

DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOIDS IN CONCENTRATED EXTRACT FROM AGERATUM CONYZOIDES AND SELECTED MEDICINAL PLANTS USING UV-VIS SPECTROSCOPY

Pham Ly Ha^{1*}, Nguyen Van Tuan¹, Pham Thi Tam², Ngo Mai Phuong³, Nguyen Thi Quynh Trang³

¹HaiDuong central college of Pharmacy - 324 Nguyen Luong Bang, Le Thanh Nghi Ward, Hai Phong City, Vietnam

²Thai Binh University of Medicine and Pharmacy - 373 Ly Bon, Tran Lam Ward, Hung Yen Province, Vietnam

³Hanoi University of Pharmacy - 13-15 Le Thanh Tong, Cua Nam Ward, Hanoi City, Vietnam

Received: 12/09/2025

Revised: 04/10/2025; Accepted: 09/10/2025

ABSTRACT

Objective: To develop and validate a method for quantifying total flavonoids in concentrated mixed herbal extracts, expressed as quercetin equivalents, by ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry.

Methods: The spectrophotometric method was based on the colorimetric reaction with AlCl₃ reagent. The quantification method was validated following AOAC guidelines.

Results: A method for determining total flavonoids in concentrated herbal extracts was developed and validated using UV-Vis spectroscopy, showing high accuracy with average recoveries ranging from 99.44-100.37%, RSD ≤ 2%, as well as acceptable precision, system suitability, and linearity. The total flavonoid content determined by the developed method was 3.04% (RSD = 0.7%) calculated as quercetin.

Conclusion: A reliable and validated method for quantifying total flavonoids in concentrated mixed herbal extracts, expressed as quercetin equivalents, using UV-Vis spectrophotometry was established.

Keywords: Total flavonoids, UV-Vis spectroscopy, Ageratum conyzoides, concentrated extract.

*Corresponding author

Email: Phamlyha@gmail.com Phone: (+84) 349647299 [Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3469](https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3469)

ĐỊNH LƯỢNG FLAVONOID TOÀN PHẦN TRONG CAO ĐẶC TỪ NGŨ SẮC VÀ MỘT SỐ DƯỢC LIỆU BẰNG QUANG PHỔ UV-VIS

Phạm Lý Hà^{1*}, Nguyễn Văn Tuấn¹, Phạm Thị Tâm², Ngô Mai Phương³, Nguyễn Thị Quỳnh Trang³

¹Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương - 324 Nguyễn Lương Bằng, P. Lê Thanh Nghị, Tp. Hải Phòng, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược Thái Bình - 373 Lý Bôn, P. Trần Lãm, Tỉnh Hưng Yên, Việt Nam

³Trường Đại học Dược Hà Nội - 13-15 Lê Thánh Tông, P. Cửa Nam, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận: 12/09/2025

Ngày sửa: 04/10/2025; Ngày đăng: 09/10/2025

ABSTRACT

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng flavonoid toàn phần có trong cao đặc tính theo quercetin bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (UV-Vis).

Phương pháp: Phương pháp đo quang phổ dựa trên phản ứng tạo màu với thuốc thử AlCl₃, thẩm định phương pháp định lượng theo hướng dẫn của AOAC.

Kết quả: Xây dựng phương pháp định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc phù hợp với hệ thống quang phổ UV-Vis có độ đúng cao với tỷ lệ thu hồi trung bình từ 99,44-100,37%, RSD ≤ 2%, độ chính xác, độ phù hợp hệ thống, khoảng tuyến tính đạt yêu cầu. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc được xác định bằng phương pháp đã xây dựng là 3,04% (RSD = 0,7%) tính theo quercetin.

Kết luận: Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng flavonoid toàn phần có trong cao đặc tính theo quercetin bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến.

