

**XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI RUTIN
VÀ LUTEOLIN TRONG THỰC PHẨM CHỨC NĂNG TRÀ
HÒA TAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-PDA**

Nguyễn Ngọc Trân^{1}, Nguyễn Thị Ngọc Vân², Dương Tuyết Ngân²
Lê Thị Cẩm Thúy³, Dương Ngọc Châu³*

- 1. Công ty cổ phần Dược Minh Hải*
 - 2. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ*
 - 3. TT Kiểm Nghiệm Thuốc, Mỹ Phẩm, Thực Phẩm TP. Cần Thơ*
- *Email: ngoctran_mpc@ymail.com*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hiện nay nước ta đã sản xuất và lưu hành nhiều sản phẩm thực phẩm chức

năng từ cao hoa hòe, cao hoa cúc có chứa rutin và luteolin. Các sản phẩm này có tác dụng bảo vệ thành mạch máu, tăng sức bền mạch, chống oxy hóa, ngăn ngừa ung thư... được bán rộng rãi ở các nhà thuốc, siêu thị. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng quy trình định lượng đồng thời rutin và luteolin có trong thực phẩm chức năng trà hòa tan bằng phương pháp HPLC-PDA. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Trà hòa tan chứa cao hoa hòe 6% và cao hoa cúc 4% được xây dựng quy trình định lượng rutin, luteolin và thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của AOAC. **Kết quả:** Điều kiện sắc ký cột Water C_{18} (250mm x 4,6mm; 5 μ m), đầu dò PDA ở bước sóng 350nm, chương trình gradient với methanol - dung dịch acid formic 0,1% (45: 55, v/v). Phương pháp có khoảng tuyến tính của rutin từ 0,44 μ g/ml-442,5 μ g/mL; luteolin từ 0,48 μ g/mL-191,16 μ g/mL. Giới hạn phát hiện 0,1 μ g/mL, giới hạn định lượng 0,33 μ g/mL; Độ thu hồi của rutin từ 92,44%-99,68%, của luteolin từ 91,63%-94,91%, độ chính xác của phương pháp từ 2,58%-3,44%. Lượng rutin khoảng 0,10mg/g và luteolin là 0,04mcg/g. **Kết luận:** Phương pháp này được chứng minh là phù hợp để xác định đồng thời rutin và luteolin trong thực phẩm chức năng trà hòa tan.

Từ khóa: Rutin, luteolin, HPLC-PDA.

ABSTRACT

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF RUTIN AND LUTEOLIN IN SOLUBLE TEA DIETARY SUPPLEMENTS BY HPLC-PDA

Nguyen Ngoc Tran¹, Nguyen Thi Ngoc Van², Duong Tuyet Ngan²
Le Thi Cam Thuy³, Duong Ngoc Chau³

1. Minh Hai Pharmacy Company

2. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

3. Drug, cosmetic and food quality control Center of Can Tho city

Background: Currently, Vietnam is producing and circulating dietary supplements extracted from *Styphnolobium japonicum*, *Chrysanthemum indicum* containing rutin and luteolin. These products have the effect of protecting blood vessel walls, increasing capillary strength, antioxidant, prevent cancer, ... which are widely sold in drugstores and supermarkets. **Objectives:** Simultaneous determination of rutin and luteolin in soluble tea dietary supplements by HPLC-PDA. **Materials and methods:** Instant tea containing 6% *Styphnolobium japonicum* extracted and 4% *Chrysanthemum indicum* extracted was developed for rutin and luteolin quantification and validated analytical procedures according to AOAC guidelines. **Results:** The proposed method uses a Water C_{18} column (250mm x 4.6mm x; 5 μ m), PDA detector (350nm) using a gradient with methanol/0.1% formic acid (45:55) as mobile phase. The method has a linear range of rutin from 0.44 μ g/mL-442.5 μ g/mL; luteolin from 0.48 μ g/mL-191.16 μ g/mL. The LOD ranged at 0.1 μ g/mL, LOQ ranged at 0.33 μ g/mL. The obtained method was fully validated. The recovery of rutin ranged from 92.44%-99.68% and luteolin from 91.63%-94.91%, the precision of the method ranged from 2.58% to 3.44%. The content of rutin and luteolin were respectively about 0.1mg/g and 0.04mcg/g. **Conclusion:** The method was proved to be suitable for the determination of rutin and luteolin in soluble tea dietary supplements.

