

5. Nguyễn Văn Nu (2020), “Nghiên cứu kiến thức, thái độ về phòng, chống HIV/AIDS trước và sau can thiệp của sinh viên các trường trung cấp, cao đẳng, đại học trên địa bàn Tỉnh Bến Tre năm 2019-2020”, Luận văn Thạc sĩ. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.
6. Thủ Tướng Chính Phủ (2012), Chiến lược Quốc gia Phòng, chống HIV/AIDS ở Việt Nam đến 2020 và tầm nhìn 2030.
7. Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật thành phố Cần Thơ (2021), Kết quả hoạt động phòng, chống HIV/AIDS năm 2020 và Kế hoạch, phương hướng nhiệm vụ năm 2021.
8. Huỳnh Thị Như Thúy (2020), “Khảo sát sự hiểu biết về việc phòng chống HIV/AIDS của sinh viên khóa 15DDS Đại học Nguyễn Tất Thành”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, số 12, tr.70-74.
9. UNAIDS (2020), Global AIDS update 2020.

(Ngày nhận bài: 17/5/2022 – Ngày duyệt đăng: 04/7/2022)

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG POLYPHENOL TOÀN PHẦN TRONG CAO ĐẶC RAU CÀNG CUA (*PEPEROMIA PELLUCIDA* (L.) KUNTH) BẰNG QUANG PHỔ UV-VIS

*Nguyễn Ngọc Nhã Thảo**, *Tổng Thành Long*, *Đặng Duy Khánh*,
Nguyễn Thị Trang Đài

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

**Email: nnnthao@ctump.edu.vn*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Rau Càng cua-*Peperomia pellucida* (L.) Kunth chứa nhiều hợp chất polyphenol có tác dụng tốt cho tim mạch, huyết áp, góp phần chữa đái tháo đường... Để kiểm soát chất lượng của cao đặc bào chế từ dược liệu này, việc xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong cao bằng quang phổ UV-VIS là cần thiết. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc rau Càng cua bằng quang phổ UV-VIS. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Cao đặc rau Càng cua, 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 ICH. **Kết quả:** Đã thẩm định phương pháp trên các tiêu chí: Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác. Các tiêu chí đều đáp ứng yêu cầu của phương pháp định lượng theo quy định. **Kết luận:** Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc rau Càng cua bằng quang phổ UV-VIS.

Từ khóa: Rau Càng cua (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth), cao đặc rau Càng cua, UV-VIS, Polyphenol toàn phần.

ABSTRACT

UV-VIS SPECTROMETRY QUANTIFICATION OF
TOTAL POLYPHENOLS FROM EXTRACT OF
PEPEROMIA PELLUCIDA (L.) KUNTH.

Nguyen Ngoc Nha Thao*, Tong Thanh Long, Dang Duy Khanh,
Nguyen Thi Trang Dai

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: *Peperomia pellucida* (L.) Kunth has polyphenol compounds, play an important role in preventing diabetes, hypertension... It is necessary to develop and validate a quantitative analysis procedure of total polyphenols in the extract of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth using UV-VIS method to control the quality of it. **Objectives:** To validate a quantitative analysis procedure of total polyphenols in the calyces of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth extract using UV-VIS method. **Material and methods:** The extract of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth, determining total polyphenols using UV-VIS method based on reaction between polyphenols and folin-ciocalteu reagent; validate this procedure according to ICH guidelines. **Results:** The quantitative analysis was performed by reaction between total polyphenols and folin-ciocalteu reagent with detective wavelength of 765nm; the method was ensured to the system suitability testing, precision, linearity, recovery, accuracy. **Conclusions:** The quantitative analysis procedure of total polyphenols from *Peperomia pellucida* (L.) Kunth extract using UV-VIS method was validated.

