

isolated from *Kaempferia parviflora*, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 717-721. 8. Tewtrakul S., Subhadhirasakul S., Kummee S. (2008), Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 191-193. 9. Banjerpongchai R., Suwannachot K., Rattanapanone V., Sripandikulchai B. (2008), Ethanolic rhizome extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker induces apoptosis in HL-60 cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9, 595-600. 10. Rujjanawate C., Kanjanapothi D., Amornlerdpison D., Pojanagaroon S. (2005), Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*, *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 120-122. 11. Tepareenan P., Sawasdee P., Randall M. (2010), Possible mechanisms of vasorelaxation for 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta, *Phytotherapy Research*, 24, 1520-1525. 12. Azuma T., Tanaka Y., Kikuzaki H. (2008), Phenolic glycosides from *Kaempferia parviflora*, *Phytochemistry*, 69, 2743-2748. 13. Ninomiya K., Matsumoto T., Chaipetch S., Miyake S., Katsuyama Y., Tsuboyama A., Pongpiriyadacha Y., Hayakawa T., Muraoka O., Morikawa T. (2015), Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*, *Journal of Natural Medicines*, 70(2), 179-189. 14. Jothamongkhon J., Susantikarn P., Kongkachana W., Ketngamkum Y., Batthong S., Jomchai N., Yingyong P., Asawapirom U., Tangphatsornruang S., Paemanee A., Pongpamorn P. (2022), Quantitative analysis of methoxyflavones discriminates between the two types of *Kaempferia parviflora*, *Phytochemical Analysis*, 33, 670-677. 15. ICH (2018), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2R1. 16. AOAC (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F.

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 5/2023 (Trang 292 - 298)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI RUTIN VÀ QUERCETIN-7-O-GLUCOSID TRONG TRÀ HOA VÀNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP UV-VIS KẾT HỢP MẠNG NƠI RON NHÂN TẠO (ANN)

Phạm Thị Hiền¹, Tạ Thị Thảo², Nguyễn Thị Hằng¹, Đỗ Thị Hà¹, Bùi Thị Bình³, Nguyễn Thị Hà Ly^{1,*}

¹Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu;

²Khoa Hóa học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội;

³Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Bình

*Email: nguyenthihaly.chem@gmail.com

(Nhận bài ngày 01 tháng 3 năm 2023)

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng một phương pháp phân tích định lượng đồng thời rutin và quercetin 7-O-glucosid trong trà hoa vàng dựa trên dữ liệu phổ UV-VIS trong khoảng từ 250-400 nm. Mẫu trà hoa vàng được chiết bằng hỗn hợp dung môi methanol/nước (50/50, v/v), sau đó phân tích dữ liệu phổ UV-VIS và kết hợp phương pháp mạng nơ ron nhân tạo (ANN). Sau khi tối ưu hóa và lựa chọn được mô hình ANN phù hợp, với 2 lớp ẩn và 20 neuron trong mỗi lớp ẩn, các giá trị R^2 thu được đều lớn hơn 0,99. Phương pháp UV-VIS/ANN đề xuất được áp dụng để phân tích hàm lượng rutin và quercetin 7-O-glucosid trong 10 mẫu trà hoa vàng. Kết quả thu được tương đồng với kết quả phân tích hàm lượng rutin và quercetin 7-O-glucosid bằng phương pháp đối chiếu HPLC-DAD. Phương pháp UV-VIS/ANN với các ưu điểm nhanh, đơn giản, độ chính xác cao, phù hợp để áp dụng cho phân tích định lượng đồng thời rutin và quercetin 7-O-glucosid trong mẫu trà hoa vàng.

Từ khóa: Trà hoa vàng, UV-VIS/ANN, Flavonoid, HPLC.

Summary

Simultaneous Quantification of Rutin and Quercetin-7-O-Glucoside in *Camellia* sp. by UV-VIS Spectrophotometry and Artificial Neuronal Networks (ANN)

A simple method for the simultaneous determination of rutin and quercetin 7-O-glucoside contents in *Camellia* sp. was reported. The method was based on the use of UV-VIS absorption in the range of 250-400 nm. *Camellia* sp. samples were extracted with methanol/water (50/50, v/v); then the solutions were analyzed by spectroscopy combined artificial neuronal networks (ANN) method. After calibration, the ANN model with two hidden layers and 20 neurons in the hidden layer had high accuracy with correlation coefficients (R^2) > 0.99. The UV-VIS/ANN proposed model was applied to analyze rutin and quercetin 7-O-glucoside contents in 10 samples of *Camellia* sp. The results are similar in comparison to those obtained employing the reference method (HPLC-DAD). The proposed (UV-VIS/ANN) method is rapid, simple, and highly accurate and it facilitates simultaneous determination of rutin and quercetin 7-O-glucoside contents in *Camellia* sp.

Keywords: *Camellia* sp., UV-VIS/ANN, Flavonoid, HPLC.

