

Định lượng flavonoid toàn phần trong tam giác mạch (*Fagopyrum esculentum*) bằng phương pháp đo quang

Nguyễn Thị Minh Diệp¹, Nguyễn Quốc Tuấn¹
Ngô Thị Xuân Thịnh¹, Đào Việt Hưng¹, Hà Quang Lợi¹
Hà Thanh Hòa¹, Hoàng Đức Luận¹, Ngô Đức Huệ², Phạm Quốc Tuấn^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược, Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ

²Trung tâm Kiểm nghiệm Tỉnh Phú Thọ

Summary

Using a photometric method, which determined the content of total flavonoid in *Fagopyrum esculentum* and calculated by rutin. The regression equation of the method was $y = 0.0109x - 0.0111$ in the concentration range 10.0 - 100.0 $\mu\text{g/ml}$, a correlation coefficient of 0.9994 ($R^2 = 0.9994$), and recovery rate 96.00 - 100.25 %. The results showed that the contents of flavonoids range from 7.15 - 7.61 % at different collection sites. The method is simple, fast, accurate, and suitable for the quantitation of the total flavonoid in *Fagopyrum esculentum* as well as the orientation for serving the standardization of the medicinal materials.

Keywords: *Fagopyrum esculentum*, total flavonoid, photometric method, rutin, quantitative analysis.

Đặt vấn đề

Chi Kiều mạch (*Fagopyrum*) thuộc họ Rau răm (Polygonaceae) trên thế giới có khoảng 15 loài, chủ yếu ở phân bố châu Âu và châu Á [1]. Chi này ở Việt Nam có 2 loài là *F. esculentum* và *F. tataricum* [2].

Tam giác mạch (lúa mạch đen, kiều mạch, buckwheat) có tên khoa học là *Fagopyrum esculentum* Moench (Syn.: *Polygonum fagopyrum* L.), có mặt ở vùng ôn đới ẩm của châu Á và châu Âu [1]. Tại Việt Nam, tam giác mạch (TGM) là cây nhập nội, được trồng nhiều ở các tỉnh miền núi phía Bắc như Hà Giang, Cao Bằng, Lạng Sơn, Thái Nguyên... để lấy hạt làm thức ăn và nuôi gia súc. Ở Trung Quốc, cây này được sử dụng để chữa tràng vị tích trứ, tiêu chảy lâu ngày không khỏi, bạch trọc, bạch đới [3].

Các nghiên cứu chỉ ra rằng thành phần hóa học chính của loài này chứa các hợp chất flavonoid như rutin, quercetin, isoquercetin... Theo nghiên cứu trước của chúng tôi, hàm lượng rutin, quercetin trong tam giác mạch

ở một số tỉnh miền núi phía Bắc nước ta lần lượt trên 2,2 % và 0,13 % [4]. Bên cạnh đó, các flavonoid phân lập được có nhiều tác dụng sinh học có ý nghĩa như chống oxy hóa [5], ức chế tế bào ung thư [6], chống lại peroxid hóa lipid [7], bền thành mao mạch, bảo vệ gan [7]... Ở Việt Nam, hiện nay, TGM vẫn dừng lại ở việc làm thực phẩm và du lịch mà chưa được ứng dụng làm các sản phẩm bảo vệ sức khỏe. Do vậy, để tiêu chuẩn hóa chất lượng dược liệu TGM, chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng flavonoid toàn phần góp phần phát triển các sản phẩm liên quan đến sức khỏe từ TGM.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là phần trên mặt đất (thân, lá, hoa) của TGM được thu hái tại các tỉnh Phú Thọ, Hà Giang, Yên Bái, Bắc Kạn, Cao Bằng vào tháng 12/2019. Mẫu cây được thẩm định tên khoa học là *Fagopyrum esculentum* Moench bởi một thành viên bài báo (TS. Phạm Quốc Tuấn - Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ); các mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Phòng lưu mẫu - Bộ môn Dược liệu, Trường Cao đẳng Y Dược