Keywords: Rutin, luteolin, HPLC-PDA.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization – WHO), hiện có khoảng 1 tỷ người trên thế giới mắc bệnh tăng huyết áp và con số này sẽ tăng lên 1,5 tỷ người năm 2025, toàn cầu có 17,5 triệu người chết về các bệnh tim mạch. Với thực trạng trên, việc bảo vệ và nâng cao sức khỏe, phòng chống bệnh tật là điều tất yếu và cấp bách. Bên cạnh việc điều trị bằng thuốc tân dược thì nhiều người đã tin tưởng và sử dụng thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên hay tổng hợp làm sản phẩm chăm sóc, bảo vệ sức khỏe. Hiện nay

trong nước đã sản xuất và lưu hành nhiều sản phẩm thực phẩm chức năng từ cao hoa hòe, cao hoa cúc chứa rutin và luteolin có tác dụng bảo vệ thành mạch máu, tăng sức bền mao mạch, chống oxy hóa, ngăn ngừa ung thư... được bán rộng rãi ở các nhà thuốc, siêu thị [1]. Trong điều 10 thông tư 43/2014/BYT ngày 24/11/2014 yêu cầu phải công bố về nội dung hàm lượng, các thành phần chính tạo nên công dụng của sản phẩm phải được liệt kê trước cùng tên đầy đủ và hàm lượng. Nhằm đảm bảo chất lượng, tính an toàn và hiệu quả trong việc sử dụng thực phẩm chức năng, công tác tiêu chuẩn hóa chất lượng cần được quan tâm và khảo sát đúng mức. Đã có một số nghiên cứu trong và ngoài nước được công bố cho việc xác định hàm lượng rutin bằng phương pháp đo quang phổ, sắc ký và điện di [5], phương pháp HPLC-UV [1], xác định hàm lượng luteolin bằng phương pháp HPLC [2], xác định đồng thời rutin, luteolin, quercetin và betulonic acid bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) [7]. Trong đó, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là phổ biến bởi có độ nhạy, độ chính xác cao, phù hợp với điều kiện của nhiều phòng thí nghiệm. Vì vậy nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu: “Xây dựng quy trình định lượng đồng thời rutin và luteolin có trong thực phẩm chức năng trà hòa tan bằng phương pháp HPLC-PDA”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Chất chuẩn Rutin (Viện KN thuốc TPHCM): Lot: QT152060420; độ tinh khiết 88,5 % (HPLC).

- Chất chuẩn Luteolin (TRC): Lot: 2-NQH-43-1; độ tinh khiết 95,58 % (HPLC).

- Methanol, acid formic, nước cất 2 lần, đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích HPLC.

2.2. Thiết bị: Đã được hiệu chuẩn theo quy định ISO/IEC 17025 (2017)

- Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu - LC – 20AD (Nhật) với detector PDA.

- Cân phân tích Sartorius CP224S, độ chính xác $d=0,1$ mg.

- Máy lắc siêu âm Elmasonic S-120H (Đức).

- Dụng cụ thủy tinh chính xác (Duran-Đức).

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử: Trà hòa tan chứa cao hoa hòe 6% và cao hoa cúc 4% (Ngày sản xuất: 01/08/2020; Hạn dùng: 01/08/2022).

Mẫu trắng: Dung môi pha động.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

- **Khảo sát điều kiện sắc ký:** Các điều kiện sắc ký cố định như cột sắc ký Water C₁₈ (4,6mm x 250mm; 5 μ m), thể tích tiêm 20 μ L và tốc độ dòng 1mL/phút. Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký bao gồm chương trình rửa giải, bước sóng phát hiện, thành phần và tỷ lệ pha động để lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu.

- **Mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 2,5g mẫu đã được nghiền mịn cho vào bình định mức 10mL, thêm 10ppm chất chuẩn luteolin vào, điền đầy đến vạch bằng methanol 70%, lắc siêu âm 5 phút, để nguội. Gạn lấy lớp dịch chiết vào bình định mức 20mL, tiến hành chiết lặp lần 2 như trên rồi gộp dịch chiết, bổ sung vừa đủ methanol 70% đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, sau đó tiêm vào hệ thống sắc ký.

- **Mẫu chuẩn:** Chuẩn bị hỗn hợp mẫu chuẩn rutin 100 μ g/mL và luteolin có nồng độ 10 μ g/mL.