Từ khóa: Flavonoid toàn phần, quang phổ UV-Vis, Ngũ sắc, cao đặc.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổng quan các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của các dược liệu Ngũ sắc, Kim ngân hoa, Cỏ nhọ nồi, Bạch chỉ và Tế tân cho thấy có nhiều nhóm chất có tác dụng điều trị viêm mũi xoang [1-3], trong đó có thể kể đến flavonoid với tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa [4-5]. Trên cơ sở kế thừa kinh nghiệm dân gian, khảo sát sơ bộ cho thấy bài thuốc kết hợp 5 vị dược liệu kể trên có khả năng hỗ trợ làm giảm triệu chứng khi bị viêm mũi xoang, nghẹt mũi khi thay đổi thời tiết. Bên cạnh đó, chưa có nghiên cứu nào về định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc của bài thuốc nêu trên. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng flavonoid toàn phần có trong cao đặc tính theo quercetin bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (UV-Vis).

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cao đặc sử dụng trong nghiên cứu được chiết xuất từ 5 vị dược liệu bao gồm Ngũ sắc, Kim ngân hoa, Cỏ nhọ nồi, Bạch chỉ, Tế tân (cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược liệu Indochina) được phối trộn theo đúng tỷ lệ bài thuốc (Ngũ sắc: Kim ngân hoa: Cỏ nhọ nồi: Bạch chỉ: Tế tân = 8:5:2:3:2); sau đó thực hiện quy trình như sau: cân khoảng 200g dược liệu theo tỷ lệ, tiến hành xác định độ ẩm của hỗn hợp dược liệu, cắt nhô 1-3 cm, thêm 1,2 lít ethanol 70%, ngâm ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, lọc thu dịch chiết, tiếp tục bổ sung dung môi tiến hành chiết lần 2 tương tự, gộp dịch chiết, lọc, cô châm không áp suất giảm ở nhiệt độ 50°C đến khi chất lỏng sánh thu được cao lỏng. Cố cao lỏng ở 50°C đến khi độ ẩm dưới 20% thu được cao đặc.

- Hóa chất, chất chuẩn: quercetin (hàm lượng 83,2%, SKS: EC0423322, được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương), ethanol 96%, AlCl₃.6H₂O, nước cất và các dung môi khác đạt tiêu

*Tác giả liên hệ

Email: Phamlyha@gmail.com Điện thoại: (+84) 349647299 [Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3469](https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD18.3469)



chuẩn tinh khiết phân tích.

- Thiết bị, dụng cụ: máy quang phổ tử ngoại khả kiến kết nối máy tính Thermo Evolution 60S (Nhật Bản), tủ sấy Memmert (Đức), bể điều nhiệt Wise Bath-Daihan (Hàn Quốc), bể siêu âm S100 Elmasonic (Đức) và các dụng cụ cơ bản khác đáp ứng yêu cầu thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng phương pháp định lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến

Xây dựng phương pháp định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (Phụ lục 4.1 Dược điển Việt Nam V) [6].

2.2.1.1. Chuẩn bị các dung dịch gốc

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc: cân chính xác khoảng 0,0120g chuẩn quercetin vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 70% thu được dung dịch A. Hút chính xác 2,5 ml dung dịch A vào bình định mức 25 ml, định mức tới vạch bằng ethanol 70% thu được dung dịch B. Nồng độ dung dịch chuẩn gốc được xác định bằng công thức:

$$C = \frac{m}{V} \times P \times (1-H\%) \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Trong đó: m là khối lượng chuẩn đã cân (μg); V là thể tích dung dịch chuẩn (ml); P là độ tinh khiết của chất chuẩn; H là hàm ẩm của chất chuẩn.

- Chuẩn bị dung dịch thử gốc: cân chính xác khoảng 0,1000g cao đặc siêu âm với 15 ml ethanol 70% trong 15 phút. Dịch hòa tan định mức vào bình định mức 25 ml thu được dung dịch C.

2.2.1.2. Khảo sát các điều kiện đo quang

Tiến hành khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại, khảo sát nồng độ thuốc thử (AlCl_3 , 1%, 2%, 5%, 7%, 10%), khảo sát thời gian phản ứng (5 phút, 10 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút).

2.2.1.3. Tiến hành định lượng flavonoid toàn phần

- Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn: từ dung dịch chuẩn gốc ban đầu, tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn và tiến hành phản ứng theo điều kiện đã khảo sát.

