

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG POLYPHENOL TỔNG TRONG RAU RẨM (*POLYGONUM ODORATUM LOUR*) BẰNG UV - VIS

● LÊ NGỌC QUÍ - NGUYỄN THỊ CẨM - NGUYỄN THIÊN THẢO - NGUYỄN THỊ THU HÀ*

TÓM TẮT:

Polyphenol là những nhóm chất hữu cơ được tìm thấy nhiều trong thực vật, được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây. Nghiên cứu nhằm đưa ra quy trình phân tích định lượng polyphenol tổng trong rau răm (*Polygonum Odoratum Lour*), bằng phương pháp đo quang dựa trên phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Bước đầu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng theo hướng dẫn của ICH. Kết quả đề tài thu được: phương pháp có tuyến tính trong khoảng 10 - 50 $\mu\text{g/mL}$. Độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,07%, độ thu hồi đạt từ 100,60% - 103,57%. Hàm lượng polyphenol tổng trong rau răm được xác định bằng phương pháp đã xây dựng là $61,610 \pm 0,693\text{mg GAE/g}$ quy về acid gallic/g bột khô.

Từ khóa: *Polygonum odoratum Lour*, rau răm, ICH, Polyphenol.

1. Đặt vấn đề

Rau răm là loại thảo dược có tên khoa học là *Polygonum odoratum*, thuộc họ rau răm *Polygonaceae*, thuộc chi *Polygonum* chứa nhiều hoạt chất sinh học như: flavonoid, anthraquinone, coumarin, naphthoquinone, polyphenol, terpenoid. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, hợp chất polyphenol trong cây rau răm có tác dụng như chống khối u, chống oxy hóa, chống viêm, lưu thông máu, chống HIV, chống suy giảm miễn dịch và chống côn trùng [1-3]. Ngày nay, cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật thì công nghệ ly trích các chất hữu cơ có nguồn gốc từ thiên nhiên có hoạt tính sinh học được phát triển để ứng dụng vào các lĩnh vực như: y học, dược phẩm, mỹ phẩm,... Tuy nhiên, những nghiên cứu về loại cây này chỉ dừng lại ở việc xác định thành phần hóa học, hoạt tính sinh học và một số hoạt chất chống oxy hóa có trong loại cây này mà

chưa nghiên cứu nhiều về quy trình định lượng các hợp chất hóa học trong chúng. Do đó, việc xây dựng quy trình định lượng polyphenol tổng trong rau răm là rất quan trọng để xác định hàm lượng polyphenol trong dược liệu, từ đó góp phần đánh giá hàm lượng dược chất trong nguyên liệu này. (Hình 1)

Hình 1: Cây rau răm



Xuất phát từ các vấn đề trên, đề tài “Xây dựng phương pháp định lượng Polyphenol tổng trong rau răm (*Polygonum odoratum* Lour) bằng UV-Vis” được thực hiện.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu

Cây rau răm được thu mua tại huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh. Mẫu sau khi thu hái được sấy khô ở 50°C, sau đó xay thành bột mịn, dùng làm nguyên liệu cho quá trình ly trích, và định lượng.

2.1.2. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất sử dụng: Ethanol (Merck), Gallic acid (Acros), Methanol (Merck), Follin-Ciocalteu (Merck), Na_2CO_3 (Merck), n-Propanol...

Thiết bị nghiên cứu: Máy quang phổ UV-VIS Shimadzu UV-1800, thiết bị ly tâm Hettich UNIVERSAL 320, bể đánh siêu âm Elma S100H, tủ sấy đối lưu FD 23 Binder-Đức, thiết bị nghiền được liệu CS-300A và một số thiết bị liên quan khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Polyphenol tổng trong dịch chiết rau răm được định lượng bằng phương pháp UV-Vis sau khi phản ứng với thuốc thử Folin-ciocalteu, và được thực hiện trong điều kiện tránh ánh sáng.

Dung dịch chuẩn gốc acid gallic nồng độ khoảng 1000 $\mu\text{g/mL}$: cân chính xác ($0,1 \pm 0,001$)g acid gallic khan ($M = 170,12$), hòa tan trong nước cất thu được 100mL dung dịch chuẩn gốc (nồng độ 1.000 $\mu\text{g/mL}$).

Dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%: dùng pipet chuyển 25mL thuốc thử Folin-Ciocalteu gốc vào bình định mức 250mL, sau đó định mức đến vạch bằng nước cất và lắc đều.