2.5. Thẩm định quy trình phân tích: Thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn

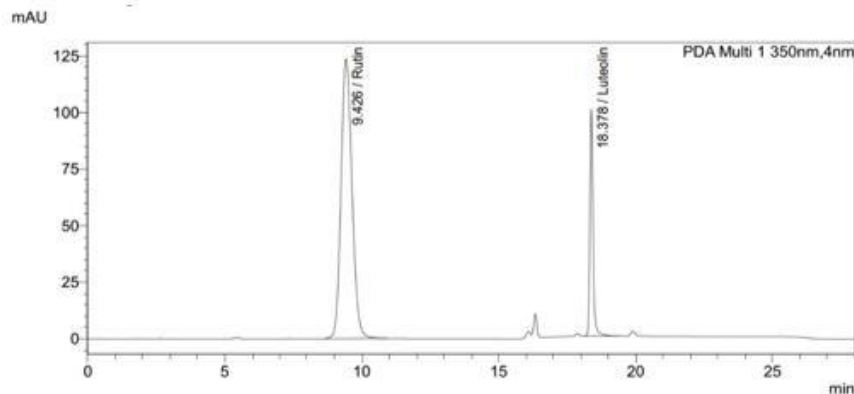
của AOAC bao gồm các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác và độ đúng [3].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Điều kiện sắc ký

Bảng 1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký	Water C ₁₈ (4,6mm x 250mm; 5µm)		
Pha động B	Methanol		
Pha động C	Acid formic 0,1%		
Chương trình gradient	Thời gian (phút)	Pha động B (%)	Pha động C (%)
	0,01	45	55
	9,0	40	60
	11,0	70	30
	20,0	70	30
	21,0	45	55
	28,0	45	55
Tốc độ dòng	1mL/phút		
Thể tích tiêm	20µL		
Nhiệt độ cột	30°C		
Bước sóng phát hiện	350nm		
Đầu dò	PDA		



Hình 1: Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn rutin và luteolin ở điều kiện sắc ký lựa chọn

3.2. Tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần mẫu hỗn hợp chuẩn rutin và luteolin nồng độ 10µg/mL với điều kiện sắc ký đã chọn.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu chuẩn (n = 6)

Chất phân tích	Giá trị thống kê	t _R (phút)	S (mV x giây)	As	Rs	N
Rutin	Trung bình	9,622	309,647	1,125	-	18315
	RSD %	0,276	0,133	0,064	-	0,689
Luteolin	Trung bình	18,416	777,451	1,200	18,305	704819
	RSD %	0,036	0,073	0,126	0,818	1,070

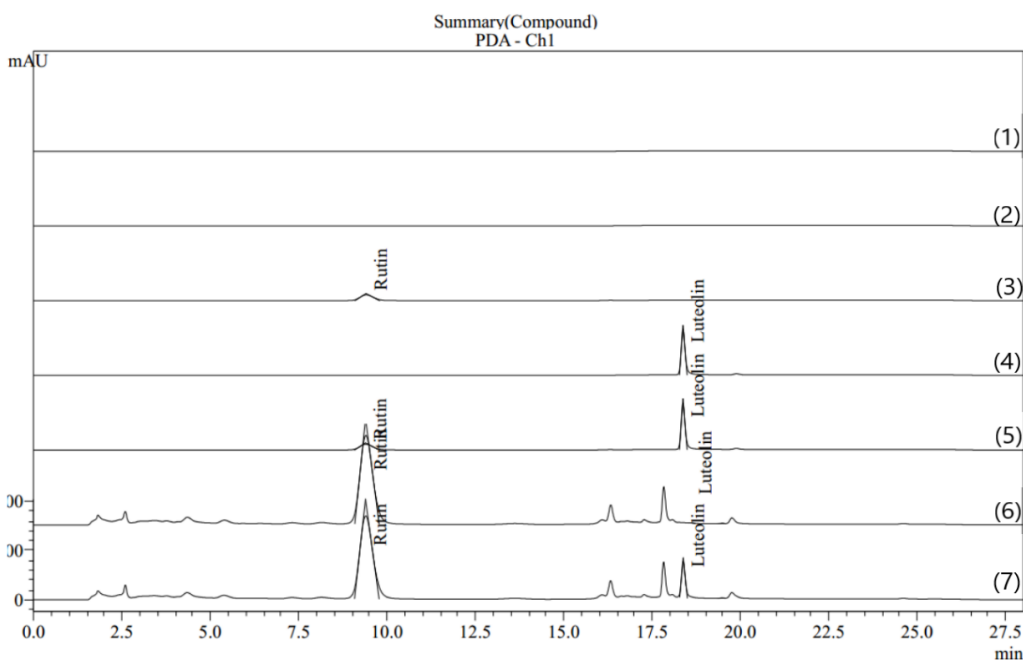
(t_R: thời gian lưu; S: diện tích đỉnh; As: hệ số đối xứng; Rs: độ phân giải; N: số đĩa lý thuyết)