Keywords: *Peperomia pellucida* (L.) Kunth; UV-VIS; total polyphenol.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Rau Càng cua có tên khoa học *Peperomia pellucida* (L.) Kunth, họ Hồ tiêu (Piperaceae). Rau Càng cua có vị hơi chua chua và mọng nước, có tác dụng giải khát, chữa bệnh ngoài da rất tốt, ngoài ra có tác dụng tốt cho tim mạch, huyết áp, góp phần chữa Đái tháo đường... Theo nghiên cứu ban đầu, nhóm hoạt chất chính trong rau Càng cua là polyphenol. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của các tác giả trên thế giới [2], [4]. Polyphenol là nhóm hợp chất quan trọng, có nhiều tác dụng: Chống oxy hóa, chống ung thư, chống béo phì, hạ huyết áp [5], [6], [7]. Rau Càng cua được sử dụng nhiều ở Việt Nam. Tuy nhiên, dược liệu này cũng như chế phẩm cao đặc từ dược liệu này chưa có chuyên luận trong Dược điển Việt Nam V [1]. Việc định lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc rau Càng cua có ý nghĩa quan trọng trong kiểm tra, kiểm soát chất lượng của chế phẩm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cao đặc ethanol rau Càng cua được bào chế từ rau Càng cua (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) được thu hái tại quận Ô Môn, thành phố Cần Thơ đạt yêu cầu về độ ẩm dưới 20%. Hóa chất và dung môi: Chất chuẩn acid gallic, hàm lượng $\geq 98\%$ (Công ty Sigma Aldrich, Mỹ); Thuốc thử folin-ciocalteu (Công ty Nanjing Duly Biotech, Trung Quốc). Các dung môi, hóa chất trong phòng thí nghiệm: ethanol, natri carbonat... đạt tiêu chuẩn phân tích.

Thiết bị nghiên cứu: Tủ sấy Memmert. - Cân đo độ ẩm MX50 AND - Máy quang phổ UV-VIS V-730 (Kern - Đức). - Cân phân tích Kern AES độ chính xác 0,0001g - Bê

siêu âm Daihan WUC-D22H (Hàn quốc) - Pipet chính xác, bình định mức các loại - Cốc cố mỏ, bình nón, ống nghiệm các loại và dụng cụ khác đạt tiêu chuẩn phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Định lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc bằng phương pháp đo quang sau khi phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu ở bước sóng 765nm. Hàm lượng polyphenol toàn phần được tính theo acid gallic.

- Dung dịch chuẩn acid gallic: Cân chính xác khoảng 10,0mg acid gallic chuẩn, hòa tan trong nước cất để được 100ml dung dịch chuẩn gốc (nồng độ 100µg/ml).

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,1g cao (xác định độ ẩm <20%) cho vào bình cầu, chiết bằng thiết bị chiết siêu âm ở nhiệt độ 40⁰C, thời gian 30 phút bằng 45ml nước cất. Lọc thu dịch chiết và bổ sung trong bình định mức 50ml bằng nước cất.

- Phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu: Hút chính xác 1,0ml dung dịch thử cho vào ống nghiệm, thêm 5,0ml thuốc thử folin-ciocalteu đã chuẩn bị ở trên, lắc đều trong 2 phút. Để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Thêm 4,0ml dung dịch Na₂CO₃ 7,5%. Lắc đều trong 2 phút, đậy kín, để yên ở nhiệt độ phòng trong 60 phút.

Thẩm định phương pháp:

Thẩm định theo quy định của ICH [3] các chỉ tiêu sau:

- Tính đặc hiệu.

- Tính tương thích hệ thống.

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

- Độ chính xác: Chuẩn bị các mẫu thử trong cùng 1 ngày (n=5) và khác ngày (n=5). Xác định nồng độ theo đường chuẩn.

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

Hàm lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc rau Càng cua theo acid gallic được tính theo công thức:

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

Trong đó:

$C_{\text{thực}}$: 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 cao đặc (g).

H: Hàm ẩm của cao đặc rau Càng cua (%).

- 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:

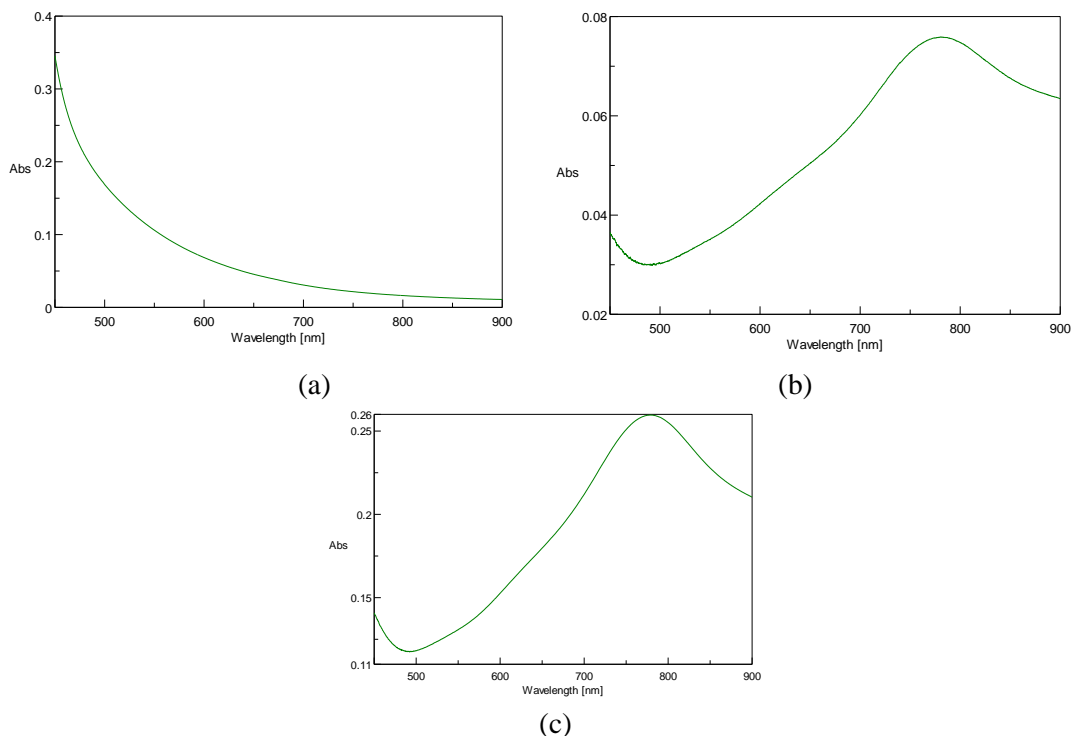
Tỷ lệ % tìm lại = $(C_{\text{mẫu thử thêm chuẩn}} - C_{\text{mẫu thử}}) / C_{\text{thêm vào}} \times 100$

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thẩm định phương pháp

- Tính đặc hiệu:

Tiến hành pha các mẫu dung dịch thử và dung dịch chuẩn, thực hiện phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu. Quét phổ từ bước sóng 450 đến 900nm các mẫu để kiểm tra tính đặc hiệu. Kết quả các phổ đồ ở hình 1 cho thấy tại đỉnh hấp thụ 765nm của mẫu cần định lượng không có sự hấp thụ trên mẫu nền. Như vậy, quy trình đạt tính đặc hiệu.



Hình 1. Phổ đồ tính đặc hiệu

a. Dung dịch thử chưa phản ứng với thuốc thử; b Dung dịch chuẩn đã phản ứng với thuốc thử; c. Dung dịch thử đã phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu

- Tính tương thích hệ thống:

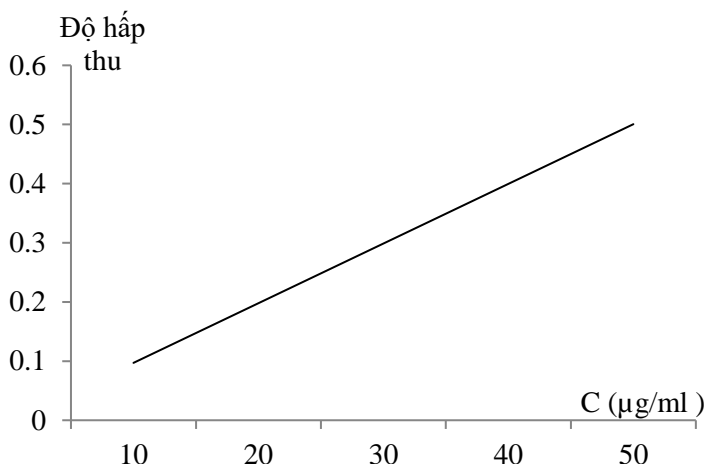
Pha dung dịch acid gallic chuẩn có nồng độ $10\mu\text{g/ml}$ từ dung dịch chuẩn gốc. Hút chính xác $1,0\text{ml}$ dung dịch này, thực hiện phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 765nm . Thực hiện đồng thời 6 mẫu. Độ hấp thụ đo được là $0,0986\pm 0,0012$ (RSD=1,2%). Kết quả này 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 quang phổ UV-VIS.