Dung dịch Na_2CO_3 7,5%: cân ($18,75 \pm 0,01$)g Na_2CO_3 cho vào bình định mức 250mL. Thêm nước cất vào đến nửa bình, lắc đều để hòa tan hoàn toàn sau đó định mức đến vạch.

Dung dịch mẫu thử: cân $5,0000 \pm 0,0010$ g bột rau răm (độ ẩm <10%) cho vào bình tam giác, chiết bằng thiết bị chiết siêu âm ở nhiệt độ $60^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian 3 giờ trong 25mL ethanol 50%. Sau đó ly tâm 9000 vòng trong 10 phút và lọc, thu dịch chiết.

Phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu: hút chính xác 1,0 mL dung dịch thử (đã pha loãng) cho vào bình thủy tinh nhỏ, thêm 5,0 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu đã chuẩn bị ở trên, lắc đều trong 1

phút. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Thêm 4,0 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5%. Lắc đều trong 2 phút, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Sau đó tiến hành đo UV ở bước sóng 773nm [4-5]. Dựa vào phương trình đường chuẩn của acid gallic để xác định được hàm lượng polyphenol tổng.

2.3. Xây dựng phương pháp

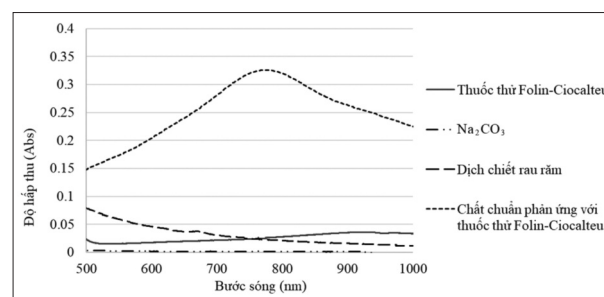
Xây dựng phương pháp theo quy định của ICH [6] với các chỉ tiêu sau: tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), tính tương thích hệ thống, xác định khoảng tuyến tính của phương pháp: dung dịch chuẩn có nồng độ từ 10-50 $\mu\text{g/mL}$. Xây dựng phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ. Yêu cầu: $R^2 \geq 0,99992$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tính đặc hiệu của phương pháp định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng UV-Vis

Tiến hành pha các mẫu dung dịch thử và dung dịch chuẩn, thực hiện phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu, sau đó đo UV-Vis từ bước sóng từ 300 đến 1100nm các mẫu để kiểm tra tính đặc hiệu. Kết quả đo được thể hiện trong phổ đồ ở Hình 2 cho thấy, thuốc thử Folin-Ciocalteu sau khi phản ứng với chất chuẩn acid gallic có đỉnh hấp thụ tại bước sóng 773nm; trong khi đó, thuốc thử Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 và dịch chiết rau răm không có đỉnh hấp thụ trong vùng bước sóng này. Vì vậy, định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng UV-Vis tại bước sóng 773 mang tính đặc hiệu cao.

Hình 2: Phổ đối chiếu tính đặc hiệu của phương pháp



3.2. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng UV-Vis

Phương pháp thực hiện: Lấy 1mL dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$ cho vào các bình

định mức 100mL. Định mức tới vạch bằng nước cất thu được dung dịch acid gallic chuẩn có nồng độ 10µg/mL. Từ dung dịch acid gallic chuẩn có nồng độ 10µg/mL hút chính xác 1,0 mL, thực hiện phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Song song làm một mẫu trắng. Đo độ hấp thu ở bước sóng 773nm. Thực hiện lặp lại 10 mẫu. Kết quả được mô tả qua Bảng 1.

Độ lệch chuẩn tương đối được xác định theo công thức:

RSD % = (Độ lệch chuẩn/ Trung bình các lần đo)*100

Pha dung dịch acid gallic chuẩn có nồng độ 10µg/mL từ dung dịch chuẩn gốc. Hút chính xác 1,0mL dung dịch này, thực hiện phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu, sau đó đo độ hấp thu ở bước sóng 773nm. Thực hiện đồng thời 10 mẫu. Độ hấp thu trung bình đo được là 0,111 ± 0,001 (RSD = 1,067%). Kết quả cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) về độ hấp thu của dung dịch chuẩn sau khi phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu < 2% nên phương pháp phân tích này tương thích với hệ thống quang phổ UV-Vis. Kết quả cho thấy sự tương đồng so với nghiên cứu của Nguyễn Khánh Thuỳ Linh cùng với các cộng sự khi xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây [7].