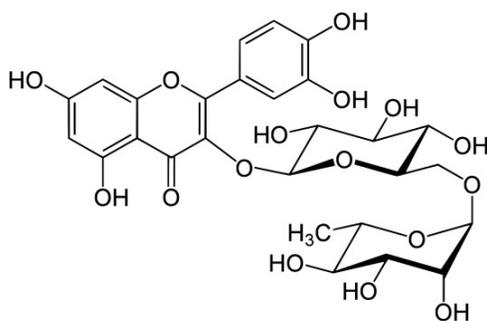
Chịu trách nhiệm: Phạm Quốc Tuấn
Email: phamquocluan@duocphutho.edu.vn
Ngày nhận: 13/9/2021
Ngày phản biện: 20/9/2021
Ngày duyệt bài: 25/11/2021

Phú Thọ.

Các mẫu dược liệu được rửa sạch sau thu hái, sấy khô (ẩm $\leq 8,0$ %), xay thành bột, rây qua rây 200 μm , đóng túi PE, buộc kín. Mẫu được sử dụng cho xây dựng phương pháp định lượng là mẫu được thu hái tại Phú Thọ.

Hóa chất, dung môi

Chất chuẩn rutin (rutinosid): Mua từ Hãng Chengdu Biopurity Phytochemicals Ltd., số lô PRF10040801, có độ tinh khiết 98 % (HPLC).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của rutin

Các dung môi, hóa chất: Methanol (MeOH), ethanol (EtOH), *n*-hexan, natri nitrit (NaNO_2), nhôm clorid (AlCl_3), natri hydroxyd (NaOH), nước cất (H_2O) đạt tiêu chuẩn tinh khiết hóa học.

Thiết bị

Máy UV-Vis UV 1800, dải đo 190 - 900 nm (Shimadzu, Nhật Bản); bể chiết siêu âm D-78224 (Elma, Đức); cân phân tích AUW220D (Shimadzu, Nhật Bản); nồi cách thủy WNB14 (Mettler, Đức); tủ sấy chân không (Daihan Labtech Co., Ltd, Hàn Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dung dịch đo quang

Dung dịch mẫu chuẩn: Cân chính xác và pha lượng chất chuẩn rutin trong MeOH để thành dung dịch có nồng độ chính xác 1000 $\mu\text{g/ml}$. Từ dung dịch trên, pha loãng thành các dung dịch có nồng độ 10, 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/ml}$.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1 g bột TGM đã được xác định độ ẩm, thêm 50 ml *n*-hexan, siêu âm 40 phút (tại nhiệt độ 45 °C), loại bỏ dung môi, sấy khô. Sau đó, thêm 100 ml MeOH 70 %, siêu âm trong 60 phút chia 2 lần, sau đó thêm lượng MeOH 70 % đã

hao hụt. Lọc dung dịch trên thu được dịch lọc. Lấy chính xác 1,0 ml dịch lọc, tiến hành phản ứng tạo màu như điều kiện đo quang ở dưới, từ đó xác định hàm lượng flavonoid toàn phần.

Dung dịch tạo màu: Dung dịch NaNO_2 5 %, AlCl_3 10 %, và NaOH 1 M (dung môi là nước cất).

Điều kiện đo quang: Lấy chính xác 1 ml dung dịch mẫu cho phản ứng tạo màu giữa rutin và 0,3 ml dung dịch NaNO_2 5 %. Sau 5 phút, tiếp tục với 0,3 ml dung dịch AlCl_3 10 %. Sau 6 phút, thêm 2 ml dung dịch NaOH 1 M. Phức màu tạo thành đem đo quang trên máy quang phổ UV-Vis ở cực đại hấp thụ tại 500 nm^[8]. Dung dịch mẫu trắng cũng được tiến hành song song nhưng không chứa chất phân tích.

Thẩm định quy trình định lượng: Phương pháp phân tích được thẩm định dựa trên hướng dẫn của ICH^[9].