1. Đặt vấn đề

Trà hoa vàng (Yellow *Camellia*) là tên gọi chung cho các loài có hoa màu vàng, thuộc chi Trà (*Camellia* L.), họ Chè (Theaceae). Trên thế giới, chi này có khoảng 120 loài, riêng ở Trung Quốc có 79 loài [1]. Ở Việt Nam, chi *Camellia* L. có 45 loài, trong đó có nhiều loài được công bố là loài mới cho khoa học và đặc hữu của Việt Nam [2]. Riêng ở VQG Tam Đảo đã phát hiện thấy 7 loài, nơi đây được coi là vùng tập trung nhiều loài trà hoa vàng ở nước ta [3]. Việc sử dụng các

loài trà hoa vàng làm thuốc ở Việt Nam, về cơ bản mới dừng ở vốn kinh nghiệm của người dân, với công dụng kích thích tiêu hóa (lá nấu nước uống như nước Chè), chữa lỵ (rễ)... Năm 2016, nhóm tác giả [4] đã thử tác dụng gây độc tế bào trên *in vitro* dịch chiết methanol trà hoa vàng *C. chrysanthoides* thu hái tại Ba Trẽ, Quảng Ninh. Kết quả cho thấy mẫu trà hoa vàng nghiên cứu có tác dụng ức chế trung bình với tế bào ung thư gan (Hep-G2), ung thư vú (MDA-BA-231) và ung thư trực tràng (SW 480), tác dụng thấp trên dòng

tế bào ung thư da (SK-Mel 2) và ung thư phổi (LU-1), tác dụng chống oxy hóa yếu trên mô hình dạn gốc tự do DPPH.

Về thành phần hóa học, trà hoa vàng chứa các nhóm chất có lợi cho sức khỏe như flavonoid, saponin, polyphenol, amino acid và các nguyên tố vi lượng như Selen (Se), Gecmani (Ge), Kẽm (Zn), Vanadi (V), Molybden (Mo), Mangan (Mn), Kali (K) và các vitamin B1, B2, C, E [5]. Một số flavonoid đã được phân lập từ lá và hoa trà hoa vàng như: quercetin 7-*O*-glucosid, vitexin, rutin, quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranosid, quercetin 3'-*O*- β -D-glucopyranosid [5],[6]. Cho đến nay, có nhiều nghiên cứu về phân tích, đánh giá hàm lượng một số thành phần flavonoid trong trà hoa vàng bằng phương pháp HPLC [7],[8], phương pháp này có ưu điểm là độ chính xác cao và có thể áp dụng rộng rãi ở các phòng thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển một phương pháp mới sử dụng kỹ thuật UV-VIS kết hợp mô hình toán học mạng nơtron nhân tạo (ANN) [11],[12] để xác định đồng thời rutin và quercetin 7-*O*-glucosid trong một số mẫu trà hoa vàng thu ở Việt Nam.

2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu dùng cho nghiên cứu là các mẫu hoa của cây trà hoa vàng, gồm tổng số 10 mẫu, ký hiệu từ M1 đến M10. Trong đó, mẫu M1 là mẫu trà hoa vàng được thu tại Ba Chẽ, Quảng Ninh, được xác định tên khoa học là *Camellia euphlebia* bởi Trung tâm Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu. Các mẫu còn lại (M2-M10) là các mẫu trà hoa vàng được thu mua trên thị trường (*Camellia sp.*). Mẫu M1 được dùng cho nghiên cứu thẩm định phương pháp bằng HPLC-DAD.

2.2. Chất chuẩn, hóa chất

Các chất chuẩn dùng trong nghiên cứu gồm: rutin (viết tắt: **Ru**, CAS: 153-18-4, số Lot: CFS202202, độ tinh khiết 98,0%) và quercetin 7-*O*-glucosid (viết tắt: **Qu**, CAS: 491-50-9, số Lot: CFS202201, độ tinh khiết 98,0%) được cung cấp bởi hãng Chemfaces (Trung Quốc).

Các hóa chất dùng cho phân tích HPLC và UV-VIS của hãng Merck; dung môi dùng để chiết xuất mẫu đều đạt yêu cầu hóa chất tinh khiết phân tích (P.A.); nước cất hai lần đã qua hệ thống deion.

2.3. Thiết bị, máy móc

Một số thiết bị chính dùng trong nghiên cứu bao gồm: hệ thống quang phổ hấp thụ phân tử UV - Vis 1800 PC - Shimadzu (Nhật Bản) (Số seri A114549), dải bước sóng đo 200-800 nm, cuvet thạch anh có chiều dày 1cm; Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC của hãng Shimadzu (Nhật Bản) gồm

bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, phần mềm Labsolution.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Chuẩn bị mẫu:

Chuẩn bị mẫu thử: cân chính xác khoảng 0,5 g bột mẫu trà hoa vàng cho vào bình cầu dung tích 100ml, sau đó thêm 25 ml MeOH 50%. Đun hồi lưu trong 30 phút. Làm nguội đến nhiệt độ phòng, lọc gạn lấy dịch chiết, thêm 20ml MeOH 50% vào bã được liệu, chiết hồi lưu tiếp trong 30 phút, sau đó để nguội, lọc gạn lấy dịch chiết, gộp toàn bộ dịch chiết và lọc qua giấy lọc vào bình định mức 50 ml, bổ sung đến vạch mức bằng MeOH 50% thu được dung dịch mẫu thử.

