

DOI: 10.58490/ctump.2024i80.2662

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÁC KỸ THUẬT SẮC KÝ TRONG PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CỦA RUTIN TỪ NỤ HOA HÒE (*Styphnolobium japonicum* (L.) Schott)

Trương Tuấn Đạt, Ngô Thanh Toàn, Kinh Thanh Huỳnh, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ*

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: dcmvtho@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 07/5/2024

Ngày phản biện: 22/8/2024

Ngày duyệt đăng: 25/9/2024

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Rutin có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng, chiếm hàm lượng rất cao trong nụ hoa Hòe. Hiện nay nguồn chất đối chiếu rutin chưa đáp ứng được nhu cầu của thị trường về nguồn cung, giá thành, đặc biệt là độ tinh khiết còn thấp, từ thực tiễn trên nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài. **Mục tiêu nghiên cứu:** Chiết xuất, tinh chế rutin từ nụ hoa Hòe và xác định độ tinh khiết của rutin phân lập được bằng kỹ thuật sắc ký. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Rutin được chiết xuất bằng phương pháp chiết hồi lưu và kết tinh ở pH phù hợp, được tinh chế làm sạch bằng cách hòa tan với các dung môi có độ phân cực khác nhau. Sản phẩm được định danh và xác định độ tinh khiết bằng các phương pháp phổ học hiện đại. **Kết quả:** Từ 50g nụ hoa Hòe khô đã kết tinh và tinh chế được 4,38 g rutin với độ tinh khiết cao. Rutin tinh chế có cùng R_f (0,47) trên sắc ký lớp mỏng và phổ UV-VIS tương đồng với chất chuẩn tại 2 cực đại hấp thụ đặc trưng 256 nm và 354 nm. Rutin tinh chế và chất chuẩn đều cho khối phổ với ion phân tử ban đầu là m/z 609,15 và bốn phân mảnh ion đặc trưng có m/z 151, 255, 271, 300. Quy trình xác định độ tinh khiết rutin bằng phương pháp HPLC/PDA được thẩm định đạt các yêu cầu theo ICH với kết quả đánh giá độ tinh khiết đạt 95,66%. **Kết luận:** Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất và tinh chế rutin trong nụ hoa Hòe bằng các phương pháp phổ học và sắc ký hiện đại với độ tinh khiết cao mà không cần qua sắc ký cột, mang lại hiệu quả học thuật và kinh tế cao góp phần làm giàu chất đối chiếu trong nâng cao chất lượng nguồn dược liệu và chế phẩm từ nụ hoa Hòe.

Từ khóa: Rutin, nụ hoa hòe, MS, HPLC-PDA.

ABSTRACT

RESEARCH AND APPLICATION OF CHROMATOGRAPHY TECHNIQUES TO ISOLATE AND DETERMINE THE PURITY OF RUTIN FROM *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott BUDS

Truong Tuan Dat, Ngo Thanh Toan, Kinh Thanh Huynh, Do Chau Minh Vinh Tho*

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Rutin is a flavonoid glycoside compound found in Hoa Hòe with a variety of important biological activities such as anti-oxidation, vascular protection, anti-cancer, cardiovascular protection and the demand for *Styphnolobium japonicum* buds in health care is more and more increasing. However, the current reference standard of rutin does not meet the market's demand in terms of supply, and price, especially purity. Based on the above reality, the research team decided to carry out the project "Research and application of chromatography techniques to isolate and determine the purity of rutin from *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott buds".

Objectives: To extract and purify rutin from buds and determine the purity of the isolated rutin using chromatography techniques. **Material and methods:** Rutin is extracted and crystallized at a suitable pH, then purified by dissolving with solvents of different polarity. The purified product was identified

and determined using spectroscopic methods and modern techniques of UV-VIS, mass spectrometry, and HPLC-PDA. **Results:** From 50 grams of dried *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott buds, 4.38 grams of high-purity rutin were crystallized and purified. Test results showed that X compound and the rutin standard had the same R_f (0.47) on thin-layer chromatography, with similar UV-VIS spectra at two specific absorption maxima λ_{max} 256 nm and 354 nm. Both the rutin standard and X compound produced mass spectra with a precursor ion of $m/z = 609.15$ Da and four characteristic fragment ions at $m/z = 151$; $m/z = 255$; $m/z = 271$; and $m/z = 300$. The procedure for determining the purity of rutin using HPLC/PDA method was validated to meet the requirements according to ICH, with the purity assessment result reaching 95.66%. **Conclusion:** The study established a procedure for extracting and purifying rutin from *Styphnolobium japonicum* (L.) Schott buds using modern spectroscopic and chromatographic methods with high purity, without the need for column chromatography. This approach provides significant academic and economic benefits, contributing to the enrichment of reference substances and the enhancement of the quality of raw materials and products derived from buds of Hoa Hoe.

