

Định lượng flavonoid toàn phần trong cao lá Mơ lông (*Paederia lanuginosa* Wall.) bằng phương pháp quang phổ

Spectrophotometric method for quantification of total flavonoids in *Paederia lanuginosa* Wall. leaf extracts

Đỗ Thị Anh Thu

Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng, Tp. Hồ Chí Minh

E-mail: dtathu@hiu.vn

Tóm tắt: Mơ lông (*Paederia lanuginosa* Wall.) là một loại cây thuộc họ Cà phê (*Rubiaceae*). Kaempferol, quercetin và quercitrin là các flavonoid được phân lập từ chiết xuất lá của *P. lanuginosa*. Kaempferol (3, 5, 7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one), một hợp chất màu vàng có trọng lượng phân tử thấp (286,2 g/mol), là một hợp chất tự nhiên phổ biến. Kaempferol là một đại diện của nhóm flavonol. Phương pháp đo quang phổ UV – Vis có thể sử dụng để xác định được sự hiện diện của kaempferol. Vì vậy, xây dựng và thẩm định quy trình định lượng hàm lượng flavonoid tổng số (với chất chuẩn kaempferol) trong cao đặc *P. lanuginosa* là cần thiết. Khi dung dịch kaempferol được quét giữa các vùng bước sóng 300-400 nm, việc phát hiện kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV - Vis ở độ hấp thụ cực đại ($\lambda_{\max}$) là 365 nm với dung môi được sử dụng là ethanol. Phương pháp được đánh giá theo hướng dẫn của ICH. Kaempferol thể hiện tính tuyến tính tốt ở khoảng nồng độ 2-10 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 > 0,99$) ở bước sóng 365 nm. Độ thu hồi chính xác và trung bình nằm trong khoảng 97,13% và 98,21% ở bước sóng 365 nm. Flavonoid ở cao chiết lá *P. lanuginosa* chiếm 8,558%. Quy trình định lượng đã được xây dựng và đánh giá theo hướng dẫn của ICH dựa trên các tiêu chí sau: tính tương thích của hệ thống, tính tuyến tính và độ chính xác.

Từ khóa: Mơ lông; kaempferol; quang phổ UV – Vis.

Abstract: *Paederia lanuginosa* Wall. is a plant belonging to Rubiaceae family. Kaempferol, quercetin, and quercitrin were flavonoids isolated from the leaf extract of *P. lanuginosa*. The chemical name of kaempferol is 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one. Kaempferol is a yellow-colored compound with a low molecular weight (286.2 g/mol). Kaempferol is a representative of the flavonol group and is a common natural compound. Ultra violet (UV) – visible spectrophotometric method can be used to determine the content of kaempferol. Therefore, the development and validation of a procedure for quantifying total flavonoid content (with standard of kaempferol) in *P. lanuginosa* soft extract is necessary. The spectrophotometric detection of kaempferol was done at absorption maximum ($\lambda_{\max}$) of 365 nm using ethanol as solvent when this solution was scanned between the wavelength regions of 300-400 nm. The developed method was validated as per ICH guidelines. Kaempferol demonstrated good linearity in concentration range of 2-10 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 > 0.99$) at 365 nm. Precision and mean recoveries were found to be in the range of 97,13% and 98,21% at 365 nm. Flavonoids total of *P. lanuginosa* leaves extract account for 8,558 percent. A quantitative procedure was developed and validated according to ICH guidelines on the following criteria: system compatibility, linearity and precision.

Keywords: *Paederia lanuginosa* Wall., kaempferol, UV – Vis spectrum measurement.