Chuẩn bị mẫu chuẩn Ru (hoặc Qu) nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$: cân chính xác 5 mg chất chuẩn Ru (hoặc Qu), chuyển vào bình định mức 5 ml, hòa tan bằng MeOH 50% sau đó định mức đến vạch mức bằng MeOH 50%. Các dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4°C trong lọ thủy tinh sẫm màu và dùng trong vòng một tháng. Từ dung dịch chuẩn Ru (hoặc Qu) nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$, tiến hành pha loãng bằng MeOH 50% với các tỷ lệ pha loãng khác nhau, thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ nhỏ hơn dùng cho nghiên cứu.

2.4.2. Phương pháp HPLC-DAD dùng làm phương pháp đối chiếu:

Điều kiện phân tích sắc ký HPLC-DAD: Cột C_{18} (5 μm , 250 mm x 4,6 mm); Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; Detector: DAD, 254 nm; Nhiệt độ lò cột: 40°C; Pha động gồm acetonitril và nước (0-10 phút: 38%ACN; 10-30 phút: 38-45%ACN; 30-32 phút: 45-95%ACN; 32-44 phút: 95-38%ACN; 44-52 phút: 38%ACN).

Thẩm định phương pháp phân tích: Quá trình thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo hướng dẫn của ICH (và tham chiếu theo qui định của AOAC), bao gồm các đánh giá: độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống, đường chuẩn, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày, hiệu suất thu hồi [9],[10].

2.4.3. Phương pháp UV-VIS/ANN:

Nghiên cứu phương pháp UV-VIS/ANN định lượng đồng thời rutin và quercetin-7-*O*-glucosid trong mẫu trà hoa vàng được thực hiện theo các bước như sau [11],[12]:

Bước 1: Chuẩn bị các dung dịch mẫu thử của 10 mẫu trà hoa vàng theo qui trình trong mục

2.4.1. Chuẩn bị các mẫu thêm chuẩn trên nền 3 mẫu thực (M1, M5, M9), mỗi mẫu sẽ được thêm chuẩn Ru và Qu với nồng độ Ru thêm chuẩn từ 0 đến 1,31 $\mu\text{g/ml}$ và nồng độ Qu thêm chuẩn từ 0,96 đến 2,16 $\mu\text{g/ml}$. Tổng số dung dịch sau khi thêm chuẩn là 85 dung dịch.

Bước 2: Khảo sát tìm ma trận cơ sở dữ liệu cho phương pháp UV-VIS/ANN: lựa chọn mô hình phù hợp; khảo sát các thông số mạng ANN (số neuron trong 1 lớp và số lớp ẩn).

Bước 3: Xây dựng ma trận tín hiệu thêm chuẩn trên 85 dung dịch đã chuẩn bị ở bước 1 bằng cách đo phổ UV-Vis của các dung dịch trong khoảng bước sóng từ 250 - 400 nm, khoảng cách đo 1 nm để thu được ma trận tín hiệu độ hấp

thụ quang có kích thước **85x151** (với 85 dung dịch thêm chuẩn và 151 bước sóng). Từ ma trận thêm chuẩn này, chia ngẫu nhiên thành 2 tập con, trong đó 80% dùng để luyện mô hình và 20% để kiểm tra mô hình.

Bước 4: Xây dựng mô hình ANN dựa trên ma trận tín hiệu thêm chuẩn trên phần mềm Matlab theo câu lệnh sau:

```
net = fitnet([n1 n2...], 'trainFcn');
net.trainParam.goal=0.0000000001;
net.trainParam.epochs = 3000;
net.trainParam.max_fail=10;
net.divideParam.trainRatio = 80/100;
net.divideParam.valRatio = 10/100;
net.divideParam.testRatio = 10/100;
net = train(net, Alearn', Clearn');
%Với Alearn và Clearn lần lượt là các ma trận tín hiệu mà ma trận nồng độ luyện
```

```
%Khai báo sai số tối thiểu
%Khai báo số bước học tối đa
%Khai báo số bước overfit chấp nhận
%Chia dữ liệu thành 3 phần

%Luyện mạng
```

Bước 5: Kiểm tra độ chính xác của mô hình với 10 mẫu Trà hoa vàng đã biết trước hàm lượng các chất (bằng phương pháp HPLC), tính sai số của mô hình thông qua đại lượng RMSE (căn bậc hai sai số toàn phương trung bình) và hệ số R (hệ số tương quan).

