



TRÌNH BÀY CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ HOẠT CHẤT SINH HỌC TRONG THỰC VẬT

Võ Tấn Thanh¹,

¹Trường Đại học Kiên Giang

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/04/2024

Ngày nhận kết quả bình duyệt:
21/10/2024

Ngày chấp nhận đăng: 01/2025

Title:

Presentation qualitative and
quantitative analysis methods of
some biological compounds in
plants

Keywords:

Qualitative, quantitative,
determine active ingredients,
biological compounds

Từ khóa:

Định tính, định lượng, xác định
hoạt chất, hợp chất sinh học

ABSTRACT

Vietnam is a country located in the tropical monsoon region, with a rich and diverse flora ecosystem. Most of them contain complex compounds, including fillers and special medicinal compounds known as active ingredients. They contribute to the anti-aging, prevention, and treatment of a number of diseases. Each type of plant contains different levels of active ingredients. It is necessary to have suitable analytical methods for each active ingredient. This study synthesizes to provide chemical method and absorption spectroscopy method for qualitative and quantitative determination of some active biological ingredients in plants to serve research and application in chemistry, food, and medicine.

TÓM TẮT

Việt Nam là nước nằm trong khu vực nhiệt đới gió mùa, có hệ sinh thái thực vật phong phú và đa dạng. Đa số chúng chứa các hợp chất phức tạp bao gồm chất độn và các hợp chất đặc biệt dùng để chữa bệnh còn được gọi là hoạt chất. Chúng đóng góp trong việc chống lão hóa, phòng và trị một số bệnh. Mỗi loại thực vật chứa hàm lượng của từng loại hoạt chất khác nhau. Cần thiết phải có các phương pháp phân tích phù hợp cho từng loại hoạt chất. Nghiên cứu này tổng hợp nhằm đưa ra phương pháp hóa học và phương pháp quang phổ hấp thụ để định tính và định lượng một số hoạt chất sinh học có trong thực vật để phục vụ cho công tác nghiên cứu và áp dụng trong lĩnh vực hóa học, thực phẩm và y học.

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, rất nhiều nhà khoa học tập trung nghiên cứu về các hoạt chất hay còn gọi là các hợp chất sinh học bởi những công dụng của chúng trong việc phòng bệnh, hỗ trợ điều trị bệnh và khả năng chống lão hóa. Trong đó không thể không nhắc đến các hoạt chất như steroid, triterpenoid, phenolic, quinone, tannin, Flavonoid, carotenoid, saponin và alkaloid. Hợp

chất Flavonoid được chứng minh có khả năng bảo vệ cơ thể chống lại các gốc tự do, kháng viêm, kháng oxy hóa, giảm nguy cơ mắc bệnh đái tháo đường (Bahadoran *et al.*, 2013). Hợp chất Polyphenol chứa các thành phần hóa học chống lại sự phát triển của các bệnh ung thư, bệnh tim mạch, bệnh đái tháo đường, loãng xương và thoái hóa thần kinh (Pandey *et al.*, 2009). Hợp chất tannin có vị chát, ngoài việc

dùng trị bệnh tiêu chảy chúng còn được dùng cầm máu hoặc bồi bổ cơ thể (Đỗ Tất Lợi, 2004). Theo Rahimi và cộng sự (2009) chỉ ra rằng Saponin có khả năng bảo vệ chức năng của gan, kháng viêm, chống lại một số bệnh do virus gây ra. Các hợp chất Flavonoid và Polyphenol ở nhiều loài thực vật đã được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa (Srivastava và Choudhary, 2014). Trong thiên nhiên có rất nhiều loại hợp chất có lợi, hơn nữa công dụng của các hợp chất sinh học rất nhiều. Việc phân tích chúng cũng được chia ra thành ba phương pháp, bao gồm: phương pháp hóa học là phương pháp dựa trên những phản ứng hóa học, phương pháp hóa lý – vật lý là phương pháp dựa trên những hiện tượng và quá trình vật lý như phương pháp quang phổ, phương pháp so màu, phản ứng hạt nhân..., phương pháp sinh học là phương pháp dựa theo những hiện tượng của sự sống như trao đổi chất, tăng trưởng, ức chế vi sinh vật... (Võ Thị Bạch Huệ và cộng sự, 2007). Nghiên cứu này nhằm hỗ trợ cho quá trình tìm tài liệu phục vụ cho các công trình nghiên cứu khoa học và phân tích đánh giá hàm lượng hoạt chất bằng phương pháp hóa học và phương pháp đo quang phổ khả kiến. Đối với phương pháp hóa học, việc nhận biết dựa trên sự biến đổi do các phản ứng hóa học xảy ra của các chất.

