

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG POLYPHENOL TOÀN PHẦN TRONG LÁ CHÙM NGÂY (*Moringa oleifera*) BẰNG QUANG PHỔ UV

Nguyễn Khánh Thuỳ Linh*, Võ Thị Quỳnh Nhi, Thái Thị Thu Nhiên,
Huỳnh Thị Diệu Hân, Lê Thị Hồng Hà, Nguyễn Thị Yên Vi
Trường Đại học Y Dược Huế

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Chùm ngây còn có nhiều tác dụng sinh học quý, các hợp chất polyphenol đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn các tác động có hại của stress oxy hóa. Do đó, cần xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây bằng quang phổ UV-VIS nhằm kiểm soát chất lượng của lá chùm ngây. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Lá chùm ngây thu hái tại thành phố Huế. Định lượng polyphenol toàn phần bằng phương pháp đo quang dựa trên phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu, thẩm định phương pháp định lượng theo hướng dẫn của AOAC. **Kết quả:** Xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây phù hợp với hệ thống quang phổ UV-VIS, đảm bảo tính đặc hiệu chọn lọc, độ đúng cao với tỷ lệ % chất chuẩn tìm lại từ 98,79% - 101,93%, trung bình 99,85% và RSD = 1,22% và độ chính xác cao. Hàm lượng polyphenol toàn phần của lá chùm ngây được xác định bằng phương pháp đã xây dựng là $23,2983 \pm 0,2009$ mg/g tính theo acid gallic (theo dược liệu khô tuyệt đối). **Kết luận:** đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây bằng quang phổ UV-VIS.

Từ khóa: *Dược liệu; chùm ngây; polyphenol; UV-VIS.*

Ngày nhận bài: 13/8/2019; Ngày hoàn thiện: 18/10/2019; Ngày đăng: 21/10/2019

UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS FROM LEAVES OF *MORINGA OLEIFERA*

Nguyen Khanh Thuuy Linh*, Vo Thi Quynh Nhi, Thai Thi Thu Nien,
Huynh Thi Dieu Han, Le Thi Hong Ha, Nguyen Thi Yen Vi
Hue University of Medicine and Pharmacy

ABSTRACT

Background: *Moringa oleifera* has many valuable biological effects. Polyphenol compounds play an important role in preventing the harmful effects of oxidative stress. It is necessary to develop and validate a quantitative analysis procedure of total polyphenols in the leaves of *Moringa oleifera* using UV-VS method to control the quality of *Moringa oleifera*. **Material and Methods:** leaves of *Moringa oleifera* are collected in Hue city. Determining total polyphenols using UV-VIS method based on reaction between polyphenols and folin-ciocalteu reagent; validate this procedure according to AOAC guidelines. **Results:** The quantitative analysis was performed by reaction between total polyphenols and folin-ciocalteu reagent with detective wavelength of 765 nm. The method was validated to have satisfied linearity in the range of 10-50 µg/ml. Intra-day and inter-day precision tests showed the RSD% < 2% and desirable accuracy (recovery 98.79% - 101.93%). **Conclusion:** The quantitative analysis procedure of total polyphenols from *Moringa oleifera* using UV-VIS method was validated.

Keywords: *Pharmacognosy, Moringa oleifera; UV-VIS; total polyphenols*

Received: 13/8/2019; Revised: 18/10/2019; Published: 21/10/2019

* Corresponding author. Email: khanhthuylinh87@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Cây chùm ngây có tên khoa học là *Moringa oleifera*, có nguồn gốc bản địa từ tây bắc Ấn Độ, sau đó được phân bố rộng rãi ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới ở châu Á và châu Phi. Chùm ngây có chứa nhiều vitamin C, beta caroten, protein, acid amin nên có giá trị dinh dưỡng cao. Bên cạnh đó, Chùm ngây còn có nhiều tác dụng sinh học quý như kháng khuẩn, kháng nấm, chống tăng huyết áp, lợi tiểu, làm hạ cholesterol và ngăn chặn sự phát triển của khối u [1]. Cây chùm ngây mới được du nhập vào Việt Nam, được sử dụng như là loại rau có khả năng hỗ trợ điều trị nhiều bệnh, trong đó đáng quan tâm là các bệnh liên quan đến tác dụng chống oxy hóa [2]. Các hợp chất polyphenol đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn các tác động có hại của stress oxy hóa [3]. Do đó, việc xây dựng quy trình định lượng polyphenol trong lá chùm ngây để kiểm soát hàm lượng polyphenol trong dược liệu, góp phần đánh giá chất lượng dược liệu này là một việc rất cần thiết.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên

2.1. Nguyên liệu

Lá chùm ngây được hái ở thành phố Huế và được định danh bởi TS. Vũ Tiến Chính, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam. Mẫu sau khi thu hái được sấy khô ở 50°C, sau đó xay thô, dùng làm nguyên liệu cho quá trình chiết xuất.