- Chuẩn bị dung dịch thử: hút chính xác 1,5 ml dung dịch thử gốc (dung dịch C) vào bình định mức 10 ml và tiến hành phản ứng với AlCl_3 .

Tiến hành đo quang của dãy dung dịch chuẩn và dung dịch thử so với mẫu trắng pha tương tự.

- Tính toán kết quả: xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính biểu diễn mối tương quan giữa độ hấp thụ của dãy dung dịch chuẩn với nồng độ quercetin: $y = ax + b$ với hệ số tương quan $R \geq 0,995$.

Nồng độ flavonoid toàn phần trong mẫu cao được xác định theo quercetin từ nồng độ tính toán được thông qua đường chuẩn. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc được tính như sau:

$$HL = \frac{C \times V \times K}{m \times (1-H\%)} \times 100$$

Trong đó: HL là hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc (%); C là nồng độ flavonoid toàn phần ($\mu\text{g}/\text{ml}$) suy ra từ đường chuẩn; K là độ pha loãng; V là thể tích mẫu thử (ml); m là khối lượng cao đặc mẫu thử (μg); H\% là hàm ẩm cao đặc.

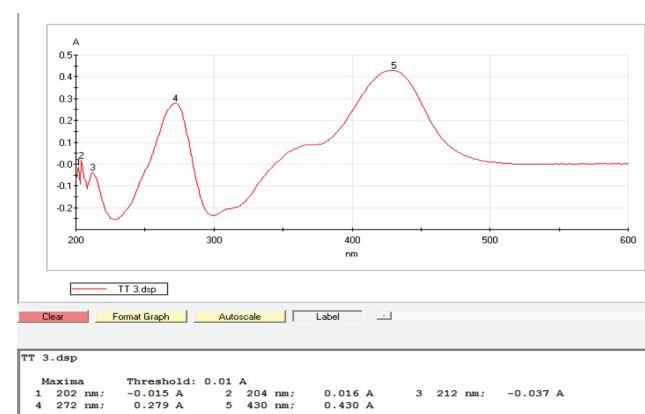
2.2.2. Thẩm định phương pháp định lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến

Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC [7] về độ phù hợp hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

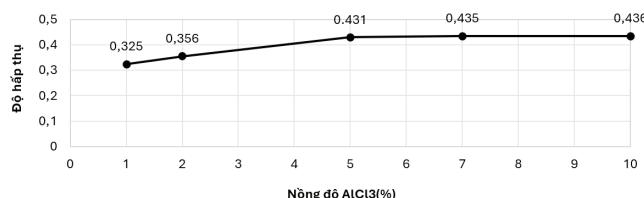
3.1. Xây dựng phương pháp

Kết quả xác định bước sóng cực đại, nồng độ thuốc thử và thời gian phản ứng như các hình 1, 2, 3 dưới đây.



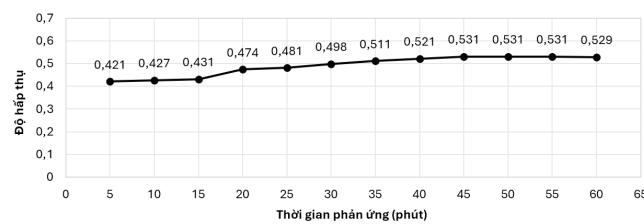
Hình 1. Kết quả khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại

Theo hình 1, bước sóng 430 nm được chọn để tiến hành đo độ hấp thụ các dung dịch, do độ hấp thụ của dung dịch tại 430 nm là lớn nhất và đây cũng là bước sóng nằm trong vùng khả kiến đặc trưng của phức Al (III) - flavonoid màu vàng tạo thành từ phản ứng.



Hình 2. Kết quả khảo sát nồng độ thuốc thử AlCl₃

Kết quả từ hình 2 cho thấy độ hấp thụ của dung dịch thử quercetin tăng dần khi tăng nồng độ thuốc thử AlCl₃. Tuy nhiên, từ khi nồng độ AlCl₃ đạt 5%, độ hấp thụ tăng không đáng kể khi tăng nồng độ AlCl₃. Do vậy, để tối ưu phản ứng và tiết kiệm hóa chất, chúng tôi lựa chọn nồng độ AlCl₃ là 5%.



