Định lượng flavonoid toàn phần trong cao khô Rau đắng đất (*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC.) bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

Nguyễn Thị Kim Liên*, Chế Quang Minh, Nguyễn Hương Thư

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành,
*ntklien@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Rau đắng đất (*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC, Molluginaceae) với thành phần flavonoid có khả năng ức chế vi sinh vật, được xem như một nguồn nguyên liệu kháng sinh thực vật đầy hứa hẹn để bào chế thuốc kháng khuẩn dùng ngoài. Để tiến hành tiêu chuẩn hóa chế phẩm bước đi đầu tiên là xây dựng và thẩm định qui trình định lượng hoạt chất trong nguyên liệu đầu vào. Cao khô Rau đắng đất được xác định hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo quercetin bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis với thuốc thử tạo phức là nhôm nitrat ở bước sóng 418nm cho kết quả 2,621mg quercetin/1g cao khô. Phương pháp đã được thẩm định và đạt tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng.

® 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 30.10.2018
Được duyệt 20.02.2019
Công bố 26.03.2019

Từ khóa
Glinus oppositifolius, rau đắng đất, flavonoid, quercetin, đo quang UV-Vis

1 Đặt vấn đề

Rau đắng đất (*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae) là một loài cỏ dại phổ biến ở vùng nhiệt đới châu Á. Theo y học cổ truyền, Rau đắng đất (RDD) có tác dụng lợi tiểu, nhuận gan, hạ nhiệt; dịch chiết từ RDD trị ngứa và bệnh ngoài da. Nhiều công trình nghiên cứu trong và ngoài nước đã chứng minh dược liệu này có tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm rất tốt, ngoài ra còn có tác dụng chống oxi hóa, kháng viêm và kích thích tái sinh mô [1,3].

Dược liệu RDD dạng tươi hoặc dạng phơi khô có nồng độ hoạt chất dao động giữa các lần thu hoạch do bị ảnh hưởng bởi các điều kiện trồng trọt, thu hái và xử lí, bảo quản. Cao khô điều chế từ dược liệu có chất lượng ổn định hơn nên thích hợp sử dụng làm nguyên liệu điều chế sản phẩm. Hiện nay, Công ty BV Pharma đã sản xuất và thương mại hóa sản phẩm cao khô Rau đắng đất. Tuy nhiên, chỉ tiêu định lượng trong mẫu cao do BV Pharma cung cấp chỉ dựa trên hàm lượng chất chiết được trong ethyl acetat nên có tính ứng dụng không cao. Hơn nữa, các nghiên cứu hiện có chưa đề cập đến vấn đề chất chỉ điểm (marker) đại diện cho dược liệu RDD. Các phép định lượng tiến hành trên RDD chỉ gói gọn trong hai phương pháp đo quang phổ UV-Vis, một là định lượng phenol toàn phần tính theo acid gallic hoặc pyrocatechol, sử dụng thuốc thử Folin – Ciocalteu, hai là định lượng flavonoid toàn phần tính theo quercetin, sử dụng thuốc thử muối nhôm[3,4]. Việc định lượng hoạt chất trong nguyên liệu đầu vào đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình thiết kế công thức chế phẩm. Do đó, cần có một qui trình định lượng phù hợp để kiểm tra hàm lượng hoạt chất trong cao khô RDD.

RDD có chứa một lượng đáng kể flavonoid là thành phần có tác dụng kháng khuẩn và chống oxi hóa[2]. Vì thế, đề tài tiến hành xây dựng qui trình định lượng hoạt chất trong cao khô RDD dựa trên flavonoid toàn phần bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis với thuốc thử tạo màu nhôm nitrat. Qui trình được khảo sát điều kiện tiến hành và thẩm định các chỉ tiêu về tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Cao khô Rau đắng đất (*Extractum Glini oppositifolii siccum*) được cung cấp bởi BV Pharma, Việt Nam.