Đối với phương pháp quang phổ khả kiến dựa trên khả năng hấp thụ tia sáng có bước sóng xác định do thiết bị tạo ra ứng với mỗi hoạt chất, năng lượng hấp thụ càng cao cho thấy hoạt chất đó càng lớn.

2. NỘI DUNG

Bảng 1. Định tính một số hợp chất có trong mẫu cao chiết từ thực vật

Hợp chất	Thí nghiệm	Quan sát
Ankaloid	2 mL mẫu + 3 đến 4 giọt thuốc thử Wagner	Tủa màu vàng
Coumarin	2 mL mẫu + 3 mL NaOH 10%	Màu vàng
Flavonoid	1 mL mẫu + 1 mL Pb(CH ₃ COOH) ₂ (10%)	Màu vàng
Phenol	2 mL mẫu + 2 mL H ₂ O + 2-3 FeCl ₃ (5%)	Tủa xanh đen
Quinone	2 mL mẫu + vài giọt HCl đậm đặc	Màu xanh lá

2.1 Định tính một số hợp chất mang tính sinh học

2.1.1 Định tính bằng máy đo quang phổ khả kiến

Việc xác định sự hiện diện của các hợp chất thực vật bằng máy đo quang phổ khả kiến được thực hiện dựa vào quy trình của Harborne (1973) có hiệu chỉnh. *Mẫu nghiên cứu được đo quang phổ* trên các bước sóng, việc hấp thụ bước sóng của mẫu nghiên cứu cho thấy sự tồn tại của các hợp chất, cụ thể như sau: steroid (215 nM), triterpenoid (230 nM), phenolic (255 nM), quinone (260 nM), tannin (265 nM), Flavonoid (300 nM), carotenoid (450 nM), saponin (545 nM) và alkaloid (550 nM). Mẫu trắng là mẫu chỉ chứa dung dịch ethanol. Với kết quả độ hấp thụ càng cao thể hiện hoạt chất đó chứa trong sản phẩm càng nhiều.

Phương pháp này có thể định tính được các chất mà chúng khó định tính được bởi phương pháp hóa học, cho ra số liệu chính xác cao, có thể dự đoán so sánh được hàm lượng hoạt chất của các nguyên liệu khác nhau. Tuy nhiên để thực hiện được phương pháp này cần phải trang bị phức tạp, máy móc đắt tiền (Võ Thị Bạch Huệ và cộng sự, 2007).

2.1.2 Định tính bằng quan sát do phản ứng hóa học

Dựa vào các phản ứng tạo màu theo mô tả của Sofowora (1993); Tiwari và Cummins (2011), bảng tổng hợp định tính một số hợp chất sinh học từ cao chiết của thực vật được thể hiện cụ thể như sau:

Hợp chất	Thí nghiệm	Quan sát
Saponin	2 mL mẫu + vài giọt dầu oliu + đun nóng 2 phút	Nhũ tương màu sữa
Tanin	2 mL mẫu + 2 mL H ₂ O + 2-3 FeCl ₃ (5%)	Tủa xanh đen
Terpenoid	2 mL mẫu + 2 mL Chloroform + vài giọt H ₂ SO ₄ đậm đặc	Màu xanh ngọc bích

Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong thực tế, vì nó không đòi hỏi trang thiết bị phức tạp, tuy nhiên còn một số nhược điểm là sẽ gặp khó khăn khi phân tích nguyên liệu chứa nhiều tạp chất hoặc chứa chất cần phân tích với lượng nhỏ (Võ Thị Bạch Huệ và cộng sự, 2007).

2.2 Định lượng một số hợp chất mang tính sinh học

2.2.1 Xác định Hàm lượng sterol tổng bằng phương pháp trắc quang (Wall- Kelley) (Wall, M. E. & Kelley, E. G., 1990)

Thực hiện phản ứng Liebermann-Burchard của mẫu sterol tổng và mẫu chuẩn Cholesterol (Merck): Sterol/CHCl₃ phản ứng với thuốc thử Liebermann-Burchard tạo thành phức màu xanh lục. Đo độ hấp thụ trên máy quang phổ hấp thụ ở bước sóng 620 nM, từ đó tính toán hàm lượng sterol tổng bằng phương pháp so sánh lượng steroid được tính theo công thức:

$$\frac{A_T}{A_C} = \frac{C_T}{C_C} \Rightarrow C_T = C_C \times \frac{A_T}{A_C}$$

Trong đó: A_T là độ hấp thụ của mẫu thử, A_C là độ hấp thụ của mẫu chuẩn, C_T là nồng độ mẫu thử, C_C là nồng độ của mẫu chuẩn.