Kết quả cho thấy RSD các thông số sắc ký của chất phân tích trong mẫu chuẩn đều <2%, độ phân giải giữa pic rutin và luteolin ≥ 1,5, hệ số đối xứng cả 2 pic nằm trong khoảng

0,8-1,5. Như vậy quy trình định lượng đồng thời đạt tính tương thích hệ thống.

3.3. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn rutin, mẫu chuẩn luteolin, mẫu hỗn hợp chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu dung môi pha động, mẫu dung môi chiết. Kết quả phân tích được trình bày trong hình 2 cho thấy xuất hiện pic ở các thời điểm 9 phút của rutin và 18 phút của luteolin. Ở sắc ký đồ mẫu dung môi pha động, mẫu dung môi pha mẫu không xuất hiện pic trùng thời gian lưu với các chất cần phân tích so với sắc ký đồ của hỗn hợp các chất chuẩn. Trên sắc ký đồ của mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn có xuất hiện các pic có thời gian lưu trùng với các chất phân tích trong mẫu chuẩn. Như vậy phương pháp có tính đặc hiệu chọn lọc với rutin và luteolin để phân tích các chất này trong chế phẩm.



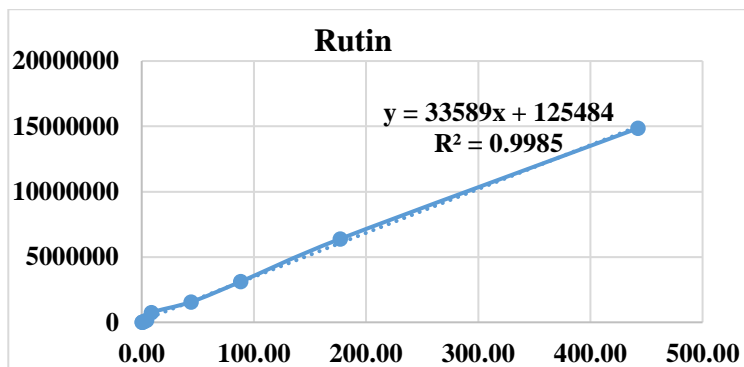
Hình 2: Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu (1: dung môi pha mẫu; 2: dung môi pha động; 3: mẫu chuẩn rutin; 4: mẫu chuẩn luteolin; 5: mẫu hỗn hợp chuẩn; 6: mẫu thử; 7: mẫu thử thêm chuẩn)

3.4. Tính tuyến tính

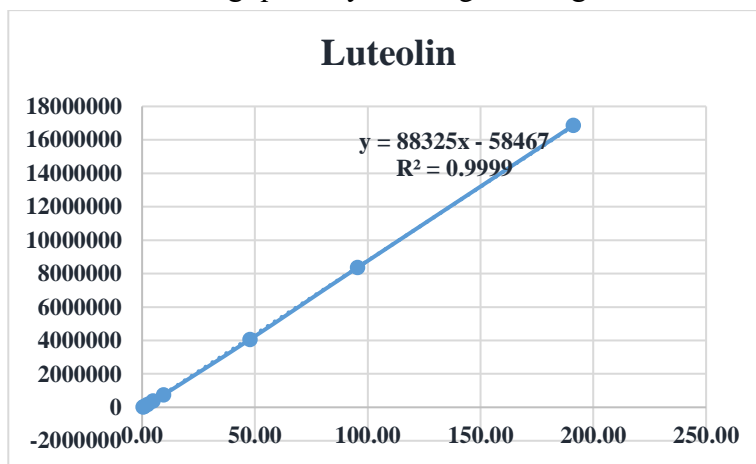
Tiến hành phân tích các mẫu chuẩn có nồng độ rutin từ 0,44µg/mL-442,5µg/mL, nồng độ luteolin từ 0,48µg/mL-191,16µg/mL theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ rutin, luteolin có trong mẫu và diện tích pic tương ứng thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở hình 3 và hình 4.