2.4.4. Công thức tính kết quả:

Hàm lượng Ru và Qu trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{C \times 50 \times 100 \times 100}{M \times 10^6 \times (100 - B)}$$

Trong đó: X (%) là hàm lượng của chất định phân tương ứng; C là nồng độ của chất định phân có trong dung dịch mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$) tính từ phương trình đường chuẩn (đối với phương pháp HPLC) và tính được từ mô hình UV-VIS/ANN (đối với phương pháp UV-VIS/ANN); m là khối lượng mẫu thử (g); B là độ ẩm của mẫu thử (%);

Độ lệch giữa hai phương pháp HPLC-DAD (a) và UV-VIS/ANN (b) được tính theo công thức sau:

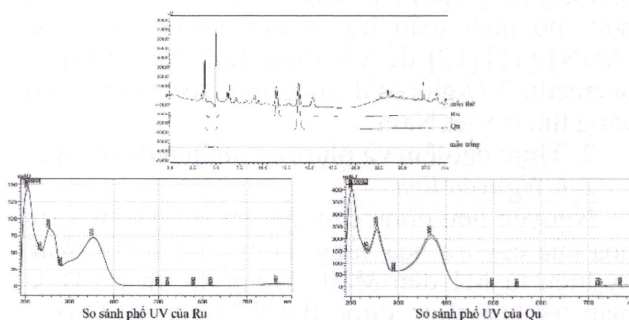
$$\text{Độ lệch}(\%) = \frac{(X^a - X^b)}{X^b} \times 100$$

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. *Thẩm định phương pháp HPLC-DAD định lượng đồng thời Ru và Qu trong trà hoa vàng*

3.1.1. Độ đặc hiệu:

Tiến hành các mẫu: Ru chuẩn, Qu chuẩn, mẫu trắng (dung môi MeOH 50%) và mẫu thử trà hoa vàng với điều kiện phân tích HPLC đã trình bày ở trên, sắc ký đồ thu được như Hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC-DAD đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

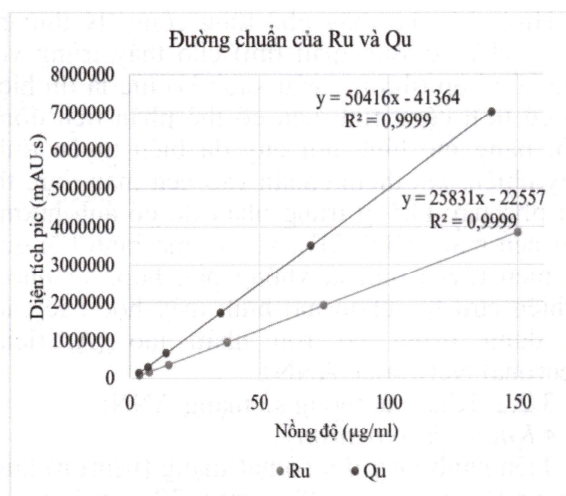
Bảng 1. Thông số pic của các chất định phân

Thông số	Ru	Qu
Thời gian lưu (t_R , phút)	11,02	13,36
R_s	2,955	2,628
T_f	1,057	1,119
N	92418	99758
Hệ số chồng phổ UV	0,9997	0,9992

Kết quả thu được cho thấy tín hiệu pic của Ru và Qu cân đối, sắc nhọn và tách tốt trên nền mẫu thử. So sánh phổ UV của Ru và Qu trong mẫu thử và mẫu chuẩn (Hình 1) cho thấy hệ số phù hợp đạt trên 0,999, chứng tỏ phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

3.1.2. Xây dựng đường chuẩn:

Chuẩn bị một dãy gồm dung dịch Ru chuẩn có nồng độ tăng dần từ 3,75 $\mu\text{g/ml}$ đến 150 $\mu\text{g/ml}$ và Qu chuẩn có nồng độ tăng dần từ 3,5 $\mu\text{g/ml}$ đến 140 $\mu\text{g/ml}$ rồi tiến hành phân tích HPLC với các điều kiện như đã trình bày ở trên. Kết quả khảo sát sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ dịch Ru và Qu được trình bày trong Hình 2.



Hình 2. Đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ Qu và Ru với diện tích pic

Bảng 2. Kết quả thẩm định phương pháp HPLC-DAD định lượng Ru và Qu trong trà hoa vàng

TT	Đánh giá	Kết quả	
		Ru	Qu
1	Tính thích hợp của hệ thống	RSD (t_R) = 0,11 % RSD (S) = 0,99 %	RSD (t_R) = 0,11 % RSD (S) = 1,72 %
2	Độ lặp lại trong ngày	RSD (hàm lượng %) = 1,66 %	RSD (hàm lượng %) = 1,23 %
	Độ lặp lại khác ngày	RSD (hàm lượng %) = 2,84 %	RSD (hàm lượng %) = 2,92 %
3	Hiệu suất thu hồi	95,94-104,31 %	97,25-103,49 %
4	LOD (µg/ml)	1,00	0,86
5	LOQ (µg/ml)	3,04	2,60

3.1.5. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày:

Độ lặp lại trong ngày: cân 6 lần mẫu thử M1 và chuyển vào 6 bình chiết khác nhau. Tiến hành xử lý mẫu theo qui trình mục 2.4.1 và phân tích bằng phương pháp HPLC theo mục 2.4.2. Kết quả thu được đánh giá độ lặp lại trong ngày của phương pháp.

Độ lặp lại khác ngày: chuẩn bị lặp lại 6 lần mẫu thử M1 và chuyển vào 6 bình chiết khác nhau. Tiến hành xử lý mẫu theo qui trình mục 2.4.1 và phân tích bằng phương pháp HPLC theo mục 2.4.2. Phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử đó. Kết quả thu được của 12 lần phân tích dùng cho đánh giá độ lặp lại khác ngày.