1. Đặt vấn đề

Mơ lông (*Paederia lanuginosa* Wall.) là một loài dây leo thuộc họ Cà phê (Rubiaceae). Loài này phân bố nhiều nơi như Việt Nam, Indonesia, Nhật Bản,... Mơ lông là một dược liệu được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền. Các hợp chất flavonoid, iridoid glucoside, anthraquinone và tinh dầu là các thành phần hóa học chính quyết định tác dụng sinh học của loài Mơ lông. Kaempferol, quercetin và quercitrin là 3 loại flavonoid được phân lập từ dịch chiết ethanol của lá Mơ lông. Các hợp chất flavonoid của Mơ lông có hoạt tính kháng oxy hóa rất tốt [1]. Flavonoid là các hợp chất polyphenol được tìm thấy chủ yếu trong rau quả và là thành phần chính có tác dụng sinh học của các dược liệu. Flavonoid có thể ngăn ngừa nhiều nguy cơ mắc các bệnh khác nhau. Flavonoid phổ biến nhất của cây Mơ lông là kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxy flavone). Kaempferol có màu vàng và trọng lượng phân tử thấp. Kaempferol và các dẫn xuất của nó có hoạt tính chống tăng sinh, chống oxy hóa, chống viêm và chống ung thư. Kaempferol cũng có khả năng gây độc tế bào đối với các tế bào ung thư tuyến tụy và ung thư vú [2].

Việc chiết xuất các thành phần có hoạt tính sinh học từ cây thuốc là một phần của lĩnh vực nghiên cứu và bào chế thuốc có nguồn gốc từ dược liệu. Nhiều kỹ thuật chiết xuất các hoạt chất dược liệu hiện đang được sử dụng để điều chế các sản phẩm thảo dược, trong đó phương pháp ngâm được sử dụng khá phổ biến. Sau khi chiết xuất, cao chiết lỏng được cô quay để tạo cao đặc [3]. Cao đặc là một nguồn liệu có nhiều ưu thế để sản xuất các dạng bào chế như siro thuốc, viên nang, viên nén, thuốc mềm dùng cho da và niêm mạc,... Cao đặc có ưu điểm là dễ dàng lưu trữ, vận

chuyển và hàm lượng hoạt chất trong cao thường hơn nhiều lần so với dịch chiết [4].

Hiện nay, định lượng flavonoid toàn phần trong các cao chiết dược liệu được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau, trong đó phương pháp đo quang phổ UV - Vis được sử dụng đơn giản, thuận tiện và chính xác [5 - 7]. Do vậy, định lượng hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc lá Mơ lông bằng phương pháp phân tích quang phổ UV - Vis là khả thi và cần thiết. Kỹ thuật này là một bước quan trọng và cần thiết để đánh giá chất lượng nguyên liệu đầu vào trong sản xuất thuốc có nguồn gốc từ dược liệu; đồng thời, kỹ thuật có thể sử dụng để định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các dạng bào chế. Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng flavonoid toàn phần (theo kaempferol) trong cao đặc lá Mơ lông.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mơ lông (*Paederia lanuginosa* Wall.) được trồng tại Vườn Thực vật - Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng. Lá Mơ lông được thu hái vào tháng 12 năm 2023 để điều chế cao đặc.

2.2. Chất chuẩn, thiết bị

Chất chuẩn: Kaempferol chuẩn tinh khiết phân tích (97%, Sigma Aldrich).

Thiết bị: Bể siêu âm (SH108H), máy cô quay chân không (RE100-Pro - Dlab), cân kỹ thuật (Ohaus SPX1202), cân xác định độ ẩm (Ohaus MB45), cân phân tích ((OHAUS PR223/E) và máy đo quang phổ UV - Vis (Shimadzu A116352).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát bước sóng hấp thu cực đại của mẫu chuẩn kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV - Vis

Cân chính xác 0.01 g kaempferol và tiến hòa tan bằng ethanol bằng phương pháp

sóng siêu âm. Dịch hòa tan được cho bình bình định mức 10 ml tạo thành 10 ml dung dịch kaempferol có nồng độ 1 mg/ml. Lấy chính xác 1 ml dung dịch kaempferol 1 mg/ml cho vào bình định mức 100 ml pha loãng bằng ethanol được dung dịch kaempferol 100 µg/ml. Dung dịch kaempferol 10 µg/ml được dùng để khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại của kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis ở vùng ánh sáng tử ngoại gần (300 – 400 nm).