Bảng 3. Kết quả thẩm định tính tuyến tính

Chất phân tích	Phương trình hồi quy	R ²
Rutin	$y = 33589x + 125484$	0,9985
Luteolin	$y = 88325x - 58467$	0,9999



Hình 3: Đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của rutin



Hình 4: Đồ thị khảo sát sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của luteolin

Nhận xét: Kết quả thẩm định cho thấy rutin trong khoảng nồng độ 0,44µg/ml-442,5µg/mL và luteolin trong khoảng nồng độ 0,48µg/mL-191,16µg/mL có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các chất phân tích với hệ số tương quan $R^2 > 0,995$.

3.5. Giới hạn định lượng (LOQ)

Pha loãng dần dung dịch chuẩn rutin và luteolin ở mục 2.4.3 đến nồng độ thấp nhất sao cho khi tiêm vào hệ thống sắc ký, tín hiệu thu được cao gấp 10 lần so với nhiễu nền và có độ đúng, độ lặp lại đạt yêu cầu để định lượng. Giới hạn định lượng của rutin và luteolin là 0,33µg/mL.

3.6. Độ đúng và độ chính xác

Thêm vào mẫu thử một lượng xác định hỗn hợp chuẩn rutin và luteolin tương ứng với ba mức nồng độ 50%, 100%, 150%. Độ đúng được xác định dựa trên % lượng chất thu hồi so với lượng chuẩn đã thêm vào. Ở mỗi nồng độ được phân tích lặp lại 6 lần mỗi ngày, trong 3 ngày liên tiếp.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác

Chất phân tích	Độ thu hồi (%)			Độ chính xác (n = 18)	
	50 %	100 %	150 %	Trong ngày RSD %	Liên ngày RSD %
Rutin	99,68	93,43	92,44	1,24	2,58
Luteolin	91,63	94,50	94,91	3,77	3,44

IV. BÀN LUẬN

Thực phẩm chức năng chứa cao hoa hòe và cao hoa cúc hiện nay được sản xuất và lưu hành trên thị trường với nhiều dạng bào chế khác nhau. Trong nghiên cứu này việc ứng dụng phương pháp HPLC/PDA, sử dụng cột C₁₈, hệ pha động gradient với methanol - dung dịch acid formic 0,1% (45: 55, v/v), thời gian phân tích hợp lý để xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời hoạt chất rutin và luteolin trong thực phẩm chức năng trà hòa tan đã đem lại kết quả tin cậy. Quy trình xử lý mẫu thử với dung môi chiết là methanol 70%, số lần chiết kiệt hoạt chất đã được khảo sát là 2 lần, hỗ trợ lắc siêu âm 5 phút, dịch chiết được ổn định sau 96 giờ so với nghiên cứu của Khuluk và cộng sự (2021) là 48 giờ [4]. Kiểm tra tính tương thích hệ thống của quy trình, kết quả cho thấy các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu như: độ phân giải ($R_s \geq 1,5$), hệ số bất đối ($0,8 \leq A_s \leq 1,5$), số đĩa lý thuyết ($N > 2000$). Bên cạnh đó, RSD% của thông số thời gian lưu và diện tích đỉnh sau 6 lần tiêm liên tiếp đều nằm trong giới hạn cho phép ($< 2\%$). Phương pháp đạt tính đặc hiệu, đảm bảo độ chọn lọc cao, không bị ảnh hưởng bởi các thành phần khác trong nền mẫu. Khoảng tuyến tính rộng, rutin từ 0,44 μ g/mL-442,5 μ g/mL; luteolin từ 0,48 μ g/mL-191,16 μ g/mL, phương trình hồi quy của hai chất phân tích đều có tính tương thích và có hệ số tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh $R^2 > 0,995$ nên có thể áp dụng các phương trình hồi quy này vào định lượng. Kết quả xử lý và phân tích 6 mẫu thử thêm chuẩn khác nhau trong cùng một điều kiện về phòng thí nghiệm, trang thiết bị, kiểm nghiệm viên và cùng một điều kiện như trên được thực hiện trong 3 ngày liên tiếp cho kết quả độ chính xác trung gian có giá trị RSD% của rutin là 2,58% và luteolin là 3,44% đạt yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC ($< 11\%$). Điều đó cho thấy quy trình phân tích cho kết quả tin cậy khi tiến hành phân tích ở những thời gian khác nhau, kết quả định lượng không phụ thuộc vào các ngày làm việc khác nhau. Vì vậy, quy trình có thể áp dụng trong việc chạy mẫu liên tục, tiến hành sắc ký các mẫu pha sẵn trong nhiều ngày khi tiến hành định lượng rutin và luteolin từ các mẫu chế phẩm thực tế. Độ đúng được thực hiện ở 3 mức nồng độ, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi trung bình của rutin và luteolin ở mức nồng độ chuẩn thêm vào 50% là 99,68% và 91,63%; nồng độ chuẩn thêm vào 100% là 93,43% và 94,50%; nồng độ chuẩn thêm vào 150% là 92,44% và 94,91% (nằm trong khoảng 85,0% đến 110,0%). Điều này chứng minh quy trình đảm bảo được tính nguyên vẹn của chất phân tích, không bị hao hụt nhiều trong quá trình xử lý mẫu. Ở Việt Nam có các nghiên cứu về định lượng riêng rutin [1], luteolin [2], trên thế giới cũng đã có rất nhiều nghiên cứu xác định đồng thời các flavonoid trong đó có rutin và luteolin với nhiều kỹ thuật phân tích khác nhau như: UPLC, UPLC-ESIMS/MS, [6], [7], HPLC-PDA [4], HPTLC [5], IL-PLE/HPLC [8]. Tác giả V. Patil và cộng sự (2015) đã nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng rutin và một số flavonoid bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng siêu hiệu năng (High-performance thin-layer chromatography, HPTLC) khá phức tạp và tốn thời gian, ngoài ra môi trường để tiến hành phân tích cũng phải kiểm soát tốt (nhiệt độ luôn duy trì ở $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $55\% \pm 5\%$ [6]. Vì vậy, nghiên cứu đã khảo sát và lựa chọn kỹ thuật HPLC đầu dò PDA là kỹ thuật phổ biến, thường quy, có độ chính xác cao để phân tích đồng thời rutin và luteolin với độ chính xác lặp lại ổn định.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng rutin và luteolin trong mẫu thực phẩm chức năng trà hòa tan chứa cao hoa hòe và cao hoa cúc bằng phương pháp