Chất đối chiếu quercetin do Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh cung cấp, độ tinh khiết 91,3%. Ethanol, nhôm nitrat, natri acetat, acid acetic do Trung Quốc sản xuất. Các thuốc thử đều thuộc loại tinh khiết phân tích.

Trang thiết bị nghiên cứu gồm có máy đo quang phổ UV-Vis Shimadzu, cân phân tích Ohaus PA214 và các dụng cụ thường qui của phòng thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xây dựng qui trình định lượng flavonoid trong cao khô Rau đắng đất bằng phương pháp quang phổ UV – Vis sau khi tạo phức với $Al(NO_3)_3$

Pha chế các dung dịch thử nghiệm:

Dung môi A: dung môi ethanol 80% có 5% acid acetic; dùng trong vòng 6 giờ sau khi pha.

Dung dịch đối chiếu: cân chính xác 10mg quercetin cho vào bình định mức 100ml, hòa tan và điền đến vạch bằng dung môi A.

Dung dịch thử: Khảo sát sơ bộ nhiều tỉ lệ trong mối tương quan với độ hấp thu của dung dịch đối chiếu. Dung dịch thử được pha bằng cách cân chính xác các mẫu cao RDD 0,50g; 1,00g; 1,50g và 2,00g cho vào cốc khuấy kĩ với 50ml dung môi A rồi cho vào bình định mức 100ml, tráng kĩ cốc và điền đến vạch bằng dung môi A; lắc đều, lọc qua giấy lọc thu dung dịch thử.

Các thuốc thử: Dung dịch $Al(NO_3)_3$ 10%, dung dịch natri acetat 10% được pha trong dung môi A.

Mẫu trắng (không có thuốc thử) là dung dịch tương ứng với từng mẫu đo nhưng không có thuốc thử $Al(NO_3)_3$ 10%.

Các mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn và các mẫu trắng tương ứng được pha bằng cách cho lần lượt dung dịch đối chiếu và/hoặc dung dịch thử, dung dịch natri acetat 10%, thuốc thử $Al(NO_3)_3$ 10% (đối với mẫu đo). Các mẫu được để ổn định 45 phút ở nhiệt độ phòng tạo điều kiện cho quá trình tạo phức xảy ra hoàn toàn. Sau đó tiến hành đo thăm dò độ hấp thu của các mẫu ở bước sóng tham khảo 415nm[3,5], chọn ra nồng độ thích hợp của dung dịch thử sao cho mẫu thử có độ hấp thu tương ứng với mẫu chuẩn.

Pha lại mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn theo cách tương tự, tiến hành quét phổ các mẫu trong vùng bước sóng từ 380 – 600nm để chọn ra bước sóng định lượng phù hợp.

2.2.2 Thẩm định qui trình định lượng

Qui trình được thẩm định về tính đặc hiệu, xác định khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và ứng dụng để xác định hàm lượng flavonoid trong mẫu cao.

Khảo sát tính đặc hiệu

Dò tìm tỉ lệ thuốc thử phù hợp, sau khi thêm đầy đủ các thành phần, lắc đều. Để yên 45 phút rồi tiến hành quét phổ các mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn từ đó khảo sát tính đặc hiệu và chọn bước sóng định lượng.

Khảo sát tính tuyến tính

Khảo sát tính tương quan giữa nồng độ và độ hấp thu của quercetin. Pha dãy dung dịch quercetin ở các nồng độ khác nhau 0,100; 0,200; 0,300; 0,400; 0,500mg/ml, phối hợp với thuốc thử. Tiến hành đo độ hấp thu ở bước sóng đã chọn. Thiết lập phương trình hồi qui y = ax + b. Tính tương thích của phương trình hồi qui y = f(x) được đánh giá bằng trắc nghiệm F. Ý nghĩa của hệ số a và b được đánh giá bằng trắc nghiệm t.

Khảo sát độ chính xác:

Pha 6 mẫu có nồng độ khoảng 0,100mg/ml và thực hiện phản ứng tạo phức riêng lẻ, đo độ hấp thu và tính hàm lượng flavonoid toàn phần theo quercetin. Xử lí thống kê, xác định độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Phương pháp đạt độ chính xác khi RSD ≤ 2%.