2.2. Thiết bị, hóa chất, dung môi

- Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS Shimadzu V630 (Japan).
- Natri carbonat khan, chuẩn acid gallic hàm lượng 99,2% (Sigma-Aldrich), thuốc thử Folin-Ciocalteu pha sẵn (Sigma-Aldrich).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Định lượng polyphenol toàn phần trong dịch chiết dược liệu bằng phương pháp đo quang sau khi phản ứng với thuốc thử Folin-ciocalteu. Tiến hành trong điều kiện tránh ánh

sáng. Cho 0,1 ml dịch chiết tác dụng với 0,5ml thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Ủ 3-8 phút, sau đó thêm vào hỗn hợp 0,4ml dung dịch Na_2CO_3 7,5%. Ủ hỗn hợp 1h trong bóng tối, sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 765nm. Hàm lượng polyphenol toàn phần được tính theo acid gallic [4].

2.4. Chuẩn bị mẫu thử

Cân 0,5g dược liệu cho vào bình cầu, chiết bằng siêu âm với dung môi, nhiệt độ và thời gian thích hợp. Lọc mẫu thử. Lấy một thể tích xác định dịch lọc cho phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu trong môi trường kiềm của dung dịch Natri carbonat.

Khảo sát phương pháp chiết mẫu dược liệu:

Thăm dò dung môi chiết: nước, ethanol, methanol. Khảo sát nhiệt độ chiết: 40°C, 50°C, 60°C. Khảo sát thời gian chiết: 90 phút, 120 phút và 180 phút. Khảo sát tỷ lệ nguyên liệu : dung môi chiết (g/ml): 1:20, 1:40, 1:60. Tại mỗi bước thí nghiệm, thay đổi giá trị của yếu tố cần khảo sát và cố định thông số của các yếu tố còn lại. Tính hàm lượng polyphenol toàn phần thu được đối với mỗi thí nghiệm để xác định điều kiện tối ưu chiết polyphenol từ lá chùm ngây.

Chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác khoảng 0,1 gam chất chuẩn acid gallic, hòa tan trong nước và pha loãng thành 100ml thu được dung dịch chuẩn gốc acid gallic nồng độ 1mg/ml. Sau đó lần lượt hút 1, 2, 3, 4 và 5 ml dung dịch chuẩn gốc acid gallic và pha loãng thành 100ml để thu được các dung dịch acid gallic có nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 $\mu\text{g/ml}$. Thêm vào các dung dịch này: thuốc thử Folin-Ciocalteu, nước, dung dịch natri carbonat. Mẫu thử và mẫu chuẩn để yên 30 phút rồi tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 765nm. Tiến hành song song với mẫu trắng.

Thẩm định phương pháp: thẩm định theo quy định của AOAC [5] các chỉ tiêu sau: độ chọn lọc đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, xác định khoảng tuyến tính: trên một dãy

dung dịch chuẩn có nồng độ từ 10-50 µg/ml. Xây dựng phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ. Yêu cầu: $R^2 \geq 0,99$.

+ Độ đúng: sử dụng phương pháp thêm chuẩn, sau đó xác định độ thu hồi.

Tỷ lệ % tìm lại chuẩn được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ \% tìm lại} = (C \text{ tìm lại} / C \text{ thêm vào}) \times 100$$

$$= [(C \text{ mẫu thử thêm vào} - C \text{ mẫu thử}) / C \text{ thêm vào}] \times 100$$

+ Chính xác: Chuẩn bị các mẫu chuẩn ở 3 mức nồng độ. Mỗi nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Xác định nồng độ theo đường chuẩn của mẫu trong cùng một ngày và khác ngày.

+ Tính toán kết quả: từ độ hấp thụ của dung dịch, tính nồng độ polyphenol toàn phần trong các dung dịch thử theo acid gallic.

$$\text{Hàm lượng polyphenol toàn phần (mg/g)} = (C \text{ thực} \cdot V \cdot k \cdot 1000 / m) \times 100$$

Trong đó:

C thực: nồng độ polyphenol toàn phần trong dung dịch thử (µg/ml)

V: thể tích dung dịch thử (ml)

k: hệ số pha loãng

m: khối lượng của dược liệu (g)

2.5. Xử lý số liệu: Thí nghiệm được tiến hành ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%.

3. Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1. Khảo sát phương pháp chiết mẫu dược liệu