Tính kết quả: Hàm lượng flavonoid toàn phần trong TGM bằng quy trình đã xây dựng.

$$\text{Hàm lượng (\%)} = \frac{C \times V \times 10 \times 100}{10^6 \times m \times (100 - B)} \times 100$$

Trong đó:

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

- *V*: Thể tích pha mẫu thử (ml);

- *m*: Khối lượng mẫu thử (g);

- *B*: Độ ẩm của mẫu thử (%).

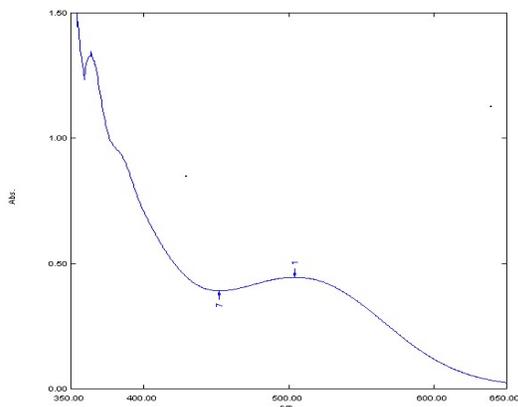
Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng flavonoid toàn phần: Các mẫu TGM thu hái tại một số tỉnh miền núi phía Bắc trong cùng một thời điểm, được phơi sấy, bảo quản trong cùng điều kiện với mẫu nghiên cứu. Tiến hành phân tích xác định hàm lượng flavonoid tổng số dựa vào điều kiện đã khảo sát ở trên.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Xây dựng quy trình định lượng

Lựa chọn bước sóng phân tích

Thực hiện phản ứng tạo màu theo điều kiện đo quang, quét phổ UV-Vis mẫu chuẩn rutin. Kết quả ở hình 2 cho thấy dung dịch mẫu chuẩn có độ hấp thụ quang cực đại tại bước sóng 500 nm. Bước sóng này được lựa chọn làm bước sóng phân tích định lượng flavonoid toàn phần các mẫu TGM.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV-Vis

Tối ưu hóa điều kiện chiết xuất Khảo sát dung môi chiết xuất

Cân chính xác khoảng 1 g bột dược liệu, thêm 50 ml *n*-hexan, siêu âm 40 phút, loại bỏ dung môi, sấy khô. Sau đó, tiếp tục chiết xuất với các dung môi EtOH 50, 70, 90 % và MeOH 50, 70, 90 %, lượng dung môi chia làm 2 lần (50 ml/lần), siêu âm mỗi lần trong 30 phút, lọc và chuyển vào bình định mức 100 ml, tráng bã và bổ sung dung môi tới vạch. Các dịch chiết thu được tiến hành phản ứng như điều kiện đo quang đã xây dựng.

Bảng 1. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Dung môi	MeOH			EtOH		
	90 %	70 %	50 %	90 %	70 %	50 %
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,502	0,632	0,429	0,320	0,329	0,220

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy rằng dung môi chiết MeOH tại các nồng độ tương ứng đều cho độ hấp thụ quang cao hơn, cụ thể tại nồng độ MeOH 70 % cho độ hấp thụ quang lớn nhất nên được chọn làm dung môi chiết xuất.

Khảo sát nhiệt độ chiết xuất

Khảo sát nhiệt độ chiết xuất được tiến hành sau khi lựa chọn dung môi chiết xuất (MeOH 70 %), các

điều kiện thí nghiệm được giữ nguyên như trên và thay đổi nhiệt độ chiết: 30, 35, 40, 45 và 50 °C. So sánh độ hấp thụ quang của mẫu phân tích tại các nhiệt độ tương ứng. Kết quả ở bảng 2 cho thấy ở nhiệt độ 45 °C cho độ hấp thụ quang lớn nhất, tại 50 °C giá trị này không tăng thêm và có chiều hướng giảm nhẹ. Vì vậy, nhiệt độ chiết tối ưu được lựa chọn tại 45 °C.

Bảng 2. Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết xuất

Nhiệt độ (°C)	30	35	40	45	50
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,492	0,559	0,604	0,639	0,635

Kết quả ở bảng 2 cho thấy ở nhiệt độ 45 °C cho độ hấp thụ quang lớn nhất, tại 50 °C giá trị này không tăng thêm và có chiều hướng giảm nhẹ. Vì vậy, nhiệt độ chiết tối ưu được lựa chọn tại 45 °C.