Công thức: $SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ với x_i là giá trị đo được thứ i, $\bar{x}$ là giá trị trung bình, n là số lần đo

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Khảo sát độ đúng:

Thêm lượng chất chuẩn tương ứng với 80%, 100%, 120% hàm lượng trung bình của quercetin có trong mẫu thử. Tiến hành thử 3 lần ở mỗi mức, ghi nhận độ hấp thu ở bước sóng đã chọn. Xác định tỉ lệ hồi phục trung bình. Phương pháp đạt độ đúng khi tỉ lệ hồi phục ở mỗi nồng độ riêng biệt có giá trị trong khoảng 100 ± 2% với RSD ≤ 2%.

2.2.3 Định lượng flavonoid toàn phần trong cao khô Rau đắng đất

Định lượng cao RDD theo qui trình đã được thẩm định. Tiến hành 3 lần lấy kết quả trung bình.

Công thức tính hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao RDD khi định lượng bằng phương pháp quang phổ UV – Vis:

$$X = \frac{A_t + b}{ap} K$$

Với X (mg/kg) là hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao; a; b là các hệ số trong phương trình tuyến tính của chuẩn y = ax + b; A_t là độ hấp thu ở bước sóng định lượng của mẫu thử, p là lượng cân thực tế (g), K là hệ số pha loãng

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Xây dựng qui trình định lượng

Pha các mẫu theo tỉ lệ ở Bảng 1, để ổn định 45 phút, đo độ hấp thu ở 415nm. Kết quả được trình bày trong Bảng 2 cho thấy nồng độ dung dịch thử 1g/100ml là phù hợp nhất để pha mẫu thử, vì nồng độ này cho mẫu thử có độ hấp thu nằm trong vùng 0,2 – 0,8 và có giá trị gần với mẫu chuẩn nhất. Vậy dung dịch thử sẽ được pha từ 1g cao khô, thêm dung môi A vừa đủ 100ml, lọc lấy dịch.

Bảng 1 Chuẩn bị mẫu đo quang

Mẫu	Chuẩn	Trắng chuẩn	Thử	Trắng thử
Dung dịch đối chiếu (ml)	1	1	0	0
Dung dịch thử (ml)	0	0	5	5
$Al(NO_3)_3$ 10% (ml)	1	0	1	0
CH_3COONa 1M (ml)	1	1	1	1
Ethanol 80% có 5% acid acetic	Vừa đủ 25ml			

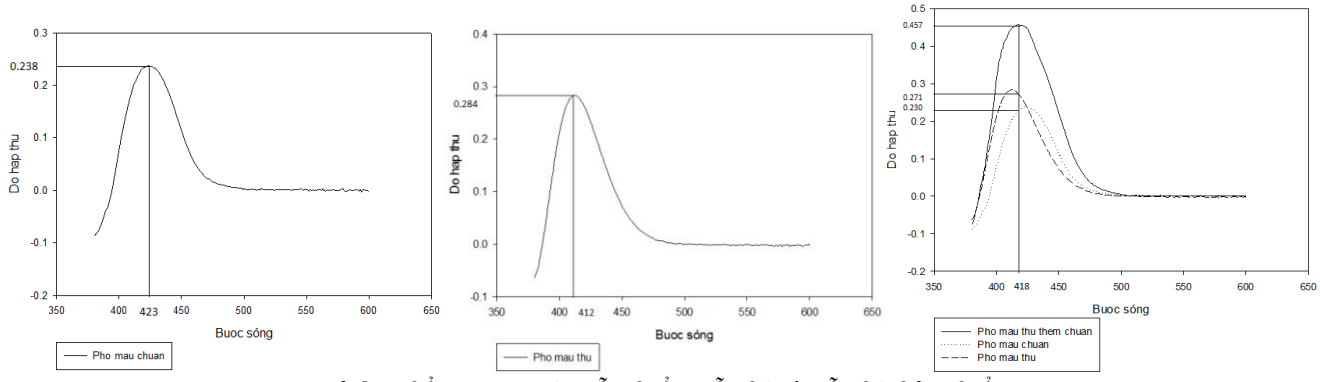
Bảng 2 Kết quả đo độ hấp thu các mẫu thử nghiệm ở 415nm

