

Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Polyphenol toàn phần trong hạt vải bằng quang phổ UV-VIS

DEVELOPING AND VALIDATING OF A UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN LITCHI SEEDS (LITCHI CHINENSIS SONN.)

Vũ Đức Lợi¹, Phạm Quốc Doanh², Phạm Bảo Tùng²

¹Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng polyphenol toàn phần bằng quang phổ UV-Vis trong hạt vải (*Litchi chinensis* Sonn.) theo tiêu chuẩn AOAC 2016 và ICH, đồng thời đánh giá hàm lượng polyphenol thực tế trong hạt vải Việt Nam nhằm tận dụng phụ phẩm nông nghiệp giàu hoạt tính sinh học.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là hạt vải Việt Nam. Phương pháp dựa trên phản ứng tạo phức với thuốc thử Folin-Ciocalteu, sử dụng acid gallic làm chất chuẩn, đo độ hấp thụ tại bước sóng 760 nm trên máy quang phổ UV-Vis. Thẩm định phương pháp theo AOAC, ICH bao gồm độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng.

Kết quả: Phương pháp cho đỉnh hấp thụ cực đại tại 760 nm, với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,012x - 0,0421$ có hệ số tương quan $R^2 = 0,9994$ trong khoảng nồng độ 20-70 $\mu\text{g/ml}$ acid gallic. Độ đặc hiệu: phổ hấp thụ của mẫu thử và chuẩn tại vùng bước sóng 600 - 800nm có một đỉnh với cực đại hấp thụ lần lượt là 732,4 và 760 nm. Độ lặp lại đạt cùng ngày và khác ngày $\leq 2,0\%$. Độ đúng có tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng 98,12-101,76% (trong giới hạn 98-102%). Hàm lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải đạt trung bình $148,56 \pm 1,61$ mg GAE/g cao khô, tương đương $9,58 \pm 0,10$ mg GAE/g dược liệu (hiệu suất chiết 5,7-6,3%).

Kết luận: Phương pháp định lượng polyphenol toàn phần bằng UV-Vis sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu đã được xây dựng và thẩm định, đáp ứng đầy đủ các tiêu chí theo AOAC và ICH. Kết quả cho thấy hạt vải Việt Nam là nguồn nguyên liệu giàu polyphenol, có hàm lượng cao so với một số nghiên cứu quốc tế, khẳng định tiềm năng khai thác làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe và được phẩm từ phụ phẩm nông nghiệp.

Từ khóa: Polyphenol, Hạt vải (*Litchi chinensis* Sonn.), Folin-Ciocalteu, UV-Vis, thẩm định phương pháp.

ABSTRACT

Objective: To develop and validate a UV-Vis spectrophotometric method for the determination of total polyphenol content in litchi seeds (*Litchi chinensis* Sonn.) according to AOAC & ICH guidelines, and to evaluate the actual total polyphenol content in Vietnamese litchi seeds in order to valorize this abundant agricultural byproduct rich in bioactive compounds.

Materials and Methods: The study was conducted on Vietnamese litchi seeds. The method was based on the formation of a colored complex with Folin-Ciocalteu reagent using gallic acid as the standard, with absorbance measured at 760 nm using a UV-Vis spectrophotometer. The optimal extraction procedure was established by univariate optimization. Method validation followed AOAC & ICH criteria, including specificity, linearity, precision (repeatability), and accuracy (recovery).

Results: The method showed a maximum absorption at 760 nm. The calibration curve was linear over the range of 20-70 $\mu\text{g/mL}$ gallic acid (equation: $y = 0,012x - 0,0421$, $R^2 = 0,9994$). The UV-Vis absorption spectra of the sample solution and the standard solution in the wavelength range of 600-800 nm showed a single peak, with maximum absorption at 732,4 nm and 760 nm, respectively. Both repeatability and inter-day precision were acceptable, with relative standard deviation (RSD) values of $\leq 2,0\%$. Accuracy was satisfactory with recovery rates ranging from 98.12 to 101.76% (within the AOAC acceptable range of 98-102%). The total polyphenol content in litchi seed extract was 148.56 ± 1.61 mg GAE/g dry extract, equivalent to 9.58 ± 0.10 mg GAE/g raw material (extraction yield 5.7-6.3%).



Conclusion: A UV-Vis spectrophotometric method employing the Folin-Ciocalteu reagent for the determination of total polyphenol content was successfully developed and validated, meeting all validation criteria recommended by AOAC and ICH guidelines. The results demonstrated that Vietnamese lychee seeds are a rich source of polyphenols, exhibiting higher polyphenol content than that reported in several international studies. These findings highlight the potential of lychee seeds as a valuable raw material for the development of functional foods and pharmaceutical products from agricultural by-products.