Khảo sát thời gian chiết xuất

Để tối ưu hóa cho chiết xuất, mẫu nghiên cứu tiếp tục được khảo sát thời gian tại 30, 45, 60, 75 và 90 phút ở nhiệt độ 45 °C.

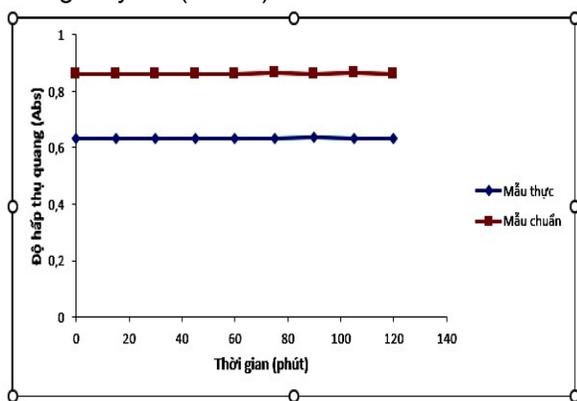
Bảng 3. Kết quả khảo sát thời gian chiết xuất

Thời gian (phút)	30	45	60	75	90
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,452	0,580	0,637	0,636	0,630

Kết quả ghi lại trong bảng 3 cho thấy thời gian chiết từ 60 đến 90 phút, độ hấp thụ quang thay đổi không đáng kể. Do vậy, thời gian phù hợp cho quá trình chiết xuất được lựa chọn là 60 phút.

Đánh giá độ ổn định của phản ứng tạo màu

Để khảo sát độ ổn định màu của phản ứng, tiến hành làm phản ứng (3 lần), đo độ hấp thụ quang liên tục trong 120 phút của dung dịch rutin chuẩn (80 µg/ml) và dung dịch mẫu thực. Kết quả cho thấy độ hấp thụ quang hầu như không thay đổi (hình 3).



Hình 3. Độ ổn định của phản ứng tạo màu

Từ kết quả thực nghiệm ở trên cho thấy điều kiện chiết xuất tối ưu TGM là: Dung môi MeOH 70 % ở nhiệt độ 45 °C trong 60 phút. Điều kiện này được sử dụng trong quy trình phân tích tiếp theo.

Thẩm định quy trình phân tích

Tính đặc hiệu của phương pháp

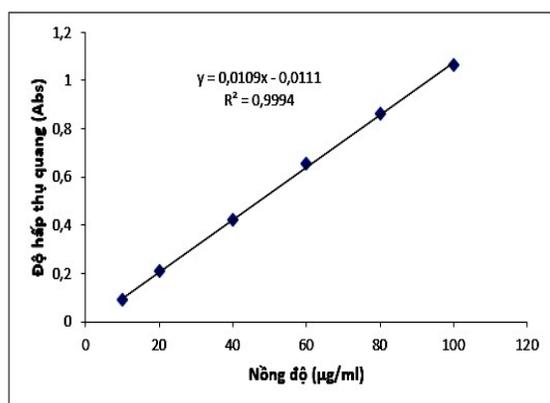
Tiến hành thực hiện phản ứng của mẫu trắng, mẫu chuẩn rutin (50 µg/ml) và mẫu thực trong điều kiện đo quang đã xây dựng, lặp lại 6 lần. Kết quả đo mẫu trắng không cho tín hiệu, mẫu chuẩn và mẫu thực cho tín hiệu hấp thụ cực đại tại 500 nm.

Xây dựng đường chuẩn

Pha một dãy các dung dịch chuẩn có nồng độ 10, 20, 40, 60, 80 và 100 µg/ml, tiến hành thực hiện phản ứng và đo độ hấp thụ quang với quy trình đã xây dựng. Kết quả có sự tương quan tuyến tính chặt giữa nồng độ rutin và độ hấp thụ quang ($R^2 = 0,9994$), được trình bày trong bảng 4 và phương trình đường chuẩn thu được như hình 4.