Hình 3. Kết quả khảo sát thời gian phản ứng tạo phức màu

Kết quả cho thấy độ hấp thụ tăng dần khi tăng dần thời gian phản ứng đến 45 phút, sau đó thay đổi không đáng kể khi thời gian tăng dần đến 60 phút. Do vậy, để đảm bảo đủ thời gian cho AlCl₃ 5% tạo phức hết với các flavonoid và ổn định khi đo độ hấp thụ, lựa chọn thời gian phản ứng tạo phức màu với AlCl₃ 5% là 45 phút.

3.2.3. Độ chính xác

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian

| Ngày 1. Khối lượng cân chuẩn: 0,0129g y = 0,0369x + 0,009 | | | Ngày 2. Khối lượng cân chuẩn: 0,0125g y = 0,0371x + 0,0066 | | |
|--|------------|-----------------------------------|---|------------|-----------------------------------|
| Khối lượng cao (g) | Độ hấp thụ | Hàm lượng flavonoid toàn phần (%) | Khối lượng cao (g) | Độ hấp thụ | Hàm lượng flavonoid toàn phần (%) |
| 0,1019 | 0,390 | 3,02 | 0,1025 | 0,398 | 3,06 |
| 0,1027 | 0,395 | 3,03 | 0,1021 | 0,394 | 3,04 |
| 0,1012 | 0,389 | 3,03 | 0,1009 | 0,389 | 3,04 |
| 0,1035 | 0,403 | 3,07 | 0,1032 | 0,402 | 3,07 |
| 0,1005 | 0,385 | 3,02 | 0,1011 | 0,390 | 3,04 |

3.2. Thẩm định phương pháp

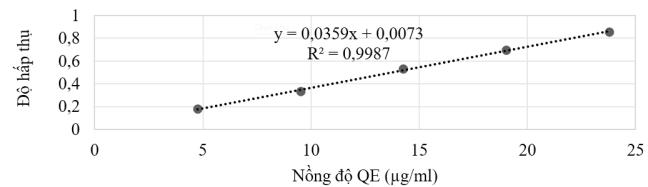
3.2.1. Độ phù hợp hệ thống

Bảng 1. Kết quả thẩm định độ phù hợp hệ thống của phương pháp

| Mẫu | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Độ hấp thụ (A) | 0,531 | 0,544 | 0,537 | 0,526 | 0,551 | 0,539 |
| Trung bình (A) | 0,538 | | | | | |
| Độ lệch chuẩn (SD): | 0,009 | | | | | |
| Độ lệch chuẩn tương đối (RSD): | 1,663% | | | | | |

Kết quả cho thấy RSD = 1,663% đạt giới hạn yêu cầu (RSD ≤ 2%). Như vậy, phương pháp định lượng flavonoid toàn phần đảm bảo yêu cầu về độ phù hợp hệ thống.

3.2.2. Khoảng tuyến tính



Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ quercetin

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 4,75-23,77 μg/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ (C) và độ hấp thụ của dung dịch quercetin (A) theo phương trình A = 0,0359.C + 0,0073 với hệ số tương quan R = 0,9993 ($\geq 0,995$) và tỷ lệ hệ số chẵn Y = 1,37% (-2,0% \leq Y% \leq 2,0%) đạt yêu cầu.

| Ngày 1. Khối lượng cân chuẩn: 0,0129g $y = 0,0369x + 0,009$ | | | Ngày 2. Khối lượng cân chuẩn: 0,0125g $y = 0,0371x + 0,0066$ | | |
|--|------------|-----------------------------------|---|------------|-----------------------------------|
| Khối lượng cao (g) | Độ hấp thụ | Hàm lượng flavonoid toàn phần (%) | Khối lượng cao (g) | Độ hấp thụ | Hàm lượng flavonoid toàn phần (%) |
| 0,1018 | 0,389 | 3,01 | 0,1019 | 0,391 | 3,03 |
| Trung bình (n = 6) | | 3,03 | Trung bình (n = 6) | | 3,05 |
| RSDr (%) | | 0,72 | RSDr (%) | | 0,56 |
| Trung bình (n = 12) | | | 3,04 | | |
| RSDR (%) | | | 0,70 | | |

Kết quả cho thấy giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSDr mỗi ngày và độ lệch chuẩn RSDR của cả hai ngày đều đạt giới hạn yêu cầu ($RSDr \leq 2\%$; $RSDR \leq 4\%$). Như vậy phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác.