HPLC/PDA. Quy trình xử lý mẫu đơn giản với độ chọn lọc cao, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, đạt độ đúng và độ chính xác. Phương pháp đã thẩm định có thể ứng dụng định lượng đồng thời rutin và luteolin trong thực phẩm chức năng chứa cao hoa hòe và cao hoa cúc và các chế phẩm khác có chứa rutin, luteolin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thành Đạt, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2019), “Xác định hàm lượng rutin trong một số cao dược liệu hoa hòe được sử dụng làm nguyên liệu trong các chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp HPLC-UV”, *Tạp chí kiểm nghiệm và an toàn thực phẩm*, số 3, tr.51-55.
2. Lê Thị Thanh Thảo, Nguyễn Thị Thịnh, Lê Thị Loan, Trần Minh Ngọc (2017), “Xây dựng phương pháp định tính, định lượng luteolin trong vỏ quả của cây lạc bằng HPLC”, *Tạp chí dược liệu*, tập 22, số 2, tr.83-86.
3. AOAC International (2012), “Appendix K: Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals”, *AOAC Official Methods of Analysis*, pp.1-14.
4. Khuluk RH, Yunita A, Rohaeti E, Syafitri UD, Linda R, Lim LW, Takeuchi T, Rafi M (2021), "An HPLC-DAD Method to Quantify Flavonoids in *Sonchus arvensis* and Able to Classify the Plant Parts and Their Geographical Area through Principal Component Analysis", *Separations*, 8 (2), pp.12.
5. Marzanna Kurzawa *et al.* (2010), “Determination of quercetin and rutin in selected herbs and pharmaceutical preparations”, *Analytical Letters*, 43(6), pp.993-1002.
6. Patil V, Angadi S, Devdhe S, Wakte P (2015), “Recent progress in simultaneous estimation of rutin, quercetin and liquiritin in *Cocculus hirsutus* by HPTLC”, *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(4), pp.49-55.
7. Wang Y, Li S, Han D, Meng K, Wang M, Zhao C (2015), “Simultaneous Determination of Rutin, luteolin, quercetin and betulinic acid in the extract of *Disporopsis pernyi* (Hua) Diels by UPLC”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015,130873.
8. Wu H, Chen M, Fan Y, Elsebaei F, Zhu Y (2012), “Determination of rutin and quercetin in Chinese herbal medicine by ionic liquid-based pressurized liquid extraction-liquid chromatography-chemiluminescence detection”. *Talanta*, 88, 222-9.

(Ngày nhận bài: 16/8/2021 - Ngày duyệt đăng: 16/9/2021)
