in Different Medicinal Parts of *Morus alba* L. Using High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector with Chemometric Analysis, *Molecules*, Vol. 25, No. 23, 2020, https://doi.org/10.3390/molecules25235592.

[18] W. T. Ju, O. C. Kwon, H. B. Kim, G. B. Sung, H. W. Kim, and Y. S. Kim, Qualitative and Quantitative Analysis of Flavonoids from 12 Species of Korean Mulberry Leaves, Food Science and Technology, Vol. 55, No. 5, 2018, pp. 1789-1796.

[19] T. N. D Dang, N. T Huynh, Development of a Method for Simultaneous Determination of Moracin M and Oxy-trans Resveratrol in *Morus alba* L., Family Moraceae, Pharmaceutical Journal, Vol. 55, No. 7, 2015, pp. 20-24 (in Vietnamese).