Bảng 4. Kết quả xây dựng đường chuẩn

Nồng độ (µg/ml)	10	20	40	60	80	100
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,089	0,208	0,422	0,654	0,864	1,062



Hình 4. Đường chuẩn xác định hàm lượng flavonoid toàn phần

Độ lặp lại

Tiến hành thực hiện phản ứng tạo màu và đo quang các dung dịch mẫu thực (n = 6). Bảng 5 là kết quả thí nghiệm được ghi lại cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với độ lệch chuẩn tương đối RSD < 1,0 %. Từ đó có thể áp dụng điều kiện đã lựa chọn để định lượng flavonoid toàn phần trong TGM.

Bảng 5. Kết quả độ lặp lại của phương pháp đo quang

STT	1	2	3	4	5	6
$m_{mẫu} (g)$	1,0002	1,0078	1,0005	1,0045	1,0109	1,0031
Độ hấp thụ quang (Abs)	0,682	0,686	0,675	0,671	0,688	0,679
Nồng độ tính theo đường chuẩn ($\mu g/ml$)	63,587	63,954	62,945	62,578	64,138	63,312
Số liệu thống kê	SD = 0,5958; RSD = 0,94 %					

Độ thu hồi
 Thêm chính xác dung dịch chuẩn rutin vào mẫu TGM đã biết hàm lượng flavonoid toàn phần thành các nồng độ 5, 15 và 30 $\mu g/ml$. Tiến hành xử lý mẫu như điều kiện đo quang đã xây dựng và thực hiện thí nghiệm lặp lại 6 lần, kết quả được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp

STT	Hàm lượng rutin thêm vào ($\mu g/ml$)					
	5		15		30	
	Hàm lượng tìm thấy ($\mu g/ml$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu g/ml$)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hàm lượng tìm thấy ($\mu g/ml$)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	4,89	97,80	14,79	98,62	29,89	98,33
2	4,98	99,64	15,05	100,51	29,51	98,37
3	4,79	96,00	14,89	99,25	29,42	98,05
4	4,88	97,75	14,98	99,88	30,08	100,25
5	4,98	99,60	14,79	98,62	29,51	98,37
6	4,89	97,80	14,60	97,36	29,98	99,94
M	4,90	98,10	14,85	99,04	29,73	98,89
SD	0,07	1,37	0,16	1,10	0,28	0,95
RSD (%)	1,46	1,39	1,08	1,11	0,96	0,96

Từ kết quả thực nghiệm trên cho thấy rằng phương pháp có độ thu hồi cao (RSD: 0,96 - 1,45 %), đảm bảo độ chính xác khi định lượng flavonoid toàn phần trong TGM.

Ứng dụng phương pháp định lượng

Áp dụng định lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu TGM thu hái tại 5 tỉnh miền núi phía Bắc dựa trên phương pháp xây dựng ở phần 3. Mỗi mẫu thực hiện thí nghiệm 3 lần, mỗi lần cân chính xác khoảng 1 g dược liệu. Kết quả thu được ở bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Kết quả định lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu TGM

Tên mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng flavonoid (%)
Phú Thọ	1,0041 \pm 0,0056	7,90	7,15 \pm 0,09
Yên Bái	1,0007 \pm 0,0101	8,00	7,40 \pm 0,07
Hà Giang	1,0016 \pm 0,0050	7,91	7,61 \pm 0,07
Bắc Kạn	1,0009 \pm 0,0048	7,42	7,54 \pm 0,05
Cao Bằng	1,0019 \pm 0,0045	7,50	7,47 \pm 0,08