2.3.2. Thẩm định quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis

Chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác 0.01 g kaempferol và tiến hòa tan bằng ethanol bằng phương pháp sóng siêu âm. Dịch hòa tan được cho bình bình định mức 10 ml tạo thành 10 ml dung dịch kaempferol có nồng độ 1 mg/ml. Lấy 1 ml dung dịch kaempferol 1 mg/ml cho vào bình định mức 100 ml pha loãng bằng ethanol được dung dịch kaempferol 10 µg/ml. Sau đó, dung dịch kaempferol được pha loãng (Theo bảng 1) thành các dung dịch có nồng độ 2 µg/ml đến 8 µg/ml cho các khảo sát để thẩm định quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis ở bước sóng 365 nm.

Bảng 1. Pha loãng các nồng độ dung dịch kaempferol

STT	Kaempferol 10µg/ml (mL)	Nước cắt (mL)	Tổng thể tích (mL)	Nồng độ dung dịch (µg/ml)
1	8	2	10	8
2	6	4	10	6
3	4	6	10	4
4	2	8	10	2

Tính tương thích hệ thống

Đo độ hấp thụ mẫu chuẩn kaempferol 10 µg/ml ở 6 lần khác nhau để xác định độ

hấp thụ và phổ UV – Vis ở bước sóng 365 nm. Tính tương thích của hệ thống đảm bảo khi giá trị RSD (%) các thông số độ hấp thụ 6 lần đo lặp lại không quá 2.0% [8].

Tính tuyến tính

Kaempferol ở mức nồng độ 2 - 10 µg/ml được dùng để xác định độ hấp thụ ở bước sóng 365 nm. Xây dựng phương trình hồi quy và ý nghĩa của các hệ số bằng trắc nghiệm F và trắc nghiệm t, sử dụng phần mềm MS Excel 2010. Phương pháp đạt tính tuyến tính khi $R^2 \geq 0.99$ [8].

Độ đúng

Kaempferol có hàm lượng bằng 80%, 100% và 120% theo kaempferol 8 µg/ml. Mỗi mức khác nhau được đo độ hấp thụ ở bước sóng 365 nm 3 lần để xác định tỉ lệ phục hồi. Độ đúng của phương pháp đạt khi RSD của mỗi mức nồng độ không quá 2% và tỉ lệ phục hồi ở mỗi mức nồng độ nằm trong giới hạn 95 – 105% [8].

2.3.3. Định lượng flavonoid toàn phần (theo kaempferol) trong cao lá Mơ lông bằng phương pháp quang phổ UV – Vis

- *Bào chế cao lá Mơ lông*: Lá Mơ lông sau khi rửa sạch bằng nước cất. Sau khi khi để khô tự nhiên, lá Mơ lông được sấy khô bằng tủ sấy. Lá khô được xay nhuyễn và gây để thu bột lá. Bột lá khô được chiết xuất bằng dung môi ethanol 80% bằng phương pháp chiết siêu âm. Dịch chiết được cô thành cao đặc với độ ẩm của cao là 10.04%.

- *Mẫu thử kaempferol*: Cân chính xác 0.1g cao đặc của lá Mơ lông và tiến hòa tan bằng ethanol bằng phương pháp sóng siêu âm. Dịch hòa tan được cho bình bình định mức 10 ml tạo thành 10ml dung dịch cao có nồng độ 10 mg/ml. Lấy chính xác 1 ml dung dịch cao có nồng độ 10 mg/ml cho vào bình định mức 100 ml pha loãng bằng ethanol được dung dịch kaempferol 100 µg/ml. Dung dịch cao lá Mơ lông được

dùng để xác định hàm lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol.

Xác định hàm lượng kaempferol trong cao lá Mơ lông: Đo quang ở bước sóng 365 nm, kết quả hàm lượng flavonoid toàn phần (theo kaempferol) được tính theo công thức:

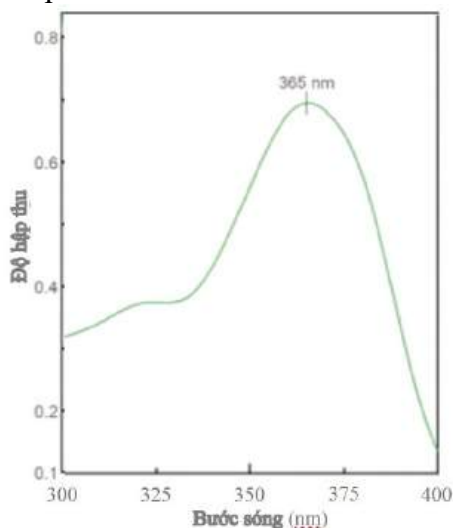
$$X(\%) = \frac{A_t \times C_c \times d}{A_c \times m_t \times (100 - h) \times 10^6} \times C\% \times 100$$