Kết quả được trình bày trong Bảng 2. Theo AOAC, với hàm lượng hoạt chất > 0,1% thì độ lặp lại đạt yêu cầu khi RSD% < 3,7%. Kết quả phân tích cho thấy, các giá trị độ lệch chuẩn lặp lại tương đối (%RSD) trong ngày và khác ngày của Ru và Qu đều đạt yêu cầu. Như vậy, phương pháp phân tích có độ chụm đạt yêu cầu đối với Ru và Qu.

3.1.6. Hiệu suất thu hồi:

Do các mẫu trà hoa vàng dùng trong nghiên cứu này đa dạng (*Camellia sp.*) và có hàm lượng dao động trong khoảng rộng, vì vậy nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá hiệu suất thu hồi

3.1.3. Tính thích hợp của hệ thống:

Kết quả được đánh giá thông qua giá trị RSD (%) của diện tích pic và thời gian lưu sau 6 lần phân tích lặp lại cùng một mẫu chuẩn Ru và Qu có nồng độ lần lượt là 7,5 µg/ml và 7 µg/ml. Kết quả được trình bày trong Bảng 2. Độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu đều nhỏ hơn 2%, cho thấy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp để phân tích định lượng Ru và Qu trong Trà hoa vàng.

3.1.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):

Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ Qu và Ru, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc ký đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của Qu và Ru, xác định được tỷ lệ S/N=2-3 và S/N= 9-11, từ đó tìm được LOD và LOQ. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

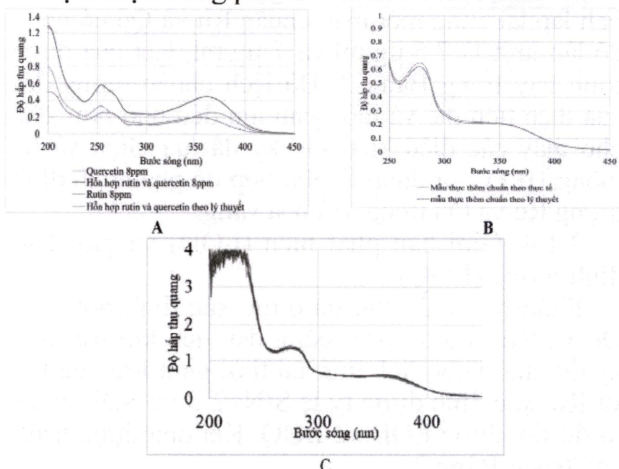
trên tất cả các mẫu (10 mẫu). Hiệu suất thu hồi và được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn ở 3 mức khoảng 80%, 100% và 120% so với hàm lượng của Ru và Qu có trong mẫu trà hoa vàng đó. Phân tích mẫu thêm chuẩn, mẫu không thêm chuẩn, xác định lượng chất chuẩn thêm vào tính theo thực nghiệm. So sánh giá trị lượng chất chuẩn thêm vào theo lý thuyết và theo thực nghiệm, xác định hiệu suất thu hồi. Kết quả được trình bày trong Bảng 2. Hiệu suất thu hồi trung bình của phương pháp định lượng Ru và Qu trong 10 mẫu trà hoa vàng dùng trong nghiên cứu này đều đạt trong khoảng 95-105% theo yêu cầu của AOAC, chứng tỏ phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao.

3.2. Xây dựng phương pháp UV-VIS-ANN định lượng đồng thời Ru và Qu trong trà hoa vàng

3.2.1. Khảo sát lựa chọn mô hình phù hợp:

Tiến hành đo tín hiệu của chất chuẩn của Ru và Qu ở nồng độ 8 µg/ml trong khoảng bước sóng từ 200 - 800nm. Kết quả thu được ở Hình 3 cho thấy, hai chất phân tích không hấp thụ ánh sáng trong vùng từ 450 đến 800 nm. Trong vùng phổ từ 200 - 250 nm, tín hiệu độ hấp thụ quang bị nhiễu và vượt quá khoảng tín hiệu ghi nhận của thiết bị (>4) (Hình 3C); hơn nữa, với đối tượng nghiên cứu là các hợp chất flavonoid, vùng phổ

200 - 250 nm không xuất hiện các đỉnh hấp thụ đặc trưng. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn vùng phổ UV là 250 - 400 nm.



Hình 3. Phổ UV-VIS của các chất chuẩn Ru và Qu (A), mẫu thực thêm chuẩn theo lý thuyết và thực tế (B, C): B-trong vùng phổ 250 - 450 nm; C-trong vùng phổ 200 - 450 nm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của số neuron đến hệ số RMSE

Chất phân tích		10 neuron	20 neuron	30 neuron	40 neuron
Qu	RMSE	0,1047	0,0943	0,1012	0,1166
Ru	RMSE	0,0647	0,0505	0,0516	0,0465
R		0,9931	0,9967	0,9973	0,9980

Kết quả thu được cho thấy hệ số RMSE thu được ứng với 20 neuron là thấp nhất: 0,0943 đối với Qu và 0,0505 đối với Ru, hệ số tương quan đạt 0,9967, chứng tỏ lựa chọn số neuron là 20 là phù hợp và đáp ứng yêu cầu độ chính xác của phương pháp phân tích.