2.2.2 Xác định hàm lượng Saponin Triterpenoid tổng

Hút 0,2 mL dung dịch mẫu sau khi được lọc và pha loãng cho vào ống nghiệm, thêm lần lượt là 0,2 mL vannilin - acetate (10%), 1,2 mL HClO₄, đun cách thủy và ủ ở 70 °C trong 15 phút. Sau 15 phút, các ống nghiệm được lấy ra làm mát trong 2 phút, ethyl acetate được bổ sung sao cho tổng thể tích là 5 mL. Tổng hàm lượng Saponin Triterpenoid được phân tích dựa trên phương pháp quang phổ so màu, đo độ hấp thụ quang phổ

ở bước sóng 548 nM với chất chuẩn là Escin (Dong Huaihai & Gu Wenying, 2001).

Xây dựng đường chuẩn bằng Escin: pha nồng độ Escin từ 1 mg/L đến 10 mg/L (Sao cho hàm lượng Saponin Triterpenoid của mẫu được phân tích nằm trong dãy nồng độ của mẫu chuẩn). Thực hiện quy trình tương tự trên cho Escin chuẩn.

2.2.3 Xác định hàm lượng Polyphenol tổng theo Folin-Ciocalteau (Hossain et al., 2013)

Hút 0,2 mL dung dịch mẫu đã pha loãng thích hợp cho vào ống nghiệm, thêm 1,5 mL thuốc thử folin-ciocalteau 10%. Giữ ống nghiệm ở trong tối 15 phút. Cuối cùng, cho thêm 1,5 mL Na₂CO₃ 5% và lắc đều tay. Giữ ống nghiệm trong tối 2 giờ. Sau đó đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 750 nM bằng UV-spectrophotometer.

Xây dựng đường chuẩn bằng acid gallic: pha nồng độ acid gallic từ 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L (sao cho hàm lượng Polyphenol tổng của mẫu phân tích nằm trong dãy nồng độ của mẫu chuẩn). Cách pha (3 g acid gallic được hòa tan trong 100 mL ethanol được nồng độ 30 mg/L). Thực hiện quy trình tương tự trên cho Acid gallic chuẩn với các dụng cụ: máy so màu, cuvet 10 mm, bình định mức 100 mL, pipet 1, 5, 10 mL.

2.2.4 Định lượng Tannin theo phương pháp Folin -Denis (Laitonjam et al., 2013)

Hút 0,5 mL dịch mẫu và 0,5 mL nước cất cho vào ống nghiệm. Sau đó cho tiếp 0,5 mL thuốc thử Folin và 2 mL Na₂CO₃ 20% lắc đều, làm ấm bằng nước sôi trong 1 phút và làm nguội ở nhiệt độ phòng. Sau đó đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 700 nM bằng UV-spectrophotometer.

Xây dựng đường chuẩn bằng acid tannic: pha nồng độ acid tannic từ 0 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L, 64 mg/L, 128 mg/L (sao cho hàm lượng tanin của mẫu phân tích nằm trong dãy nồng độ của mẫu chuẩn). Thực hiện quy trình tương tự trên cho acid tannic chuẩn.

2.2.5 Định lượng Flavonoid tổng theo phương pháp Aluminium Chloride colorimetric (Madal et al., 2013)

Hút 1 mL dịch trích vào ống nghiệm, cho thêm 3 mL ethanol, 0,2 mL aluminum chloride (10%), 0,2 mL sodium acetate 1 M và 5,8 mL nước cất. Giữ ở nhiệt độ phòng 30 phút và đo độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng ở 415 nM.

Xây dựng đường chuẩn quercetin: pha nồng độ quercetin từ 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L và 100 mg/L trong ethanol. Thực hiện quy trình tương tự như trên cho quercetin chuẩn.

Dụng cụ: máy so màu, cuvet 10 mm, bình định mức 100 mL, pipet 1, 2, 3, 5, 10 mL.