Mẫu	Độ hấp thu
Chuẩn	0,219
Thử 0,5 g/100 ml	0,138
Thử 1,0 g/100 ml	0,280
Thử 1,5 g/100 ml	0,425
Thử 2,0 g/100 ml	0,547

3.2 Thẩm định qui trình

3.2.1 Tính đặc hiệu

Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của qui trình định lượng được trình bày trong Hình 1. Mẫu thử và mẫu chuẩn có hình dạng phổ tương tự với duy nhất một đỉnh trong vùng bước sóng khảo sát. Tuy nhiên, đỉnh hấp thu của mẫu thử và mẫu chuẩn không trùng khớp; cụ thể, đỉnh của mẫu chuẩn ở bước sóng 423nm và mẫu thử là 412nm, cách nhau 11nm. Điều này có thể là do mẫu thử được pha từ cao dược liệu có thành phần chất tan phức tạp, còn mẫu chuẩn được pha từ chất tinh khiết. Khi quét phổ của mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện đỉnh hấp thu chung ở 418nm, nằm giữa hai đỉnh của chất chuẩn và mẫu thử; đồng thời khi thêm chất chuẩn vào mẫu thử và thực hiện phản ứng thì độ hấp thu của mẫu thử tăng lên rõ rệt so với lúc chưa thêm chất chuẩn (Bảng 2). Kết quả đo độ hấp thu ở bước sóng 418nm cho thấy có sự phù hợp giữa các giá trị hấp thu của mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Do đó có thể kết luận phương pháp định lượng flavonoid toàn phần theo quercetin bằng quang phổ UV – Vis đạt yêu cầu về tính đặc hiệu và bước sóng 418nm được chọn để đo độ hấp thu của các mẫu.



Hình 1 Phổ UV – Vis của mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn

Bảng 3 Kết quả khảo sát tính đặc hiệu

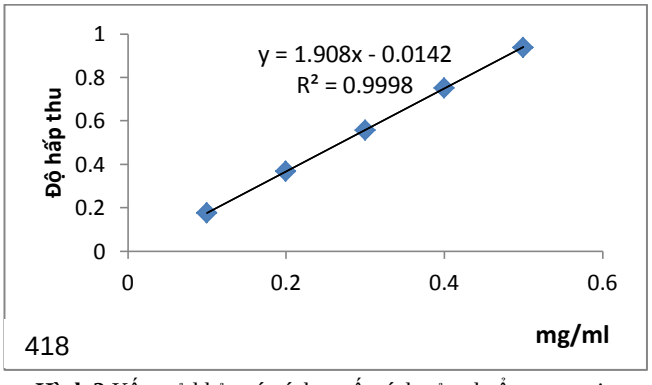
Mẫu	Bước sóng (nm)	Độ hấp thu
Mẫu chuẩn	418	0,230
Mẫu thử	418	0,271
Mẫu thử thêm chuẩn	418	0,457

3.1.2 Tính tuyến tính

Tương quan giữa nồng độ và độ hấp thu của dung dịch quercetin chuẩn được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4 Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Lượng quercetin (mg/ml)	0,100	0,200	0,300	0,400	0,500
Độ hấp thu ở 418 nm	0,176	0,368	0,557	0,752	0,938



Hình 2 Kết quả khảo sát tính tuyến tính của chuẩn quercetin

Các số liệu cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thu của quercetin theo phương trình y = 1,908x – 0,0142 với R^2 = 0,9998; trong khoảng hàm lượng quercetin từ 0,100 – 0,500mg/ml. Sử dụng trắc nghiệm t và F cho thấy cả hai hệ số (a=1,908 và b = 0,0142) trong phương trình hồi qui đều có ý nghĩa và phương trình hồi qui tương thích.