Bảng 4. Khảo sát ảnh hưởng của số lớp ẩn đến hệ số RMSE

Chất phân tích		2 lớp	5 lớp	10 lớp	15 lớp
Qu	RMSE	0,0943	0,0988	0,1108	0,1051
Ru	RMSE	0,0505	0,0664	0,1669	0,1355
R		0,9967	0,9967	0,9797	0,9907

Kết quả thu được cho thấy ứng với số lớp ẩn là 2, hệ số RMSE là thấp nhất: 0,0505 đối với Ru và 0,0943 đối với Qu, hệ số R đạt 0,9967. Từ đó, lựa chọn các thông số cho mô hình ANN là 20 neuron và số lớp ẩn là 2 sẽ cho ra RMSE tối ưu nhất.

3.3.3. Đánh giá độ đúng của phương pháp UV-VIS/ANN bằng phương pháp thêm chuẩn:

Mẫu thêm chuẩn được chuẩn bị bằng cách lấy chính xác 1 ml mẫu thử và thêm chất chuẩn Ru và Qu ở 3 mức: 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml dung dịch chuẩn Ru và Qu có nồng độ 20 µg/ml. Sau đó, tiến hành định mức bằng nước trong bình định mức 25ml. Mẫu không thêm chuẩn được chuẩn bị bằng cách lấy chính xác 1,0 ml mẫu thử và tiến hành định mức bằng nước trong bình định mức 25ml.

Hình 3A cho thấy phổ tổng cộng (lý thuyết) của 2 chất (đường màu tím) cho thấy trùng với phổ hỗn hợp (đường màu xanh lá) tức là tín hiệu đo có tính cộng tính nên có thể phân tích đồng thời bằng mô hình hồi quy đa biến tuyến tính. Tuy nhiên, khi thêm chuẩn vào nền mẫu thực thì hai phổ này không trùng nhau do có ảnh hưởng của nền mẫu (Hình 3B), vì vậy mô hình hồi quy đa biến tuyến tính là không phù hợp, và nhóm nghiên cứu lựa chọn mô hình máy học bậc cao, sử dụng mạng nơ ron nhân tạo (Artificial Neuronal Networks, ANN).

3.2.2. Khảo sát thông số mạng ANN:

• *Khảo sát số neuron*

Tiến hành thay đổi số nút mạng (neuron) tăng dần từ 10 neuron đến 20 neuron, 30 neuron và 40 neuron. Kết quả khảo sát số neuron trong một lớp thông qua hệ số RMSE được trình bày trong Bảng 3.

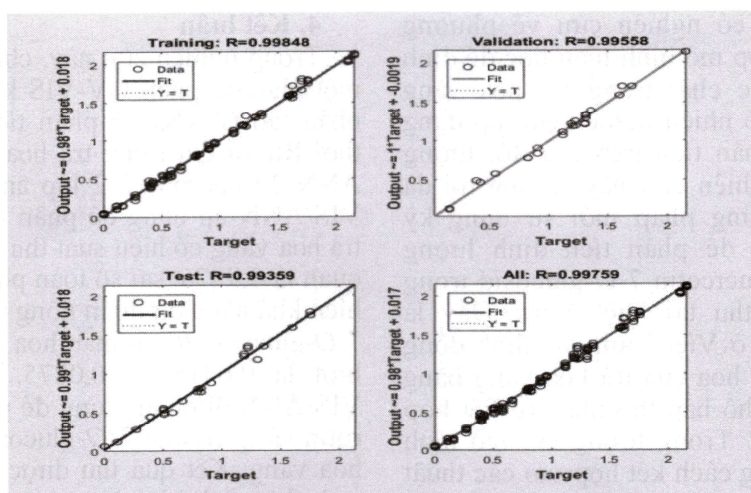
• *Khảo sát số lớp ẩn*

Sau khi khảo sát số neuron tối ưu (20 neuron) khảo sát sự thay đổi của RMSE khi đổi số lớp ẩn. Kết quả trình bày trong Bảng 4.

Định lượng Ru và Qu trong mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn bằng phương pháp UV-VIS/ANN, từ đó xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp. Hiệu suất thu hồi trung bình đối với Ru và Qu đạt lần lượt trong khoảng 93,08-104,49% và 90,56-102,39%, chứng tỏ phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao.

3.4. Xác định hàm lượng Ru và Qu trong các mẫu trà hoa vàng bằng phương pháp UV-VIS/ANN và HPLC-DAD

Tiến hành phân tích 10 dịch chiết từ 10 mẫu trà hoa vàng bằng hai phương pháp UV-VIS/ANN và HPLC-DAD. Sau khi phân tích, thu nhận dữ liệu và tính toán, xác định hàm lượng Ru và Qu có trong 10 mẫu trà hoa vàng. Kết quả thu được trình bày trong Hình 4 và Bảng 5.