2.2.6 Xác định hàm lượng anthocyanin bằng phương pháp pH vi sai (Fuleki and Francis, 1968; Worlsted, 1993)

Dựa trên nguyên tắc chất màu anthocyanin thay đổi theo pH. Tại pH 1,0 các anthocyanin tồn tại ở dạng oxonium và flavium có độ hấp thụ cực đại, còn ở pH 4,5 thì chúng lại ở dạng carbinol không màu. Đo mật độ quang của mẫu tại pH 1,0 và pH 4,5 tại bước sóng hấp thụ cực đại. So với độ hấp thụ tại bước sóng 700 nM. Dựa trên công thức của định luật Lambert Beer:

Tiến hành bằng cách đo mật độ quang phổ của dung dịch mẫu tại pH = 1 và pH = 4,5 với các bước sóng hấp thụ cực đại và 700 nM.

Xác định hàm lượng anthocyanin (mg/L) theo công thức:

$$a = \frac{A \cdot M \cdot HSPL \cdot 1000}{\epsilon \cdot l}$$

Trong đó:

$$A = \left(A_{\frac{1,0}{\lambda_{max}}} - A_{\frac{1,0}{\lambda_{700}}} \right) - \left(A_{\frac{4,5}{\lambda_{max}}} - A_{\frac{4,5}{\lambda_{700}}} \right)$$

$A_{\frac{1,0}{\lambda_{max}}}$: độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 1,0 đo được ở bước sóng cực đại;

$A_{\frac{1,0}{\lambda_{700}}}$: độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 1,0 đo được ở bước sóng 700 nM;

$A_{\frac{4,5}{\lambda_{max}}}$: độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 4,5 đo được ở bước sóng cực đại;

$A_{\frac{4,5}{\lambda_{700}}}$: độ hấp thụ của phần mẫu thử có pH bằng 4,5 đo được ở bước sóng 700 nM;

HSPL: hệ số pha loãng;

M: khối lượng phân tử của cyanidin-3-glucoside, bằng 449,2 g/mol;

l: chiều dài đường quang, tính bằng centimet (cm);

ϵ : là hệ số tắt phân tử (bằng 26 900) của cyanidin-3-glucoside, tính bằng $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$;

10^3 là hệ số chuyển đổi từ gam sang miligam.

2.2.7 Xác định hàm lượng carotenoid (Hà Thị Bích Ngọc, 2007; TCVN 1990)

Phương pháp dựa trên khả năng hòa tan của carotenoid trong các dung môi hữu cơ cho màu vàng, cường độ màu của dung dịch tỷ lệ thuận với hàm lượng carotenoid và được đo trên máy quang phổ so màu UV – VIS ở bước sóng 440 – 450 nM.

Hàm lượng carotenoid (mg/kg) được tính theo công thức:

$$X = \frac{a \times 0,00416 \times V}{m \times b} \times 1.000$$

Trong đó:

a: Lượng tương đương với dung dịch gốc tìm thấy trên đồ thị chuẩn (mL);

b: Thể tích của dung dịch chuẩn (mL);

0,00416: Hệ số chuyển 1 mL dung dịch gốc kali bicromat ra lượng tương đương với carotenoid (mg);

V: thể tích dịch lọc của mẫu thử sau khi qua cột hấp thụ (mL);

m: khối lượng của mẫu thử (g);

1000: hệ số chuyển về 1 kg mẫu.

2.2.8 Xác định hàm lượng saponin tổng

Hàm lượng saponin tổng được xác định theo mô tả của Hiai và Nakajima (1976) có hiệu chỉnh. Cho 500 μ L chất chuẩn mẫu phân tích (có thể hòa tan hoặc pha loãng bằng methanol 80%) vào ống nghiệm. Thêm vào 200 μ L dung dịch vanillin 4% (được pha loãng bằng methanol 80%). Sau đó, thêm vào 1,8 mL H_2SO_4 70%

Trong đó: D: Độ hấp thụ của mẫu; a, b: giá trị từ đường chuẩn; V: thể tích của dịch chiết (mL); N: độ pha loãng; W: khối lượng cao chiết có trong thể tích V (mg).

2.2.9 Xác định hàm lượng alkaloid

Hàm lượng alkaloid tổng được xác định theo phương pháp hình thành phức hợp với bromocresol green (BCG), tạo thành sản phẩm có màu vàng (Shamsa *et al.*, 2008) và xây dựng đường chuẩn với atropine (AE). Hàm lượng alkaloid tổng được biểu diễn theo miligram đương lượng atropine trên gram cao chiết (mg AE/g cao chiết).