Keywords: Rutin, *Styphnolobium japonicum*, MS, HPLC-PDA.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thực phẩm bảo vệ sức khỏe từ nụ hoa Hòe được sử dụng ngày càng gia tăng và phổ biến trong đời sống nên việc kiểm soát chất lượng nguyên liệu nụ hoa Hòe thông qua việc đánh giá hàm lượng thành phần chính rutin liên quan các tác dụng sinh học đã được chứng minh bằng các nghiên cứu được lý hiện đại là rất cấp thiết [1], [2]. Tuy nhiên nguồn cung cấp chất đối chiếu rutin ngoài nước thì giá thành cao và thời gian lâu, trong khi nguồn cung trong nước còn hạn chế do sự sẵn có không liên tục và độ tinh khiết thấp. Do đó nghiên cứu “Nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật sắc ký trong phân lập và xác định độ tinh khiết của rutin từ nụ hoa Hòe (*Styphnolobium japonicum* (L.) Schott)” được thực hiện với mục tiêu: Chiết xuất, tinh chế, định danh rutin từ nụ hoa Hòe và xác định độ tinh khiết của rutin tinh chế được bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, các phương pháp phổ hiện đại và kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA (HPLC-PDA).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Rutin được phân lập từ nụ hoa Hòe (*S. japonicum* (L.) Schott).

Hóa chất- thuốc thử: Chất chuẩn rutin được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh với độ tinh khiết 91,5%. Methanol (MeOH), acetonitril (ACN), acid formic đạt tiêu chuẩn phân tích sắc ký lỏng. Ethanol, chloroform, ethyl acetat, *n*-hexan, aceton được cung cấp bởi Chemsol đạt tiêu chuẩn dùng trong phòng thí nghiệm. Nụ hoa Hòe (*S. japonicum* (L.) Schott) được cung cấp bởi Liên bộ môn Hóa Phân Tích – Kiểm Nghiệm – Độc Chất, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

Trang thiết bị: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi L-2000, đầu dò DAD-L2455, cân phân tích ABT 220-5DM, bể siêu âm Wisc WUC-D22H, máy đo pH Consort C1020, máy Vortex VM-10 DAIHAN Scientific, máy ly tâm Hitech, máy khuấy từ IKAC-MAG HS 10.

Địa điểm nghiên cứu: Liên bộ môn Hóa Phân Tích – Kiểm Nghiệm – Độc Chất, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chiết xuất rutin trong nụ hoa Hòe

Từ 50g nụ hoa Hòe (độ ẩm 11,22%) được chiết hồi lưu với 100 mL ethanol 45% ở 90 °C trong 3 lần, gộp dịch chiết, cô quay chân không, thu được tủa, tủa này được rửa lần lượt với nước lạnh và ethanol 45% thu được tủa thô. *Phương pháp tinh chế thành phần X (dự đoán là rutin) trong nụ hoa Hòe*: Tủa thô sẽ được đun cách thủy ở 80°C với ethanol 96% cho tan hết và đặt vào tủ đông 15 phút rồi sau đó lại đun cách thủy ở 60 °C cho tủa tan ra hết, một số thành phần không tan có thể là tạp sẽ bị tủa khi bị thay đổi nhiệt độ đột ngột, sau đó tiếp tục lọc và thu lấy phần dịch và để nguội phần dịch, chất phân tích dần kết tinh do kém tan trong nước ở nhiệt độ phòng. Sau đó lọc qua phễu Buchner thu lấy tủa, rửa tủa lần lượt bằng nước lạnh, ethanol 45% lạnh và chloroform thu được chất X được tinh khiết hơn, tiến hành sấy ở 40 °C trong 24 giờ thu được 4,38 g chất X tinh khiết.