Hình 4. Dữ liệu mô hình huấn luyện của ANN

Bảng 5. Hàm lượng Ru và Qu trong các mẫu trà hoa vàng bằng phương pháp UV-VIS/ANN và HPLC-DAD

Tên mẫu	m(g)	Ru			Qu		
		Hàm lượng (%) ^a	Hàm lượng (%) ^b	Độ lệch giữa hai phương pháp (%)	Hàm lượng (%) ^a	Hàm lượng (%) ^b	Độ lệch giữa hai phương pháp (%)
M1	0,5004	0,19311	0,19310	0,004	0,12317	0,12240	0,627
M2	0,5001	KPH	KPH	-	0,54610	0,54606	0,007
M3	0,4996	KPH	KPH	-	0,54253	0,54261	0,015
M4	0,5001	KPH	KPH	-	0,39933	0,39834	0,201
M5	0,5004	KPH	KPH	-	0,39201	0,39149	0,129
M6	0,5004	KPH	KPH	-	0,29913	0,29925	0,042
M7	0,5003	KPH	KPH	-	0,41105	0,41287	0,441
M8	0,4998	0,04111	0,04113	0,042	0,15550	0,15536	0,093
M9	0,5001	0,03436	0,03432	0,129	0,12234	0,12194	0,327
M10	0,4999	0,21734	0,21733	0,031	0,08949	0,08780	1,887
R			0,9976			0,9976	
RMSE (%)			0,0875			0,0418	

a-kết quả phân tích bằng phương pháp HPLC-DAD; b-kết quả phân tích bằng phương pháp UV-VIS-ANN; a và b được lấy 5 chữ số có nghĩa sau dấu phẩy để thể hiện sự khác biệt giữa hai kết quả; KPH: không phát hiện; -: không xác định; R-hệ số tương quan của mô hình; RMSE-sai số toàn phương trung bình.

Hệ số tương quan của mô hình là 0,9976 (> 0,99), sai số toàn phương trung bình RMSE nhỏ, chứng tỏ mô hình huấn luyện này phù hợp để xác định đồng thời Ru và Qu trong mẫu trà hoa vàng. So sánh kết quả phân tích hàm lượng Ru và Qu bằng phương pháp UV-VIS/ANN và phương pháp HPLC-DAD, độ lệch giữa các kết quả thu được đều nhỏ hơn 2%, điều này chứng tỏ phương pháp UV-VIS/ANN định lượng đồng thời Ru và Qu trong mẫu trà hoa vàng có độ chính xác cao.

Phương pháp HPLC-UV hoặc HPLC-DAD là các phương pháp phổ biến thường được áp dụng để phân tích đồng thời các flavonoid trong trà hoa vàng (*Camellia sp.*). Các phương pháp này có những ưu điểm nhất định như độ chính xác cao và có thể định lượng riêng lẻ từng chất, trong khi phương pháp UV-VIS chỉ phù hợp để phân

tích cả nhóm chất, không thể định lượng riêng lẻ từng chất. Tuy nhiên, các phương pháp HPLC đòi hỏi cần có trang thiết bị phân tích hiện đại và khó áp dụng tại hiện trường (tại điểm thu mẫu). Ngày nay, việc ứng dụng máy học (*Machine learning*) trong hóa học ngày càng phát triển, cùng với sự ra đời của các thiết bị cầm tay (ví dụ như máy đo UV-VIS cầm tay), việc áp dụng phương pháp kết hợp UV-VIS và các mô hình toán học để giải quyết các bài toán định lượng đồng thời nhiều chất được nghiên cứu và áp dụng trên nhiều đối tượng. Phương pháp UV-VIS/ANN thường được ứng dụng để xác định đồng thời hai hoặc nhiều chất có cùng tính chất quang học [11]. So với các phương pháp khác, UV-VIS/ANN có nhiều ưu điểm như đơn giản, nhanh, chi phí thấp và có thể áp dụng để phân tích mẫu tại hiện trường. Theo tra cứu tài liệu,

trên thế giới, chưa có nghiên cứu về phương pháp UV-VIS kết hợp mô hình toán học để định lượng đồng thời các chất trong trà hoa vàng (*Camellia sp.*), đã có nhiều nghiên cứu áp dụng UV-VIS/ANN để phân tích trên các đối tượng khác [12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một phương pháp mới sử dụng kỹ thuật UV-VIS/ANN để phân tích định lượng đồng thời rutin và quercetin 7-*O*-glucosid trong mẫu trà hoa vàng thu tại Việt Nam. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam xác định đồng thời Ru và Qu trong hoa của trà hoa vàng bằng kỹ thuật đo quang phổ hấp thụ phân tử kết hợp với thuật toán ANN. Trong tương lai, mô hình có thể phát triển bằng cách kết hợp với các thuật toán khác và mở rộng tập dữ liệu để tăng độ chính xác của mô hình.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển một phương pháp UV-VIS kết hợp mạng nơ ron nhân tạo (ANN) để phân tích định lượng đồng thời Ru và Qu trong trà hoa vàng. Với mô hình ANN 20 neuron và 2 lớp ẩn, phương pháp UV-VIS/ANN áp dụng để phân tích Ru và Qu trong trà hoa vàng có hiệu suất thu hồi cao, hệ số tương quan là 0,9976; sai số toàn phương trung bình thể hiện khả năng dự đoán nồng độ rutin và quercetin 7-*O*-glucosid trong mẫu hoa của trà hoa vàng lần lượt là 0,0418 và 0,0875. Phương pháp UV-VIS/ANN được áp dụng để phân tích hàm lượng rutin và quercetin 7-*O*-glucosid trong 10 mẫu trà hoa vàng. Kết quả thu được tương đồng với kết quả phân tích hàm lượng rutin và quercetin 7-*O*-glucosid bằng phương pháp đối chiếu HPLC.