Tiến hành thí nghiệm: Cho 1 mL dung dịch mẫu vào ống nghiệm. Sau đó, thêm tiếp 1 mL dung dịch HCl 2N và sau khi phản ứng 5 phút thì dung dịch trên được lọc bằng giấy lọc để loại bỏ cặn. Cho dung dịch trên vào bình tách chiết lần lượt thêm vào 5 mL BCG và 5 mL dung dịch đệm phosphate (pH 4,7). Cuối cùng, hỗn hợp được lắc mạnh bằng bình tách chiết với 10 mL dung dịch Chloroform, sau 2 phút phản ứng ở nhiệt độ phòng, tiến hành xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở các bước sóng 470 nM.

(được pha loãng bằng nước khử ion) và lắc đều. Ủ hỗn hợp ở 60 °C trong 10 phút, sau đó làm lạnh trong 15 phút. Tiến hành ghi nhận kết quả độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng 550 nM. Mẫu trắng là mẫu chỉ chứa hỗn hợp vanillin 4% và H_2SO_4 70%.

Xây dựng đường chuẩn *ginsenoside*: pha nồng độ ginsenoside từ 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L và 60 mg/L trong methanol 80%. Thực hiện quy trình tương tự như trên cho *ginsenoside* chuẩn.

Hàm lượng saponin được tính bằng cách dựa vào phương trình $y = ax + b$ của đường chuẩn tại các độ hấp thụ của chất chuẩn.

$$Saponin = \frac{D - b}{a \times V} \times N$$

Xây dựng đường chuẩn *atropine*: pha nồng độ atropine với dung môi methanol để đạt nồng độ từ 10 mg/L đến 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L và 60 mg/L trong methanol 80%. Thực hiện quy trình tương tự như trên cho *atropine* chuẩn.

3. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tổng hợp và đưa ra được kết quả tổng quan về phương pháp định tính và định lượng một số hoạt chất có trong thực vật, để từ đó làm tài liệu tham khảo cho một số nghiên cứu nhằm lựa chọn và áp dụng để phân tích, đánh giá chất lượng về giá trị sinh học của một số nguyên liệu thảo dược và một số sản phẩm thực phẩm, được phẩm được sản xuất từ nguyên liệu đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bahadoran, Z., Mirmiran, P. & Azizi F. (2013). Dietary Polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *J Diabetes Metab Disord*, 12(1), 43.
- Đỗ Tất Lợi. (2004). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học.

- Dong Huaihai. & Gu Wenying. (2001). Determination of soybean saponins using colorimetry. *China Oils and Fats*, 26 (3), 57.
- Fuleki, T. & Francis F.J. (1968). Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33, 78-83.
- Hà Thị Bích Ngọc. (2007). Điều tra hợp chất carotenoid trong một số thực vật của Việt Nam. *Tạp chí khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 23, 130 – 134.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. America: Springer Publishing.
- Hiai, S., Oura, H. & Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29(2), 116-22.
- Hossain, M.A., Raqmi, K.A.S, Mizijy, Z.H., Weli,A.M. & Riyami, Q. (2013). Study of total phenol, Flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3 (9),705-710.
- Laitonjam, W.S., Yumnam, R., Asem, S.D. & Wangkheirakpam, S. D. (2013). Evaluative and comparative study of biochemical, trace element and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T, Anderson and *Phlocanthus jenkincii* C.B. Clake leaves. *Indian Journal Products and Resources*, 4 (1), 67-72.
- Mandal, S., Patra, A., Samanta, A., Roy, S., Mandal, A., Mahapatra, T.D., Pradhan, S., Das, K., & Nandi, D.K. (2013). Analysis of phytomechical profile of *Terminalia arjuna* bark extract with antioxidative and antimicrobial properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(12), 960-966.
- Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2 (5), 270–278.
- Rahimi, R., Ghiasi, S., Azimi, H., Fakhari, S., & Abdollahi, M. (2009). A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; future perspective of new drugs. *Cytokine*, 49(2), 123-129.
- Srivastava, S. & Choudhary, G.P. (2014). Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3, 194–197.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R. & Verdianrizi M. (2008). Strectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pham. Sci*. 32, 17-20.
- Wall, M. E. & Kelley, E. G. (1990). Determination and nature of leaf sterols, *Anal. Chem*, 19, 677-683.
- Sofowora, A. (1993). *Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa*. Nigeria : *Spectrum Books Limited*.
- Tiwari, U. & Cummins, E. (2013). Fruit and vegetables. *In: Handbook of plant food phytochemicals: Sources, stability and extraction*. New York: John Wiley & Sons.
- Võ Thị Bạch Huệ, Phùng Thế Đồng, Trần Thị Trúc Thanh, Phan Thanh Dũng và Nguyễn Hữu Lạc Thủy. (2007). *Hóa phân tích, tập 1*. Nhà xuất bản Giáo dục.