Sau khi thực hiện khảo sát các tiêu chí về dung môi, nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, quy trình chiết được tối ưu như sau: Cân khoảng 0,5 g dược liệu vào bình nón, thêm vào chính xác 20ml MeOH và tiến hành chiết siêu âm ở nhiệt độ 50°C trong 120 phút. Lọc dịch chiết thu được qua màng lọc 0,45 µm sau đó cất thu hồi dung môi thu được cặn. Hòa tan cặn trong MeOH thu được dịch chiết nghiên cứu.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Xác định khoảng tuyến tính

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn với nồng độ thích hợp, tiến hành phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu, song song làm một mẫu trắng. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm. Mối tương quan giữa nồng độ và độ hấp thụ của acid gallic chuẩn được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tương quan giữa nồng độ và độ hấp thụ đo được

Nồng độ C (µg/ml)	10	20	30	40	50
Độ hấp thụ	0,1813	0,2957	0,4051	0,4977	0,5870
Phương trình đường chuẩn	A = 0,0101.C + 0,0894			R ² = 0,9968	

Độ hấp thụ và nồng độ của dung dịch acid gallic có tương quan tuyến tính chặt chẽ với hệ số tương quan $R^2 = 0,996$ và phương trình hồi quy tuyến tính là $A = 0,0101.C + 0,0894$. Trong đó, A: độ hấp thụ của dung dịch, C: nồng độ của dung dịch chuẩn acid gallic (µg/ml).

3.2.2. Tính thích hợp hệ thống

Pha dung dịch acid gallic chuẩn có nồng độ 30µg/ml từ dung dịch chuẩn gốc. Hút chính xác 1ml dung dịch này, thực hiện phản ứng Folin-Ciocalteu. Đo độ hấp thụ quang tại bước sóng 765nm. Thực hiện đồng thời 6 mẫu. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Khảo sát tính thích hợp hệ thống của phương pháp

Dung dịch	1	2	3	4	5	6
Độ hấp thụ (A)	0,5367	0,5564	0,5398	0,5617	0,5448	0,5531
\bar{A}	0,5488					
SD	0,0099					
RSD (%)	1,7967					

Kết quả cho thấy: độ lệch chuẩn tương đối (RSD) về độ hấp thụ của dung dịch chuẩn sau khi phản ứng với thuốc thử Folin-ciocalteu < 2%. Như vậy, phương pháp phân tích này tương thích với hệ thống UV-VIS.

3.2.3. Độ đúng của phương pháp

Thực hiện theo phương pháp thêm chuẩn. Thêm acid gallic chuẩn vào nền mẫu dược liệu ở các mức 1,8mg, 2,3mg và 2,8mg/0,1g dược liệu, tiến hành xử lý mẫu và phân tích theo quy trình đã khảo sát. Mỗi mức nồng độ thêm làm 3 mẫu. Thực hiện phản ứng Folin-ciocalteu sau đó đo quang. Dựa vào phương trình đường chuẩn, tính lượng chuẩn tìm lại. Từ đó, xác định phần trăm tìm lại chuẩn như Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Lượng thêm vào ban đầu	1,8 mg	2,3 mg	2,8 mg
Độ thu hồi (%)	100,07 – 101,93	98,84 – 99,78	98,79 – 100,04
Trung bình (%)	99,85 ± 1,22		

Phương pháp định lượng có độ đúng cao với tỷ lệ % chất chuẩn tìm lại từ 98,79 % - 101,93%, trung bình 99,85% và RSD = 1,22%.

3.2.4. Độ chính xác của phương pháp

Khảo sát theo quy trình xử lý mẫu như trên, tiến hành phản ứng Folin-ciocalteu sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 765nm. Lặp lại thí nghiệm 6 lần song song trong cùng 1 ngày. Xác định hàm lượng hợp chất trong mẫu thử (mg/g) dựa vào đường chuẩn (độ chính xác trong ngày). Lặp lại cả quy trình trên vào ngày tiếp theo trên cùng mẫu (độ chính xác khác ngày). Tính RSD(%) của hàm lượng trong ngày và khác ngày. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp

Độ chính xác trong ngày (±SD, mg/g)	23,7090 ± 0,3243 RSD = 1,3678 %
Độ chính xác khác ngày (±SD, mg/g)	22,2881 ± 0,4053 RSD = 1,8183 %

Nhận xét: độ chính xác đạt yêu cầu cho một quy trình định lượng với hàm lượng hoạt chất trong dược liệu chùm ngây dưới 10%.