Sơ bộ kiểm tra độ tinh khiết X bằng sắc ký lớp mỏng: Hòa tan X vào methanol và triển khai sắc ký lớp mỏng (SKLM) với Silica gel 60 F₂₅₄ và hệ dung môi khai triển: (1) *n*-hexan – aceton – acid formic (20:80:0.5); (2) Ethyl acetat – methanol – nước – acid formic (100:17:13:1); (3) Chloroform – aceton – acid formic (17:16.5:8.5). Bản mỏng sau khi được khai triển sẽ được phát hiện lần lượt qua UV 254nm, UV 365nm và thuốc thử FeCl₃ 1% trong ethanol 96%. Sơ bộ đánh giá tinh khiết trên SKLM khi chỉ cho 1 vết trên đèn UV và thuốc thử ở 3 hệ dung môi trên.

Xác nhận chất kết tinh X thu được là rutin

Bằng cách so sánh X với chuẩn rutin trong SKLM (dựa trên giá trị R_f), HPLC/PDA (dựa trên thời gian lưu); phổ UV-VIS (tương đồng dạng phổ và các λ_{max}); phổ khối lượng ở chế độ daughters scan phải tìm thấy ion phân tử ban đầu và 3 phân mảnh ion đặc trưng cho cả X và rutin chuẩn.

Xây dựng và thẩm định quy trình xác độ tinh khiết của rutin phân lập

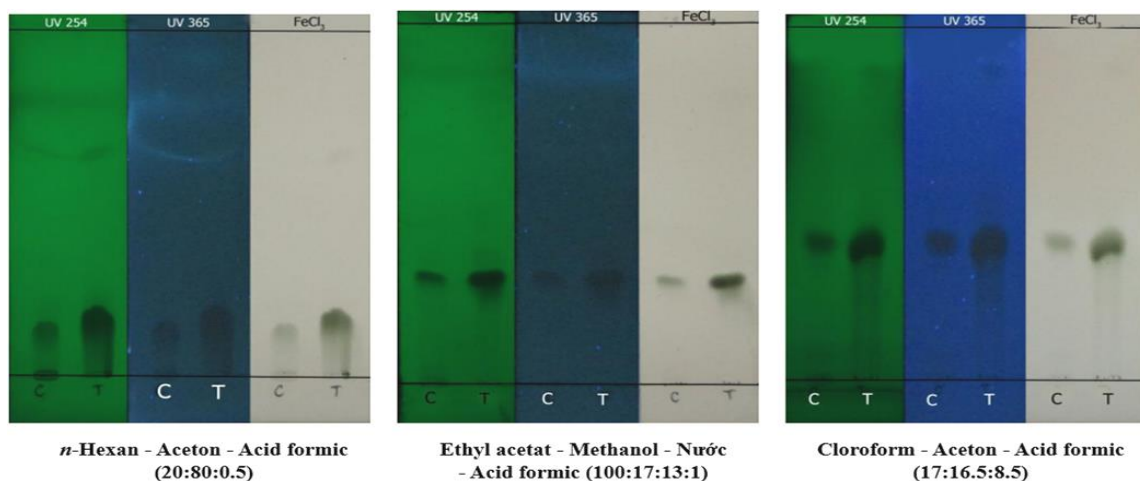
Dựa trên cấu trúc của rutin là chất phân cực và log P = -1,3 nên kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo đã được áp dụng với pha tĩnh Gemini C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm), nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng, thể tích tiêm mẫu: 20 μL. Các thông số bước sóng phát hiện, pha động, tốc độ dòng được khảo sát thực nghiệm để thẩm dò điều kiện sắc ký và chiết thích hợp. *Phương pháp Thẩm định quy trình định lượng*: Quy trình xác định độ tinh khiết rutin phân lập từ nụ hoa Hòe được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [3].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chiết xuất chất X từ nụ hoa Hòe

Bảng 1. Kết quả chiết xuất X từ nụ hoa Hòe.