3.1.3 Độ chính xác

Từ 6 lần cân và thực hiện phản ứng tạo phức riêng lẻ, đo độ hấp thu và tính hàm lượng flavonoid toàn phần theo quercetin (mg/g) của cao RDD được kết quả như Bảng 5.

Bảng 5 Kết quả khảo sát độ chính xác của mẫu thử

Lần thử	Khối lượng mẫu thử (g)	A 418	Hàm lượng flavonoid toàn phần tính theo quercetin (mg/g)	Kết quả
1	1,0018	0,2363	2,621	$\bar{X} = 2,6196$
2	1,0014	0,2356	2,615	SD = 0,0052
3	1,0021	0,2369	2,623	RSD = 0,20%
4	1,0015	0,2367	2,626	e = ± 0,0061
5	1,0013	0,2358	2,617	μ = 2,6196 ± 0,0061
6	1,0008	0,2352	2,612	

Kết quả có RSD < 2% nên qui trình định lượng đạt độ chính xác.

3.1.4 Độ đúng

Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày trong Bảng 6. Tỉ lệ hồi phục trung bình ở mỗi mức đều nằm trong giới hạn cho phép. Phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 6 Kết quả khảo sát độ đúng

Tỉ lệ chuẩn thêm vào (%)	Thêm chuẩn (mg)	Tìm thấy (mg)	Tỉ lệ hồi phục (%)	Tỉ lệ hồi phục trung bình (%) và RSD (%)
	2,1	4,709	99,55	99,71 0,29
80	2,1	4,719	100,05	
	2,1	4,709	99,55	
	2,5	5,138	100,69	100,55 0,24
100	2,5	5,138	100,69	
	2,5	5,128	100,28	
	3,0	5,641	100,65	101,00 0,35
120	3,0	5,652	101,00	
	3,0	5,662	101,35	

3.2 Ứng dụng

Qui trình đã thẩm định được ứng dụng để định lượng flavonoid toàn phần trong cao khô Rau đắng đất, tiến hành đo 3 lần lấy kết quả trung bình. Hàm lượng flavonoid toàn phần được ghi nhận là 2,621mg quercetin/1g cao khô RDD.

Bảng 7 Hàm lượng flavonoid trong cao khô Rau đắng đất

Mẫu	Lượng cân (g)	Độ hấp thu	Hàm lượng flavonoid (mg quercetin/g)
1	1,0018	0,236	2,618
2	1,0028	0,237	2,626
3	1,0012	0,236	2,620
Hàm lượng trung bình			**2,621**

Tuy nhiên, số liệu thu được không lặp lại các kết quả trong các công bố quốc tế về thành phần flavonoid trong RDD do các bài báo này định lượng trên mẫu cao ethanol.

Tiếp tục tinh chế mẫu cao RDD bằng ethanol 90%, thu được cao ethanol RTC (độ ẩm 14,5%). Tiến hành định lượng cao RTC bằng qui trình đã xây dựng.

Bảng 8 Hàm lượng flavonoid trong cao RTC

Mẫu	Lượng cân (g)	Độ hấp thu	Hàm lượng flavonoid (mg quercetin/g)
1	0,5011	0,335	7,305
2	0,5017	0,336	7,317
3	0,5004	0,334	7,294
Hàm lượng trung bình			**7,305**

Hàm lượng này tăng 2,8 lần so với cao khô ban đầu và phù hợp với kết quả của nhóm tác giả Mandal và cộng sự (2012).

Kết quả định lượng trên cao khô ban đầu và cao sau khi tinh chế cho thấy qui trình định lượng có tính ứng dụng và có sự phù hợp với các nghiên cứu đã được công bố.

4 Kết luận và đề xuất

Quercetin được chọn là chất đối chiếu để có thể so sánh kết quả với các qui trình định lượng flavonoid toàn phần của Rau đắng đất trong các nghiên cứu trước đây. Việc thiết kế mẫu trắng khác biệt: mẫu thử có thuốc thử nhôm nitrat và mẫu trắng không có tác nhân này đã giúp qui trình có tính chọn lọc hơn.