Từ kết quả ở bảng 7 cho thấy hàm lượng flavonoid toàn phần trong các mẫu TGM tại các địa điểm khác nhau dao động không nhiều, từ 7,15 - 7,61 %. Theo các công bố trước đây cho thấy flavonoid trong TGM có thể lên tới 7,0 %^[10],

thành phần chính gồm các hợp chất như rutin, quercitrin và quercetin...^[4-5]. Trong đó, hàm lượng rutin và quercetin là khác nhau theo địa điểm trồng khác nhau^[4]. Rutin và quercetin là những hoạt chất được biết đến có tác dụng

chống oxy hóa, chống viêm, ức chế phát triển tế bào ung thư^[11]. Ngoài ra, quercetin cũng được chứng minh có tác dụng ức chế hấp thu glucose ở ruột^[12]. Với hàm lượng flavonoid toàn phần lớn, đây sẽ là nguồn nguyên liệu dồi dào, rẻ tiền, sẵn có để chiết xuất flavonoid toàn phần hoặc rutin để phục vụ sản xuất, thương mại hóa các sản phẩm thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe, góp phần nâng cao sức khỏe cộng đồng, xóa đói giảm nghèo cho người dân ở các tỉnh miền núi phía Bắc nước ta.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng flavonoid toàn phần trong tam giác mạch bằng phương pháp đo quang. Phương pháp này có độ lặp lại cao, phương trình tuyến tính có hệ số tương quan chặt và độ thu hồi cao. Ứng dụng phương pháp xây dựng được, xác định hàm lượng flavonoid toàn phần 05 mẫu thu hái tại các địa điểm khác nhau, hàm lượng flavonoid toàn phần không thay đổi nhiều, trong khoảng 7,15 - 7,61 %. Kết quả của nghiên cứu này gợi ý cho việc tiêu chuẩn hóa dược liệu TGM hoặc các chế phẩm thuốc, thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa TGM với kết quả chính xác, đơn giản, nhanh chóng, chi phí hợp lý.

Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Wu Z. Y., Raven P. H. (2003), "Flora of China", *Missouri Botanical Garden Press*, Vol. 5, pp. 320-323.
2. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Tập 1, NXB Trẻ, tr. 754.
3. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mía, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 214-215.
4. Nguyễn Thị Minh Diệp, Nguyễn Quốc Tuấn, Đào Việt Hưng, Ngô Thị Xuân Thịnh, Phạm Quốc Tuấn (2020), "Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời rutin và quercetin trong phần trên mặt đất cây tam giác mạch (*Fagopyrum esculentum* Moench) trên hệ thống

HPLC-PDA, *Tạp chí Dược liệu*, 25 (4), tr. 241-246.

5. Oomah B. D., Mazza G. (1996), "Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (7), pp. 1746-1750.

6. Li Y., Duan S., Jia H., Bai C., Wang Z. (2014), "Flavonoids from tartary buckwheat induce G2M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells," *Acta. Biochimica et Biophysica Sinica*, 46 (6), pp. 461-470.

7. Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J. A., Briggs C. J. (2007), "Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation," *Food Research International*, 40 (3), pp. 356-364.

8. Nguyễn Quốc Tuấn, Đào Việt Hưng, Ngô Thị Xuân Thịnh, Nguyễn Thị Minh Diệp, Phạm Quốc Tuấn (2020), "Khảo sát hàm lượng flavonoid toàn phần trong dược liệu thô ty tử và vị thuốc thô ty tử chích muối bằng phương pháp đo quang", *Tạp chí Y Dược học - Chuyên đề Dược học*, số 6 tháng 10, tr. 101 -105.

9. P. Borman, D. Elder (2018), *Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology*, in: A. Teasdale, D. Elder, R.W. Nims (Eds)", *ICH quality guidelines: An implementation guide*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, pp. 127-166.

10. Liu B., Zhu Y. (2007), "Extraction of flavonoids from flavonoid - rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoid," *Journal of Food Engineering*, 78 (2), pp. 584-587.

11. Andreuccetti V., Nuvoloni R., Gatta D., Liponi G. B., Pedonese F., Fratini F., Turchi B., Saccomanni G., Torracca B. (2017), "Rutin and quercetin content in the forage of common buckwheat as affected by maturity and conservation method," *Grassland Science*, 63 (3), pp. 169-176.

12. Eid H. M., Haddad P. S. (2017), "The antidiabetic potential of quercetin: Underlying Mechanisms", *Current Medicinal Chemistry*, 24 (4), pp. 355 -364.