3.3. Xác định khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng UV-Vis

Phương pháp thực hiện: Lấy chính xác 1, 2, 3, 4, 5mL dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000µg/mL cho vào các bình định mức 100mL. Định mức tới vạch bằng nước cất. Lắc đều sau đó thu được các dung dịch có nồng độ thay đổi tương đương 10, 20, 30, 40, 50µg/mL acid gallic. Hút chính xác 1,0mL các dung dịch trên cho vào hũ bi được đánh số từ 1 - 5 tương ứng. Thực hiện phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Quá trình này được thực hiện song song với mẫu trắng. Sau đó đo độ hấp thu của các mẫu ở bước sóng 773nm. Mối tương quan giữa nồng độ và độ hấp thu của acid gallic chuẩn được thể hiện ở Hình 3.

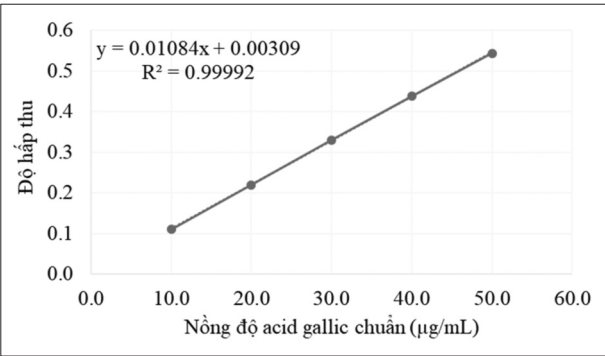
Kết quả về độ hấp thu và nồng độ acid gallic có tương quan tuyến tính với hệ số tương quan R² = 0,99992 và phương trình hồi quy tuyến tính là y =

Bảng 1. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

STT	Tên mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Độ hấp thu (Abs)
1	DD1	10	0,109
2	DD2	10	0,110
3	DD3	10	0,110
4	DD4	10	0,110
5	DD5	10	0,112
6	DD6	10	0,110
7	DD7	10	0,109
8	DD8	10	0,111
9	DD9	10	0,112
10	DD10	10	0,112
Độ lệch chuẩn (SD)			0,001
Trung bình (TB)			0,111
Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%)			1,067
TB ± SD			0,111 ± 0,001

Nguồn: Tác giả

Hình 3: Đường chuẩn acid gallic



0,01084x - 0,00309. Trong đó: y là độ hấp thu; x là nồng độ của dung dịch acid gallic chuẩn (µg/mL).

3.4. Khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng UV-Vis

Thực hiện theo phương pháp thêm chuẩn. Thêm acid gallic chuẩn vào nền mẫu với lượng 25mg/5g bột mẫu. Tiến hành xử lý mẫu và phân tích mẫu theo quy trình được khảo sát, tất cả các mẫu đều chiết cùng một điều kiện trên. Sau khi thu được dịch chiết, ly tâm, lọc và cho phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu, quá trình được thực hiện một mẫu trắng song song, sau đó đo quang ở bước sóng

773nm. Dựa vào phương trình đường chuẩn để xác định nồng độ ($\mu\text{g/mL}$), sau đó tính lượng chuẩn thu hồi. Từ đó, xác định phần trăm thu hồi. (Bảng 2)

Độ thu hồi được đánh giá theo công thức:

$$\% \text{ thu hồi} = \frac{C_{\text{mẫu thử thêm chuẩn}} - C_{\text{mẫu thử}}}{C_{\text{chuẩn thêm vào}}} \times 100$$

Độ lệch chuẩn tương đối RSD % được xác định theo công thức:

$$\text{RSD\%} = \frac{\text{Độ lệch chuẩn}}{\text{Độ thu hồi trung bình}} \times 100$$

Từ kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp 3 ngày liên tiếp cho thấy, phương pháp định lượng có độ đúng cao với tỷ lệ % chất chuẩn tìm lại từ 100,60% - 103,57%, giá trị trung bình 102,16% và RSD = 1,26%. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp khi so sánh với nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Nhã Thảo cùng với các cộng sự khi nghiên cứu về định lượng polyphenol tổng từ rau Càng cua [8].