Trong đó: A_t : Độ hấp thụ của mẫu thử; C_c : Nồng độ của mẫu chuẩn ($\mu\text{g/ml}$); d : Độ pha loãng dung dịch; A_c : Độ hấp thụ của mẫu chuẩn; m_t : Khối lượng mẫu thử (g); h : Độ ẩm của mẫu thử (%); $C\%$: Độ tinh khiết chất chuẩn (97%).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Bước sóng hấp thụ cực đại của kaempferol

Kaempferol 10 $\mu\text{g/ml}$ trong ethanol được khảo sát độ hấp thụ trong vùng ánh sáng tử ngoại gần (300 - 400 nm). Kết quả cho thấy: Độ hấp thụ cực đại của kaempferol là 365 nm.



Hình 1. Quang phổ UV của kaempferol trong ethanol

Thẩm định quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis

Tính tương thích hệ thống

Dung dịch kaempferol 10 $\mu\text{g/ml}$ trong ethanol được dùng để đo độ hấp thụ ở bước sóng 365 nm bằng UV - Vis. Độ

hấp thụ trung bình của dung dịch kaempferol 10 $\mu\text{g/ml}$ là 0,7416 với RSD = 0,16% (Bảng 2). Giá trị RSD thấp hơn 2% [8]. Như vậy, quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis đạt được tính tương thích của hệ thống.

Bảng 2. Kết quả tính tương thích hệ thống

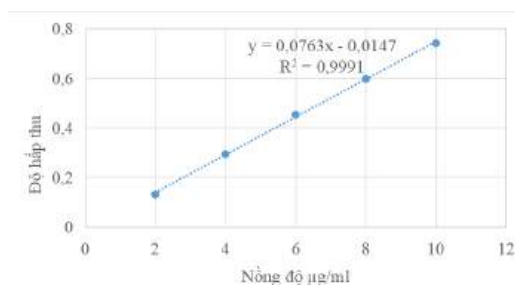
STT	Độ hấp thụ	Trung bình	RSD (%)
1	0,7425	0,7416	0,16
2	0,7436		
3	0,7395		
4	0,7398		
5	0,7423		
6	0,7419		

Tính tuyến tính

Độ hấp thụ của dung dịch kaempferol chuẩn ở bước sóng 365 nm tăng (từ 0,1304 đến 0,7418) theo nồng độ từ thấp tới cao của chất này (2,0 - 10,0 $\mu\text{g/ml}$) (Bảng 3). Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ của chuẩn kaempferol là: $y = 0,0763x - 0,0147$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9991$ (Hình 2). Hệ số tương quan R^2 lớn hơn 0,99 [8] nên phương pháp định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol đạt tính tuyến tính trong khoảng nồng độ 2 – 10 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 3. Tính tuyến tính trong phương pháp định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol

STT	Nồng độ kaempferol chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Độ hấp thụ
1	2.0	0,1304
2	4.0	0,2935
3	6.0	0,4528
4	8.0	0,5961
5	10.0	0,7418



Hình 2. Đường biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ

3.2.3. Độ đúng

Thí nghiệm kiểm tra độ đúng được thực hiện ở 3 mức nồng độ của kaempferol,

Bảng 4. Độ đúng của quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol

Mức (%)	Lần đo	Lượng kaempferol thêm vào (µg/ml)	Lượng kaempferol tìm thấy (µg/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
80%	1	6,4	6,309	98,58	97,35	0,073
	2	6,4	6,218	97,16		
	3	6,4	6,164	96,31		
100%	1	8,0	7,867	98,34	98,21	0,107
	2	8,0	7,745	96,81		
	3	8,0	7,958	99,48		
120%	1	9,6	9,324	97,13	97,13	0,020
	2	9,6	9,305	96,93		
	3	9,6	9,345	97,34		

3.3. Định lượng cao đặc lá Mơ lông

Flavonoid toàn phần trong cao đặc lá Mơ lông (độ ẩm cao 10,04%) theo kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis đã được tiến hành. Kết quả cho thấy: Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc lá Mơ lông là 8,478% đến 8,472% với trung bình là 8,558% và RSD là 0,101% (Bảng 5). Như vậy, quy trình định lượng ổn định và có tính lặp lại [8].