Chỉ tiêu	Kết quả thực nghiệm
Độ ẩm dược liệu ban đầu (%)	11,22
Khối lượng dược liệu ban đầu (gam)	50
Khối lượng tủa X thô thu được (gam)	10,65
Màu sắc tủa X thô	Màu vàng lục
Hiệu suất (%)	21,28
Khối lượng rutin tinh chế thu được (gam)	4,38
Độ ẩm rutin sau tinh chế (%)	2,47
Hiệu suất chiết xuất và tinh chế rutin từ dược liệu (%)	9,53
Màu sắc chất X tinh khiết sau tinh chế	Vàng sáng nhạt



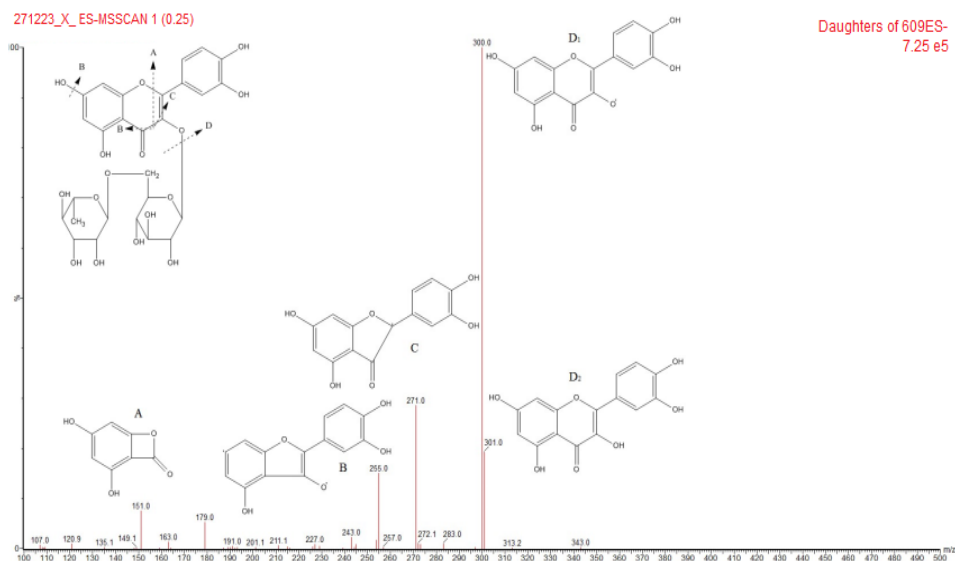
Hình 1. Sắc ký đồ kiểm tra độ tinh khiết rutin phân lập được
(C: Chất chuẩn rutin; T: Mẫu thử hợp chất X)

Nhận xét: Kết quả SKLM với 3 hệ dung môi cho thấy mẫu thử có một vết duy nhất có R_f tương đương với mẫu chuẩn ở bước sóng 254nm, 366 nm và thuốc thử.

3.2. Xác nhận chất kết tinh X thu được là rutin

So sánh X và rutin chuẩn trên SKLM: Bản mỏng được khai triển bằng hệ dung môi ethyl acetat - methanol - nước - acid formic (100:17:13:1) và được phát hiện lần lượt qua UV 254nm, UV 365nm và thuốc thử $FeCl_3$ 1% trong ethanol 96%. Kết quả cho thấy vết X và rutin chuẩn có cùng R_f là 0,47 trên đèn 254 nm, 365 nm và thuốc thử (Hình 1) [4].

So sánh phổ UV-VIS của X và rutin chuẩn: Kết quả thực nghiệm cho thấy tại pic chất X có thời gian lưu tương đương pic rutin chuẩn có phổ UV-VIS tương đồng phổ UV-VIS (dạng phổ và 2 cực đại hấp thu tại λ_{max} 256 nm và 354 nm đặc trưng cho phổ UV-Vis của rutin.



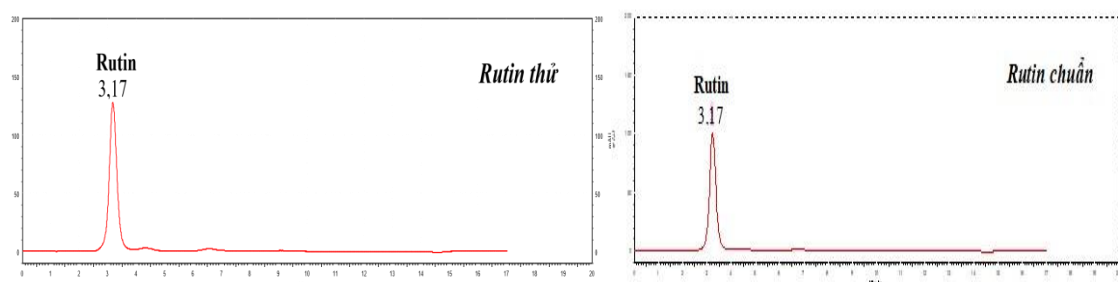
Hình 2. Kết quả biện giải chế độ Daughters scan MS ESI (-) của hợp chất X trùng khớp với cấu trúc của rutin.