3.5. Khảo sát độ chính xác của phương pháp định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng UV-Vis

Các mẫu chuẩn thực hiện ở 3 mức nồng độ (7,5; 17,0; 35,0 $\mu\text{g/mL}$). Hút chính xác 1,0mL các dung dịch trên cho vào hủ bi thực hiện phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu được tiến hành song song với một mẫu trắng. Đo độ hấp thu của các mẫu ở bước sóng 773nm. Mỗi mức nồng độ thực hiện lặp lại 10 mẫu. Xác định nồng độ theo đường chuẩn của các mẫu trong cùng một ngày và khác ngày. Từ đó, xác định độ lệch chuẩn tương đối.

Từ giá trị kết quả của Bảng 3 cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) trong ngày và khác ngày đều < 2%. Như vậy, phương pháp có độ chính xác cao và đạt yêu cầu phân tích.

Bảng 2. Kết quả trung bình khảo sát độ đúng của phương pháp 3 ngày liên tiếp

STT	Độ thu hồi (%)	Độ lệch chuẩn (SD)	Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%)
1	102,297	1,415	1,384
2	103,572	1,299	1,245
3	100,602	1,158	1,151
Trung bình (TB)	102,157	1,291	1,263
TB $\pm$ SD	102,157 $\pm$ 1,291		
RSD%	1,263		

Nguồn: Tác giả

3.6. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp định lượng dựa trên đường chuẩn

Dựa vào thông số ở phần khảo sát độ lặp lại của phương pháp để xác định giới hạn phát hiện của phương pháp theo công thức:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \text{SD}}{a} = \frac{3,3 \times 0,001}{0,01084} = 0,3 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Dựa vào thông số ở phần khảo sát độ lặp lại của phương pháp để xác định giới hạn định lượng của phương pháp theo công thức:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{a} = \frac{10 \times 0,001}{0,01084} = 0,9 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn của tín hiệu; a là độ dốc của đường chuẩn.

3.7. Xác định hàm lượng polyphenol tổng trong mẫu cao của rau răm bằng phương pháp UV-Vis (Bảng 4)

Áp dụng quy trình đã thẩm định để xác định

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp trong hai ngày liên tiếp

STT	Độ chính xác	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)		
		7,5	17	35
1	Cùng ngày (TB $\pm$ SD)	7,508 $\pm$ 0,068	18,370 $\pm$ 0,133	37,534 $\pm$ 0,263
		RSD% = 0,908	RSD% = 0,722	RSD% = 0,701
2	Khác ngày (TB $\pm$ SD)	7,964 $\pm$ 0,067	18,620 $\pm$ 0,147	38,087 $\pm$ 0,196
		RSD% = 0,841	RSD% = 0,792	RSD% = 0,516

Nguồn: Tác giả

Bảng 4. Kết quả hàm lượng polyphenol tổng trong rau răm ở 3 ngày

STT	Tên mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Polyphenol tổng (mg GAE/g)
Ngày 1	N1	27,855	60,952
Ngày 2	N2	28,456	62,266
Ngày 3	N3	28,157	61,612
Độ lệch chuẩn (SD)			0,693
Trung bình (TB)			61,610
Độ lệch chuẩn tương đối RSD%			1,125
TB ± SD			61,610 ± 0,693

Nguồn: Tác giả

hàm lượng polyphenol toàn phần trong mẫu dịch chiết rau răm. Kết quả thực nghiệm cho thấy, hàm lượng trung bình trong dịch chiết ethanol 50% trong nước đạt 61,610 ± 0,693mg GAE/g (theo khối lượng bột khô với độ ẩm 8,6%) tính theo acid gallic. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng polyphenol tổng trong rau răm cao hơn so với Đài hoa Bụp giấm đạt hàm lượng polyphenol tổng 29,35 ± 0,73 mg/g khi xây dựng cùng phương pháp định lượng

theo ICH trong nghiên cứu của Trần Huy Hoàng cùng với các cộng sự năm 2017 [9].

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng polyphenol tổng trong rau răm bằng phương pháp phân tích UV-Vis dựa trên phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu theo phương pháp thẩm định của ICH với độ lặp lại cao với RSD = 1,067%.

Khoảng tuyến tính với hệ số tương quan R² = 0,99992 và phương trình hồi quy tuyến tính là y = 0,01084x - 0,00309 với dãy nồng độ từ 10 - 50 (µg/mL), độ đúng của phương pháp theo tỷ lệ % thu hồi của chất chuẩn đạt từ 100,602% - 103,572% và độ chính xác của phương pháp ở cùng ngày, khác ngày theo từng nồng độ dãy chuẩn 7,5; 17; 35 (µg/mL) với độ lệch chuẩn tương đối thấp nhất RSD = 0,516% và cao nhất RSD = 0,908%.