3.3. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây

Áp dụng quy trình định lượng đã thẩm định để xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây, kết quả thể hiện trong Bảng 5.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, hàm lượng polyphenol trong lá chùm ngây đạt 23,2983 ±

0,2009 mg/g tính theo acid gallic (theo dược liệu khô tuyệt đối).

Bảng 5. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây

STT	Hàm lượng polyphenol toàn phần (mg/g)
1	23,1306
2	23,2433
3	23,5210
$\bar{X} \pm SD$	23,2983 ± 0,2009

Polyphenol là các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên và tồn tại trong thực vật, được chứng minh là có khả năng chống oxy hóa vô cùng hiệu quả [6]. Polyphenol có thể bảo vệ cơ thể, giúp cơ thể chống lại nhiều loại bệnh khác nhau do gốc tự do gây ra như ung thư, tim mạch, tiểu đường, loãng xương và bệnh thoái hóa thần kinh [7], [8]. Nhiều nghiên cứu cho thấy, polyphenol là thành phần chính trong dịch chiết lá chùm ngây và nó đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bảo vệ gan chống lại các tác nhân oxy hóa [9]. Do đó, hàm lượng polyphenol toàn phần là tiêu chí quan trọng để đánh giá chất lượng của dược liệu này. Để xác định hàm lượng polyphenol toàn phần, có thể sử dụng nhiều phương pháp như HPLC, đo quang. Phương pháp Folin - Ciocalteu là phương pháp quang phổ truyền thống dùng để xác định hàm lượng phenolic tổng, đặc hiệu

cho các nhóm phenol do tính chất khử của chúng. Bản chất là phản ứng khử các axit phosphomolybdic của các hợp chất phenolic trong môi trường kiềm tạo thành một phức chất màu xanh. Folin - Ciocalteu được đánh giá là tốt hơn so với một số phương pháp thường được so sánh như chuẩn độ permanganat, phản ứng màu với các muối sắt, phép đo dùng tia cực tím. Thực tế, đa số các phương pháp xác định hàm lượng phenolic tổng khác chỉ đo được một số cấu trúc phenolic nhất định, không thể dùng để ước tính hàm lượng phenolic tổng [10]. Hiện nay có một số phương pháp mới đang phát triển cho kết quả phân tích chính xác và hiện đại như kỹ thuật phân tích điện và phổ hồng ngoại (IR) nhưng Folin - Ciocalteu vẫn được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu polyphenol vì tính đơn giản, dễ thực hiện và không cần nhiều máy móc, kỹ thuật phức tạp.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong lá chùm ngây bằng phương pháp quang phổ UV-VIS, dựa vào phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Phương pháp xây dựng phù hợp với hệ thống quang phổ UV-VIS, đảm bảo tính đặc hiệu chọn lọc, độ đúng cao với tỷ lệ % chất chuẩn tìm lại từ 98,79% - 101,93%, trung bình 99,85% và RSD = 1,22% và độ chính xác cao. Hàm lượng polyphenol toàn phần của lá chùm ngây được xác định bằng phương pháp đã xây dựng là $23,2983 \pm 0,2009$ mg/g tính theo acid gallic (theo dược liệu khô tuyệt đối).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Anwar F. Latif S. Ashraf M. Gilani A. H., "Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal use", *Phytother Res*, Vol. 21, pp.17-25, 2007.
- [2]. Phí Thị Cẩm Miện, Trần Văn Thái, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương, Đỗ Thị Thảo, "Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết chùm ngây (*Moringa oleifera*) trên chuột gây tổn thương gan bằng carbon tetrachloride (CCl₄)", *Vietnam J. Agri. Sci.*, T. 15, S. 2, tr. 225-233, 2017.
- [3]. Johnson, "Clinical perspectives on the health effects of *Moringa oleifera*: a promising adjunct of balance nutrition and better health", *KOS health Publication*, pp. 1-5, 2005.
- [4]. ISO 14502-1, *Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent*, 2005.
- [5]. AOAC Internation, *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*, 2013.
- [6]. Carl H. Beckman, "phenolic- storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?", *Physiological and molecular plant pathology*, Vol. 57, No.3, pp.101-110, 2000.
- [7]. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB, "Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence", *J. Med. Food*, Vol. 8, No. 3, pp. 281-290, 2005.
- [8]. Arts IC, Hollman PC, "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies", *Am. J. Clin. Nutr.*, Vol. 81, pp. 317-325, 2005.
- [9]. Moyo B., Oyedemi S., Masika P. J., Muchenje V., "Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake", *Meat Sci.*, Vol. 91, No.4, pp. 441-447, 2012.
- [10]. Slinkard Karen, Singleton Vernon L., "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods", *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 28, No. 1, pp. 49-55, 1977.