- Xác định khoảng tuyến tính:

Lấy chính xác 1, 2, 3, 4, 5ml dung dịch chuẩn gốc cho vào các bình định mức 10ml. Bổ sung tới vạch bằng nước cất. Lắc đều, thu được các dung dịch có nồng độ tương đương 10, 20, 30, 40, $50\mu\text{g/ml}$ acid gallic. Hút chính xác $1,0\text{ml}$ các dung dịch trên cho vào các ống nghiệm. Thực hiện phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu. Song song làm một mẫu trắng. Đo độ hấp thụ của các mẫu ở bước sóng 765nm . Mối tương quan giữa nồng độ và độ hấp thụ của acid gallic chuẩn được thể hiện trong bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Độ hấp thu của dung dịch chuẩn ở các nồng độ (n=3)

STT	C(µg/ml)	A (TB ± SD)
1	10	0,0996 ± 0,002
2	20	0,1965 ± 0,001
3	30	0,2994 ± 0,002
4	40	0,3918 ± 0,002
5	50	0,5064 ± 0,001



Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thu vào nồng độ acid gallic chuẩn

Kết quả: Độ hấp thu và nồng độ acid gallic có tương quan tuyến tính với hệ số tương quan $R^2 = 0,9990$ và phương trình hồi quy tuyến tính là $y = 0,0101x - 0,0039$. Trong đó: y: Độ hấp thu của dung dịch; x: Nồng độ của dung dịch acid gallic chuẩn (µg/ml).

- Khảo sát độ chính xác:

Thực hiện quy trình xử lý mẫu thử trong ngày và ngày tiếp theo trên cùng 1 mẫu cao (lặp lại 5 lần mỗi ngày). Tiến hành phản ứng với thuốc thử folin-ciocalteu và đo độ hấp thu ở bước sóng 765nm. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ chính xác trong ngày và khác ngày

Độ chính xác	Hàm lượng polyphenol toàn phần (mg/g)
Trong ngày (n = 5) (TB ± SD)	12,44 ± 0,16* RSD = 0,84%
Khác ngày (n = 5) (TB ± SD)	12,58 ± 0,01* RSD = 0,05%

*: Nồng độ ngoại suy từ đường chuẩn.

Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối trong ngày và khác ngày đều <2%. Như vậy, phương pháp có độ chính xác cao và đạt yêu cầu phân tích.

- Khảo sát độ đúng:

Thực hiện theo phương pháp thêm chuẩn. Thêm lần lượt 1,0ml dung dịch chuẩn có nồng độ là 10, 20 và 30µg/ml vào các ống nghiệm chứa 1,0ml dung dịch thử. Mỗi mức nồng độ thêm làm 3 mẫu. Thực hiện phản ứng với thuốc thử 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.

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

STT	Lượng thêm vào (µg)	Lượng tìm lại (µg)	Tỷ lệ (%) tìm lại
1	10	10,13	101,30
2	10	10,27	102,70
3	10	10,39	103,90
4	20	20,32	101,60
5	20	20,53	102,65
6	20	20,65	103,25
7	30	30,29	100,97
8	30	30,35	101,17
9	30	30,56	101,86
			TB=102,16%, RSD=0,99%

Nhận xét: Phương pháp định lượng có độ đúng cao với tỷ lệ % chất chuẩn tìm lại từ 100,97%-103,90%, trung bình 102,16% và RSD=0,99%.

3.2. Xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong mẫu cao đặc rau Càng cua

Bảng 4. Hàm lượng polyphenol toàn phần trong rau Càng cua

STT	Hàm lượng polyphenol toàn phần (mg/g)			
	Cao ethanol	Cao methanol	Cao ethyl acetat	Cao nước
1	12,75	11,55	14,29	13,90
2	12,77	11,59	14,31	13,98
3	12,76	11,58	14,29	13,99
TB ± SD	12,76 ± 0,01	11,57 ± 0,02	14,30 ± 0,01	13,94 ± 0,705

Nhận xét: Áp dụng quy trình đã thẩm định để xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong mẫu cao đặc nghiên cứu. Kết quả thực nghiệm cho thấy, hàm lượng trong cao ethanol đạt 12,76±0,01mg/g (theo khối lượng dược liệu khô tuyệt đối) tính theo acid gallic. Bên cạnh đó, quy trình cũng được áp dụng để định lượng các mẫu cao methanol, ethyl acetat, nước với các kết quả được trình bày trong bảng 4. Kết quả này giúp phần nào đánh giá hàm lượng polyphenol của các mẫu cao chiết.