Nhận xét: Qua các dữ kiện SKLM, phổ UV-VIS, phổ MS so sánh với chuẩn rutin đã đủ cơ sở khoa học để kết luận chất X phân lập từ nụ hoa Hòe là rutin.

So sánh phổ khối của X và rutin chuẩn: Mẫu dung dịch chuẩn rutin (khối lượng phân tử 610,15 Da) và chất X phân lập được bắn phá khối phổ lần 1 ở chế độ ion hóa ESI (-) và chọn lọc khối MS¹ fullscan và khối phổ lần 2 ở chế độ daughters scan. Kết quả cho thấy cả chuẩn rutin và X đều cho ion phân tử ban đầu là có $m/z = 609,15$ và bốn phân mảnh ion đặc trưng có $m/z = 151$; $m/z = 255$; $m/z = 271$; $m/z = 300$ (Hình 2).

3.3. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết rutin phân lập

Khảo sát điều kiện sắc ký thích hợp: Các yếu tố ảnh hưởng đến hình dạng và sự tách của các chất trong sắc ký lỏng pha đảo, bao gồm pha tĩnh; loại, tỉ lệ, pH pha động được; chương trình rửa giải, nhiệt độ cột đã được tiến hành thực nghiệm. Kết quả lựa chọn điều kiện sắc ký thích hợp như sau: Cột sắc ký Gemini C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) [5], pha động MeOH-H₃PO₄ 2,5 mM (50 : 50 v/v). Nhiệt độ cột 25°C. Bước sóng phát hiện: 356 nm, tốc độ dòng: 1,5 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.



Hình 3. SKĐ của mẫu rutin phân lập và rutin chuẩn

Thẩm định quy trình định lượng

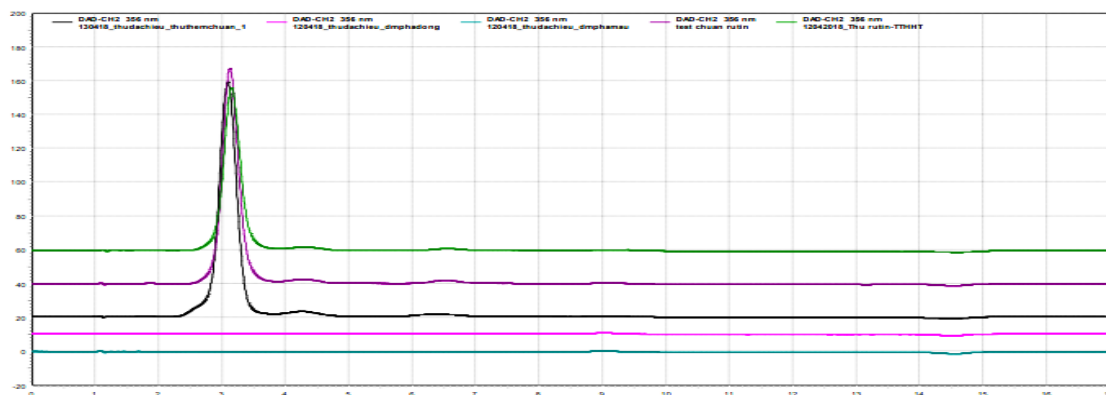
Tính tương thích hệ thống: Chuẩn bị ít nhất 06 mẫu thử rutin, tiêm 3 lần mỗi mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

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

Lần tiêm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh (mAu*s)	As	Rs	N
1	3,181	7437211,02	1,05	3,40	4070,05
2	3,177	7493607,80	1,05	3,37	4105,20
3	3,175	7563027,31	1,01	3,37	3904,59
4	3,168	7488372,23	1,05	3,32	4005,31
5	3,171	7495334,50	1,03	3,37	4119,09
6	3,173	7531149,89	1,02	3,37	4109,36
TB	3,174	7501450,46	1,04	3,37	4052,27
SD	0,01	42592,07	0,02	0,03	83,49
RSD	0,14%	0,57%	1,03%	0,77%	2,06%

Nhận xét: Các thông số sắc ký đều nằm trong giới hạn quy định với $R_s \geq 1,5$; $0,8 \leq A_s \leq 1,5$ và các giá trị RSD đều dưới 2%. Đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống.