Bảng 5. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao chiết lá Mơ lông

Mẫu cao	Hàm lượng flavonoid toàn phần (%)	Trung bình	RSD (%)
1	8,672	8.558	0,101
2	8,525		
3	8,478		

bao gồm 80% (6,4 µg/ml), 100% (8,0 µg/ml) và 120% (9,6 µg/ml). Tỷ lệ thu hồi trung bình của kaempferol từ 97,13% – 98,21% và các giá trị RSD từ 0,073 đến 0,107 (Bảng 4). Độ phục hồi nằm trong quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol có giới hạn từ 95% – 105% và có giá trị RSD < 2,0% đã cho thấy quy trình đạt yêu cầu về độ đúng [8].

Như vậy, kiểm nghiệm nhanh sơ bộ được liệu có thể sử dụng phương pháp UV – Vis với những ưu điểm nhanh, dễ thực hiện và tiết kiệm chi phí. Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được quy trình định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc lá Mơ lông theo kaempferol bằng phương pháp quang phổ UV – Vis đã góp phần vào công tác kiểm tra nhanh chất lượng nguồn nguyên liệu đầu vào trước khi thu mua được liệu và đưa vào sản xuất.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol trong cao đặc lá Mơ lông bằng phương pháp đo quang phổ UV – Vis. Bước sóng hấp thụ cực đại của kaempferol trong vùng ánh sáng tử ngoại gần là 365 nm. Thẩm định quy

trình định lượng flavonoid toàn phần theo kaempferol trong cao đặc lá Mơ lông bằng phương pháp đo quang phổ UV – Vis thành công theo hướng dẫn ICH với các chỉ tiêu về tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính và độ đúng. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc lá Mơ lông (độ ẩm 10,04%) là 8,558%.

Tài liệu tham khảo

- [1] N. Q. Trung, Đ. H. Cường, & V. V. Quân, “Structure and antioxidant ability of flavonoids from leaves of *Paederia lanuginosa* from Quangnam, Vietnam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 124-135, 2023.
- [2] S. Parveen, I. U. H. Bhat, & R. Bhat, “Kaempferol and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 13, No. 10, 411-420, 2023.
- [3] A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, & M. N. Makarova, “New technology for preparation of herbal extracts and soft halal capsules on its base”, *Am Eurasian J Sustain Agric*, Vol. 3, No. 2, 130-134, 2009.
- [4] L. Q. Nhiệm & H. V. Hóa, *Bào Chế Và Sinh Dược Học I*, NXB Y Học, 2014.
- [5] Bộ Y Tế, *Dược điển Việt Nam V*, lần xuất bản thứ 5, tập 2, tr. 1281, NXB Y Học, 2004.
- [6] N. H. L. Thuý, P. T. T. Thuý, P. T. Dũng, V. T. B Huệ, “Định lượng flavonoid toàn phần trong lá trinh nữ hoàng cung *Crinum latifolium* L. (Amaryllidaceae) bằng phương pháp quang phổ UV – Vis”, *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, tập 15, số 1, 2011.
- [7] A. Chen, W. Xiang, Liu Dan, C. Liu & L. Yang, “Determination of total flavonoids and its antioxidant ability in *Houttuynia cordata*”, *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, Vol. 4, No. 2, pp. 131, 2016.
- [8] ICH, “Validation of analytical procedures: text and methodology Q2R1”. In *International conference on harmonization*, Geneva, 2005.

Ngày nhận bài: 11/6/2024

Ngày hoàn thành sửa bài: 25/6/2024

Ngày chấp nhận đăng: 26/6/2024