Với giới hạn phát hiện (LOD) là 0,3 (µg/mL), và giới hạn định lượng (LOQ) là 0,9 (µg/mL). Hàm lượng polyphenol tổng trong rau răm được xác định bằng phương pháp đã xây dựng là 61,610 ± 0,693mg GAE/g với độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,125% quy về acid gallic/g bột khô ■

Lời cảm ơn:
Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Trà Vinh thông qua Hợp đồng số 394/2022/HĐ. HDKH&ĐT-DHTV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Trần Thanh Hà, (2017). Nghiên cứu thành phần hóa học của 3 loài thuộc chi Polygonum, họ Rau răm (Polygonaceae): Thơm lồm gai (Polygonum Perfoliatum L.), nghệ trắng (Polygonum Barbatum L.), mễ tử liểu (Polygonum Plebeium R. Br). Luận án Tiến sĩ Khoa học vật chất, Trường Đại học Khoa học tự nhiên.

2. TCVN 9745-1 (2013). Chè - xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen, phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè - Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin- Ciocalteu.

3. Nguyễn Khánh Thùy Linh, Võ Thị Quỳnh Nhi, Thái Thị Thu Nhiên, Huỳnh Thị Diệu Hân, Lê Thị Hồng Hà, Nguyễn Thị Yến Vi (2019). Xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây (Moringa oleifera) bằng quang phổ UV. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên, 207(14), 225-229.

4. Nguyễn Ngọc Nhã Thảo, Tống Thành Long, Đặng Duy Khánh, & Nguyễn Thị Trang Đài, (2022). Xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc rau càng cua (Peperomia Pellucida (L.) Kunth) bằng quang phổ UV-Vis. Tạp chí Y Dược học Cần Thơ, 50, 62-68.

5. Trần Huy Hoàng; Phạm Văn Hiển, Đặng Trường Giang, Nguyễn Hoàng Ngân, Vũ Bình Dương, Phạm Quốc Bình (2017). Xây dựng phương pháp định lượng Polyphenol toàn phần trong đài hoa búp giấm (Hibiscus sabdariffa L.) bằng quang phổ UV-Vis. Tạp chí Y dược học Quân sự, 8, 7-13.

6. Md. Saidur Rahaman, Md. Rezaul Islam, et. al. (2022). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*, 27(1), 233.
- 7 Rakesh E. Mutha, Anilkumar U. Tatiya, and Sanjay J. Surana (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Futur J. Pharm. Sci.*, 7(1), 25.
3. Naresh Kumar and Nidhi Goel (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*, 24, e00370.

Ngày nhận bài: 27/01/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 15/02/2024

Ngày chấp nhận đăng bài: 26/3/2024

Thông tin tác giả:

1. LÊ NGỌC QUÍ¹

2. NGUYỄN THỊ CẨM¹

3. ThS. NGUYỄN THIÊN THẢO¹

4. ThS. NGUYỄN THỊ THU HÀ^{1,*}

¹Trường Đại học Trà Vinh

DEVELOPING A METHOD TO DETMERINE THE TOTEL POLYPHENOL IN LAKSA (*POLYGONIUM ODORATUM* LOUR) BY USING THE UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY METHOD

● LE NGOC QUI¹

● NGUYEN THI CAM¹

● MSc NGUYEN THIEN THAO¹

● MSc NGUYEN THI THU HA^{1,*}

¹Tra Vinh University

ABSTRACT:

Polyphenols, organic compounds found plentifully in plants, have become an emerging field of interest in food in recent years. This study provided a validated quantitative analysis procedure for total polyphenols in Laksa (*Polygonium Odoratum* Lour) by using the UV-Vis spectrophotometry method based on the reaction between polyphenols and folin-ciocalteu reagent. The validation procedure was developed in accordance with ICH guidelines. The study's results showed that the validated method has satisfied linearity in the range of 10-50 mg/mL; the intra-day and interday precision tests have an RSD% of 1,07 % and a desirable recovery rate of 100,60% to 103,57%. The total phenolic contents are $61,610 \pm 0,693$ as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dried extract.

Keywords: polygonium odoratum Lour, Laksa, polyphenol, ICH.