IV. BÀN LUẬN

Nhiều nghiên cứu cho thấy polyphenol là thành phần chính trong dịch chiết nước và ethanol của rau Càng cua [4], [5], [6]. Dịch chiết polyphenol của rau Càng cua có tác dụng hạ lipid máu, hạ đường huyết trên động vật thực nghiệm và trên người [4], [5]. Do đó, hàm lượng polyphenol toàn phần là tiêu chí quan trọng để đánh giá chất lượng của cao đặc bào chế từ dược liệu này. Để xác định hàm lượng polyphenol toàn phần, có thể sử dụng nhiều phương pháp như HPLC, quang phổ UV-VIS. Tuy nhiên, phương pháp quang phổ UV-VIS được sử dụng để xác định hàm lượng polyphenol toàn phần vì đơn giản và tương đối chính xác. Ngoài ra, so với phương pháp HPLC, quang phổ UV-VIS còn ít tốn kém hơn. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao (102,16%) và độ lặp lại tốt (RSD=0,99%). Do vậy, phương pháp này có thể được ứng dụng để xây dựng chỉ tiêu định lượng cao đặc bào chế từ rau Càng cua.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp quang phổ UV-VIS dựa vào phản ứng tạo màu với thuốc thử folin-ciocalteu để định lượng polyphenol toàn phần trong cao đặc rau Càng cua. Phương pháp xây dựng phù hợp với hệ thống quang phổ UV-VIS, đảm bảo độ chọn lọc đặc hiệu, độ đúng cao với tỷ lệ thu hồi trung bình 102,16% và độ chính xác cao (RSD<2,0%). Áp dụng phương pháp đã xây dựng để xác định hàm lượng polyphenol toàn phần trong các mẫu cao đặc rau Càng cua, cho thấy hàm lượng polyphenol toàn phần trong mẫu cao đặc ethanol đạt $12,76 \pm 0,01$ mg/g tính theo acid gallic (theo mẫu cao khô tuyền đối).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2018), Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Phùng Thị Bích Hòa (2019), “Nghiên cứu thành phần hóa sinh, giá trị dinh dưỡng và chữa bệnh của dịch chiết thân và lá cây Càng cua (*Peperomia pellucida*)”, Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Huế.
3. Ajay, S. & Rohit, S. (2012), “Validation Of Analytical Procedures: A Comparison of ICH vs Pharmacopoeia (USP) vs FDA”, *Int. Res. J. Pharm*, 3, pp.39-44.
4. Olajumoke Omolara Ojo, Soretiwa Sunday Ajayi, Lawrence Olawale Owolabi (2012), “Phytochemical screening, anti-nutrient composition, proximate analyses and the antimicrobial activities of the aqueous and organic extracts of bark of *Rauvolfia vomitoria* and leaves of *Peperomia pellucida*”, *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 2(6), pp.127-134.
5. Merlin Mathew, Jyoti Harindran (2018), “Antioxidant and free radical scavenging activity of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth: an in vitro study”, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(17), pp.1218-1227.
6. Nanang Yunarto, Hanief Mulia Ar Rossyid, Lisa Andriani Lienggonegoro (2018), “Effect of ethanolic leaves extract of *Peperomia pellucida* (L) Kunth as antimalarial and antioxidant”, *Media Litbangkes*, 28(2), pp.123-130.
7. Kanedi, M., Busman, S. H., Mandasari, R. A., & Pratami, G. D. (2019), “Plant extracts of suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth) ameliorate infertility of male mice with alloxan-induced hyperglycemia”, *International Journal of Biomedical Research*, 10(2), pp.5039.

(Ngày nhận bài: 26/5/2022 – Ngày duyệt đăng: 20/6/2022)