Qui trình đã được khảo sát các nồng độ, cũng như tỉ lệ sử dụng của thuốc thử và mẫu thử để tạo mẫu đo phù hợp nhất:

phức tạo thành trong suốt, đạt yêu cầu định lượng bằng quang phổ UV-Vis.

Qui trình đạt các yêu cầu thẩm định, các kết quả đều nằm trong giới hạn cho phép. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong mẫu cao khô là 2,621mg quercetin/1g cao.

Đề tài đã xây dựng và thẩm định qui trình định lượng được flavonoid toàn phần trong cao khô RDD tính theo quercetin bằng quang phổ UV – Vis đã góp phần vào công tác kiểm tra nhanh hàm lượng nguyên liệu đầu vào, có thể triển khai vào thực tế sản xuất của các xí nghiệp dược phẩm trong nước.

Hơn nữa, quercetin tuy là một chất chuẩn thường được dùng trong các phương pháp định lượng flavonoid toàn phần (do là thành phần phổ biến trong nhiều loại dược liệu) nhưng lại không có trong thành phần flavonoid của Rau đắng đất. Chính vì thế, kết quả thẩm định tính đặc hiệu của qui trình định lượng flavonoid trong cao RDD tính theo quercetin chưa có tính thuyết phục cao. Do đó, để qui trình có độ đặc hiệu cao hơn, cần phải tìm một chất chỉ điểm khác từ chính những flavonoid đã được phân lập từ RDD như vitexin hoặc vicenin-2. Đây là một hướng nghiên cứu mới vì hiện tại chưa tìm thấy bất kì công bố nào về chủ đề này.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quĩ Phát triển khoa học và công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành trong đề tài mã số 2018.01.35/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1.Shi-Yuan Sheu et al. (2014), "Recent progress in *Glinus oppositifolius* research", *Pharmaceutical Biology*; 52(8): 1079–1084.

2.Juliana Janet R. Martin-Puzon et al. (2015), "TLC profiles and antibacterial activity of *Glinus oppositifolius* L. Aug. DC. (Molluginaceae) leaf and stem extracts against bacterial pathogens", *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*; 5(7): 569-574.

3.K. AsokKumar, M. UmaMaheswari (2009), "Free radical scavenging and antioxidant activities of *Glinus oppositifolius* (carpet weed) using different *in vitro* assay systems", *Pharmaceutical Biology*, 47(6): 474–482.

4.Mandal et al. (2012), "Anthelmintic and free-radical scavenging potential of various fractions obtained from foliar parts of *Glinus oppositifolius* (Linn.) DC", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4): 233-239.

5.Nguyễn Hữu Lạc Thủy và cs. (2011), "Định lượng flavonoid toàn phần trong lá trinh nữ hoàng cung *Crinum latifolium* L. (Amaryllidaceae) bằng phương pháp quang phổ UV – Vis", *Y Học TP. Hồ Chí Minh*, Tập 15(1): 90-94.

Determination of total flavonoids in *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. dry extract by UV-Vis using spectrophotometry method

Nguyen Thi Kim Lien*, Che Quang Minh, Nguyen Huong Thu

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
*ntklien@ntt.edu.vn

Summary Carpet weeds (*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC, Molluginaceae), which contains flavonoids with the ability to inhibit microorganisms, are considered a promising source of plant-based antibiotics for the production of topical antibacterial formulations. In order to standardize the products, the first step is to develop and validate the process of quantifying the active ingredients in the raw materials. Carpet weed was determined by quantitating the total flavonoid content of quercetin by UV-Vis spectrophotometry method with complex aluminium nitrate reagent at 418nm, yielding 2.621mg quercetin/g dry extract. The method has been validated and achieved linearity, specificity, precision and accuracy.

Keywords *Glinus oppositifolius*, carpet weed, flavonoid, quercetin, UV-Vis spectrophotometry