Tài liệu tham khảo

1. Lê Nguyệt Hải Ninh (2017), Nghiên cứu phân loại chi *Camellia* L. Thuộc họ Chè - Theaceae ở Việt Nam, Luận án TS Sinh học Thực vật, Trường ĐHKHTN, ĐHQG Hà Nội.
2. Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) (2003), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, T.II; NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Đỗ Văn Tuấn (2015), Một số kết quả bảo tồn hai loài trà hoa vàng tam đảo (*Camellia tamdaoensis* Hakoda et Ninh) và Trà vàng pêtêlô (*Camellia petelotii* (Merr.) Sealy), thuộc chi Chè (*Camellia* L.) tại VQG Tam Đảo, *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị KH toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật lần thứ 6*, 1791-1797.
4. Hoàng Quỳnh Hoa, Trần Văn Ôn, Nghiêm Đức Trọng, Phạm Thị Linh Giang, Ngô Thị Thảo, Đỗ Thị Thảo (2016), Đặc điểm thực vật và một số tác dụng sinh học *in vitro* của một loài trà hoa vàng thu hái tại huyện Ba Chẽ, tỉnh Quảng Ninh, *Tạp chí Nghiên cứu dược Thông tin thuốc*, Số 4+5.
5. Nguyễn Kim Bích, Nguyễn Tập, Trần Ninh (2007), Bước đầu khảo sát thành phần hóa học của một số loài trà hoa vàng (*Camellia sp.*) ở Việt Nam, *Tuyển tập báo cáo KH. Hội thảo Quốc tế về trà hoa vàng lần thứ hai*; Tam Đảo, Vĩnh Phúc, Việt Nam, 25/1/2007.
6. Lin J. N., Lin H. Y., Yang N. S., Li Y. H., Lee M. R., Chuang C. H., Wav T. D. (2013), Chemical constituents and anticancer activity of yellow camellias against MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(40), 9638-9644.
7. Đặng Quang Bích, Đặng Quang Hưng, Trần Văn Cao, Hoàng Nguyễn Việt Hoa (2021), Hàm lượng một số hợp chất có hoạt tính sinh học trong lá và nụ hoa cây trà hoa vàng (*Camellia chrysanthoides*) thu thập tại Quảng Ninh, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển Nông thôn*, Kỳ 1+2 - tháng 2/2021, 46-54.
8. Đặng Quang Bích, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Văn Phú, Ninh Thị Thảo, Hoàng Hải Hà, Vũ Thị Hải Hà, Đoàn Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thùy Linh, Đinh Trường Sơn (2017), Đánh giá đa dạng nguồn gen 25 mẫu trà hoa vàng (*Camellia spp.*) thu thập tại Quảng Ninh bằng chỉ thị RADP và ISSR, *Tạp chí khoa học nông nghiệp Việt Nam*, 15(8), 1077-1092.
9. ICH (1996), Validation of Analytical Procedures: Text and methodology, *ICH Harmonised Tripartite Guideline*.
10. AOAC International (2013), Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, *AOAC Official*.
11. Trần Thị Huế, Trần Thùy Dung, Tạ Thị Thảo, Nguyễn Văn Ri (2019), Định lượng đồng thời caffein, theobromin, theophyllin trong chè bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử kết hợp với hồi quy đa biến, *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 24(1), 192 - 196.
12. Khanchi A. R., Mahani M. K., Hajhosseini M., Maragheh M. G., Chaloosi M., and Bani F. (2007), Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural networks and its comparison with PLS, *Food Chemistry*, 103(3), 1062-1068.

Tạp chí Dược liệu, tập 28, số 5/2023 (Trang 298 - 303)

TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM CỦA CAO CHIẾT ETHANOL DÂY ĐAU XƯƠNG TRÊN MÔ HÌNH VIÊM MẠN VÀ VIÊM KHỚP DẠNG THẤP THỰC NGHIỆM

**Nguyễn Thị Phương*, Nguyễn Văn Hiệp, Trần Thị Hồng Vân, Phạm Như Thơ,
Phạm Thị Nguyệt Hằng, Lê Thị Xoan**

Khoa Dược lý - Sinh hóa, Viện Dược liệu

***Email: phuonduocly@gmail.com**

(Nhận bài ngày 01 tháng 3 năm 2023)

Tóm tắt

Dây đau xương được dùng trong dân gian để chữa các bệnh thấp khớp, tê bại, đau mình mẩy, bong gân, trật khớp. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol dây đau xương (DEX) trong việc ức chế sản sinh nitric oxid (NO) gây bởi lipopolysaccharide (LPS) trên dòng tế bào RAW 264.7; đánh giá tác dụng chống viêm mạn trên mô hình chuột nhắt trắng gây u hạt thực nghiệm bằng bông tẩm carrageenan 1% và đánh giá tác dụng chống viêm khớp dạng thấp trên