Tính đặc hiệu: Kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ Overlay các mẫu dung môi pha mẫu, mẫu pha động, mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu thử thêm chuẩn của rutin.

Nhận xét: Sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu pha động và dung môi pha mẫu không xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với pic rutin của mẫu chuẩn. SKĐ của mẫu thử có pic rutin có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic rutin trong mẫu chuẩn, mẫu thử thêm chuẩn có sự tăng lên rõ rệt chiều cao và diện tích của các pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của các pic trong mẫu rutin chuẩn [6].

Tính tuyến tính: Tiến hành độ tuyến tính với dãy nồng độ mẫu 40, 80, 120, 160, 200 và 250 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả xây dựng đường tuyến tính rutin thu được phương trình tuyến tính $y = 73699x + 191038$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9945$ trong khoảng nồng độ từ 40 – 250 $\mu\text{g/mL}$.

Độ lặp lại: Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp.

Mẫu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh (mAu*s)
Mẫu 1	3,175	7597468,31
Mẫu 2	3,177	7630095,19
Mẫu 3	3,177	7719762,08
Mẫu 4	3,172	7763413,91
Mẫu 5	3,176	7531769,27
Mẫu 6	3,171	7410767,10
TB	3,175	7608879,31
SD	0,003	128023,95
RSD	0,081%	1,68%

Nhận xét: Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích đỉnh đều nhỏ hơn 2% và đạt yêu cầu theo hướng dẫn độ chính xác của ICH.

Xác định độ tinh khiết của rutin phân lập được từ nụ hoa Hòe

Tiến hành chuẩn bị 03 mẫu thử rutin theo quy trình phân tích đã thẩm định, tiến hành phân tích và ghi nhận kết quả % tinh khiết của rutin bằng cách quy về 100% diện tích pic, sử dụng chế độ Maxlot trên đầu dò dây diod quang (DAD) để tính toán. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Diện tích peak của rutin và các tạp có trong mẫu thử.

Mẫu	Rutin	Tạp 1	Tạp 2
Mẫu 1	7586842,98	212881,26	132667,04
Mẫu 2	7633741,69	211388,20	133481,91
Mẫu 3	7598441,10	211945,39	132445,12

Mẫu	Rutin	Tập 1	Tập 2
Trung bình	7606341,92 ± 24427,23	212071,62 ± 754,49	132864,69 ± 545,92
Tổng diện tích đỉnh	7951277,61		

$$\% \text{ tinh khiết rutin phân lập} = \frac{\text{Diện tích peak rutin}}{\text{Tổng diện tích các peak}} \times 100\% = \frac{7606341,92}{7951277,61} \times 100\% = 95,66\%.$$

IV. BÀN LUẬN

4.1. Chiết xuất chất X từ nụ hoa Hòe

Việc phân lập rutin từ nụ hoa Hòe được thực hiện không qua cột cô điển mà dựa vào sự kết tủa do hàm lượng hợp chất chiếm ưu thế và sự khác biệt độ tan trong các dung môi của rutin, dễ dàng tan trong dung môi có độ phân cực cao như nước nóng, ethanol. Sự lựa chọn dung môi ethanol 45% hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu [7], với sự có mặt của một lượng nước trong dung môi chiết làm tăng đáng kể độ phân cực của dung môi sẽ dễ dàng chiết được rutin với cấu trúc của rutin có hai gốc đường glucose và rhamnose, ngoài ra còn hạn chế các tạp rất phân cực gồm, pectin, chất nhầy đi vào. Việc đun hồi lưu cách thủy trong 1 giờ với nhiệt độ là 90°C làm tăng hiệu suất chiết, do nhiệt độ làm tăng sự di chuyển của hoạt chất vào lớp dung môi, làm tăng quá trình hòa tan, chiết xuất và tăng lượng rutin. Theo nghiên cứu về ngưỡng nhiệt độ làm phân hủy rutin thành quercetin, thì nhiệt độ 25-60°C sẽ làm tăng sự chuyển hóa rutin thành quercetin, còn khi ở nhiệt độ 80-95°C thì quá trình này không xảy ra do enzym phân hủy rutin bị phân hủy bởi nhiệt độ này [8].