3.2.4. Độ đúng

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng

| Tỷ lệ chuẩn thêm vào | | | | |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|------------|---------|
| Lượng chuẩn thêm vào (mg) | Lượng chuẩn tìm thấy (mg) | Tỷ lệ thu hồi (%) | Trung bình | RSD (%) |
| 80% | | | | |
| 2,4 | 2,36 | 98,33 | 99,44 | 1,05 |
| | 2,39 | 99,58 | | |
| | 2,41 | 100,42 | | |
| 100% | | | | |
| 3 | 3,03 | 101,00 | 99,78 | 1,07 |
| | 2,98 | 99,33 | | |
| | 2,97 | 99,00 | | |
| 120% | | | | |
| 3,6 | 3,58 | 99,44 | 100,37 | 0,97 |
| | 3,61 | 100,28 | | |
| | 3,65 | 101,39 | | |

Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi trung bình đạt giới hạn yêu cầu (nằm trong khoảng 95-102%), $RSD \leq 2\%$. Như vậy, phương pháp đảm bảo yêu cầu về độ đúng.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu lựa chọn phương pháp quang phổ UV-Vis để định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc do tính đơn giản, chi phí thấp và độ tin cậy cao, đã được nhiều nghiên cứu ứng dụng [8-9]. Thực tế với

cao đặc sử dụng, phản ứng tạo màu với $AlCl_3$ cho kết quả hấp thụ ổn định và phù hợp hơn so với khi dùng thêm $NaNO_2$ trong môi trường kiềm. Nhóm nghiên cứu đã khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại, nồng độ và thời gian phản ứng với $AlCl_3$ để xây dựng phương pháp định lượng. Phương pháp sau đó được thẩm định theo hướng dẫn AOAC [7] và đáp ứng các tiêu chí về tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, phù hợp với các nghiên cứu trước [8], [10]. Do vậy, phương pháp được đánh giá là phù hợp và đáng tin cậy cho định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng flavonoid toàn phần tính theo quercetin trong cao đặc từ cây Ngũ sắc và một số dược liệu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2006, trang 75-601.
- [2] Viện Dược liệu. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2006, trang 127-377.
- [3] Lê Thị Diễm Hồng, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Thanh Loan, Đỗ Hồng Ngọc. Nghiên cứu tác dụng chống viêm của hoa cây Kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb. Caprifoliaceae) kết hợp với Núc nác (*Oroxylum indicum* Vent. Bignoniaceae). VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, 2020, 36 (2): 25-32.
- [4] Trần Công Khánh và cộng sự. Cẩm nang sử dụng và phát triển cây thuốc ở Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2010, trang 221-222.
- [5] Yang Z.Z, Yu Y.T. *Lonicera japonica* extends lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 129: 310-22.



- [6] Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam V, tập 2. Nhà xuất bản Y học, 2017, trang 1070, PL-311.
- [7] AOAC. Official Methods of Analysis. Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2019.
- [8] Nguyễn Khánh Thùy Linh, Nguyễn Thị Ngọc Trâm. Xây dựng phương pháp định lượng flavonid toàn phần trong dịch chiết lá vối (*Cleistocalyx operculatus*) bằng quang phổ UV-VIS. Tạp chí Y Dược học Quân sự, 2022, 4: 7-16.
- [9] Phùng Thanh Long, Phan Thị Mai. Xây dựng quy trình chiết xuất cao giàu flavonoid từ Kim ngân. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Hòa Bình, 2023, 10: 139-43.
- [10] Nguyễn Văn Phương. Nghiên cứu chiết xuất cao đặc giàu flavonoid từ hạt cây cần tây (*Apium graveolens L.*). Luận văn thạc sĩ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội, 2019.