4.2. Xác nhận chất kết tinh X thu được là rutin

Việc tinh chế tủa rutin thô là một thành công của nghiên cứu này. Dịch chiết ethanol 45% được cô quay chân không đến khi bay hơi hết ethanol, phần dịch nước đặt ở nhiệt độ lạnh 2-8°C trong 12 giờ cho rutin kết tinh do tính chất kém tan trong nước lạnh theo Chahyadi và cộng sự (2020) [9], đã kết tinh rutin trong dịch chiết sắc dây bằng phương pháp tủa rutin trong nước ở nhiệt độ 4°C.

4.3. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết rutin phân lập

Cấu trúc của hợp chất X được xác nhận bằng các phương pháp phổ nghiệm hiện đại cho thấy sự tương đồng về cấu trúc của hợp chất X và rutin. Phổ UV-VIS của hợp chất X có hình dạng phổ và các đỉnh hấp thụ cực đại trùng với chất chuẩn rutin. Ngoài ra phổ MS còn cho thấy sự trùng khớp về khối lượng ion phân tử ban đầu và 04 phân mảnh ion con đặc trưng, kết quả này trùng khớp thư viện khối phổ Châu Âu về rutin và kết quả nghiên cứu của He và các cộng sự [10].

Xác định độ tinh khiết của rutin với đầu dò dây diod quang mang đến một ưu điểm vượt trội khi đánh giá % tinh khiết pic ở chế độ xem toàn thang sóng nơi nào có hấp thụ đều được ghi nhận nên độ tinh khiết của rutin (95,66%) phân lập từ nụ hoa Hòe có độ tin cậy cao.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình chiết xuất và tinh chế rutin trong nụ hoa Hòe thành công mà không cần qua sắc ký cột, đồng thời xác nhận và đánh giá độ tinh khiết rutin phân lập bằng các phương pháp phổ học và sắc ký hiện đại, tin cậy (từ 50g nụ hoa Hòe khô đã thu được 4,38g rutin có độ tinh khiết cao 95,66%) nên mang lại hiệu quả học thuật và kinh tế cao đáp ứng mục tiêu góp phần làm giàu chất đối chiếu từ nguồn tự nhiên giúp nâng cao chất lượng nguồn dược liệu và chế phẩm từ nụ hoa Hòe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam V. Nhà xuất bản Y học. 2018. 1195-1196. Tập 2.
 2. Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. 2004. 298-299.
 3. Guideline, I. H. T. Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2 (R1), 1(20), 05. 2005.
 4. Bộ môn Dược liệu. Phương pháp nghiên cứu dược liệu. Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. 2020. 120-122.
 5. Kuntić, V., Pejić, N., Ivković, B., Vujić, Z., Ilić, et al. Isocratic RP-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2007. 43(2), 718-721, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.019>.
 6. Sampaio, P. A., Souza, G. R., da Silva Almeida, J. R. G., & Rolim, L. A. Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) method for the quantification of rutin and isoquercetin in *Morus nigra* L.(Moraceae). *African Journal of Biotechnology*. 2018. 17(34), 1048-1056, doi:10.5897/AJB2018.16588.
 7. He, X., Bai, Y., Zhao, Z., Wang, X., Fang, et al. Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016. 187, 160-182, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.014>.
 8. Germ, M., Árvay, J., Vollmannová, A., Tóth, T., Golob, et al. The temperature threshold for the transformation of rutin to quercetin in Tartary buckwheat dough. *Food chemistry*. 2019. 283, 28-31, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.038>.
 9. Chahyadi, A. The influence of extraction methods on rutin yield of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz). *Saudi pharmaceutical journal*. 2020. 28(11), 1466-1473, <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.09.012>.
 10. He, J., Feng, Y., Ouyang, H. Z., Yu, B., Chang, et al. A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013. 84, 189–195, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.019>.
-