Keywords: Polyphenols, litchi seeds (*Litchi chinensis* Sonn.), Folin-Ciocalteu, UV-Vis, method validation.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây vải (*Litchi chinensis* Sonn.) là cây ăn quả có giá trị kinh tế cao tại Việt Nam, đặc biệt ở các tỉnh miền Bắc như Bắc Giang, Hải Dương, Hưng Yên [1]. Trong quá trình chế biến và tiêu thụ, hạt vải bị loại bỏ tạo thành lượng lớn phụ phẩm chưa được khai thác hiệu quả [2].

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy hạt vải chứa hàm lượng cao các hợp chất hoạt tính sinh học có giá trị, đặc biệt là polyphenol như acid gallic, acid ellagic, catechin và proanthocyanidin có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, kháng viêm, kháng khuẩn và hỗ trợ phòng ngừa bệnh mạn tính [3],[4]. Việc khai thác polyphenol từ hạt vải không chỉ giúp tận dụng phụ phẩm nông nghiệp mà còn mở ra tiềm năng phát triển thực phẩm bảo vệ sức khỏe và dược phẩm.

Hiện nay, phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis là một trong những kỹ thuật phổ biến để định lượng polyphenol toàn phần nhờ ưu điểm đơn giản, chi phí thấp, dễ triển khai và phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, để áp dụng phương pháp này một cách tin cậy, cần thiết phải xây dựng và thẩm định quy trình phân tích nhằm đảm bảo các tiêu chí như độ chính xác, độ lặp lại, độ đặc hiệu và tính tuyến tính.

Xuất phát từ những vấn đề trên, đề tài được thực hiện với mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng polyphenol toàn phần bằng quang phổ UV-Vis trong hạt vải (*Litchi chinensis* Sonn.) theo tiêu chuẩn AOAC 2016 và ICH, đồng thời đánh giá hàm lượng polyphenol thực tế trong hạt vải Việt Nam nhằm tận dụng phụ phẩm nông nghiệp giàu hoạt tính sinh học.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng, hóa chất và thiết bị

- Đối tượng: Hạt vải thu hái vào tháng 7/2024 cùng mẫu cây vải thu hái tại xã Giáp Sơn, huyện Lục Ngạn, tỉnh Bắc Giang nay là xã Lục Ngạn, tỉnh Bắc Ninh. Mẫu cây được ThS. Nguyễn Thúc Thu Hương giám định tên khoa học là *Litchi chinensis* Sonn., thuộc họ Bồ hòn (Sapindaceae), mẫu tiêu bản số hiệu UMP/19/2024 được lưu tại Trường Đại học Y Dược, ĐHQGHN và Viện nghiên cứu Y Dược cổ truyền Tuệ Tĩnh.

- Hóa chất: Chuẩn Acid gallic (Trung Quốc, HPLC), Thuốc thử Folin-Ciocalteu, Ethanol, Nước tinh khiết, Na_2CO_3 .

- Thiết bị: Tủ sấy chân không LVO 20-40 Daihan, Cân phân tích Precisa XB 220A, Máy siêu âm WiseClean WUC - A10H, Máy đo hàm ẩm MB 45, Hệ thống cô quay chân không Buchi, Máy quang phổ UV-VIS HITACHI U - 1800, Bể điều nhiệt Memmert

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2025 tại Trường Đại học Dược Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên phương pháp định lượng polyphenol tổng trong Trà xanh theo TCVN 9745 - 1 : 2013 (ISO 14502 - 1: 2005), tiến hành định lượng polyphenol tổng trong mẫu nghiên cứu bằng phương pháp đo quang với chất chuẩn là acid gallic [5].

Xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần:

Khảo sát độ hấp thụ cực đại:

Chuẩn bị mẫu thử: Pha dung dịch chuẩn gốc acid gallic có nồng độ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hút chính xác 1,0 mL chuẩn 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vào ống nghiệm, thêm 5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, lắc để phản ứng 5 phút. Sau đó thêm 4 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5%, lắc đều. Để yên trong 60 phút trong bóng tối.

Chuẩn bị mẫu trắng: Hút chính xác 1,0 mL nước cất vào ống nghiệm. Thêm 5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, lắc đều, để yên trong 5 phút. Sau đó thêm 4 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5%, lắc đều. Để yên trong 60 phút trong bóng tối.

Quét phổ để xác định bước sóng cực đại.

Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính:

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn acid gallic có nồng độ thích hợp. Tiến hành phản ứng với thuốc thử Folin - Ciocalteu. Để phản ứng xảy ra trong 60 phút trong bóng tối, ở nhiệt độ phòng. Mẫu trắng được chuẩn bị song song. Đo độ hấp thụ ở bước sóng cực đại xác định trên. Xây dựng đường chuẩn với độ hấp thụ là trục tung và nồng độ dung dịch là trục hoành.

Khảo sát quá trình xử lý mẫu: Tiến hành khảo sát bằng cách thay đổi đơn biến: Nồng độ ethanol, nhiệt độ, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi/dược liệu (DM/DL), số lần chiết để thu được hàm lượng polyphenol cao nhất.

Tiến hành định lượng:

Hút chính xác 1,0 mL dung dịch thử (đã pha loãng thích hợp từ cao khô) vào ống nghiệm, thêm 5 mL thuốc thử



Folin-Ciocalteu 10%, lắc để phản ứng 5 phút. Sau đó thêm 4 mL dung dịch Na_2CO_3 7,5%, lắc đều. Để phản ứng xảy ra trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, trong bóng tối. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 760 nm. Làm lặp lại 3 lần với mỗi mẫu.

Tiến hành thẩm định phương pháp phân tích theo tiêu chuẩn AOAC và ICH [6],[7]:

Độ đặc hiệu: Tiến hành quét phổ hấp thụ của 3 mẫu: mẫu chứng, mẫu thử và mẫu chuẩn sau phản ứng tạo màu. Yêu cầu mẫu chứng phải có độ hấp thụ không đáng kể so với độ hấp thụ của dung dịch chuẩn.

Độ tuyến tính: Tiến hành khảo sát trên một dãy dung dịch chuẩn có nồng độ biến thiên. Xác định sự phụ thuộc tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ bằng phương trình hồi quy tuyến tính. Yêu cầu hệ số tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ $R^2 \leq 0,99$.

Độ lặp lại: Tiến hành định lượng một mẫu dược liệu 6 lần song song. Xác định kết quả định lượng theo phương trình đường chuẩn. Tính độ lệch chuẩn tương đối giữa các giá trị của các lần định lượng. Yêu cầu: tại mức hàm lượng

>10%, độ lặp lại của phương pháp $\text{RSD} \leq 2,0\%$.

Độ đúng: Thêm vào mẫu thử một lượng chính xác dung dịch chuẩn sao cho tổng nồng độ của chúng vẫn nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát, chiết và tiến hành phân tích. Tính lượng chuẩn tìm lại được. Làm 6 lần độc lập. Yêu cầu: đối với mẫu có hàm lượng >10%, lượng chuẩn tìm lại phải nằm trong khoảng 98 - 102%.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Thí nghiệm được tiến hành ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2020.

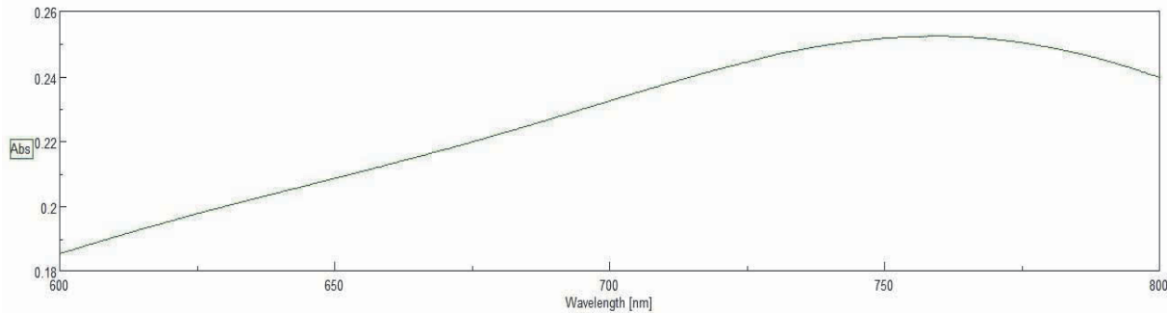
Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành trong phòng thí nghiệm, tuân thủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu, nghiên cứu không đánh giá trên động vật và không thử nghiệm trên người.

KẾT QUẢ

Xây dựng phương pháp định lượng polyphenol toàn phần

Khảo sát bước sóng cực đại hấp thụ:



Hình 1. Hình ảnh cực đại hấp thụ của acid gallic

Quét phổ dung dịch acid gallic chuẩn trong khoảng bước sóng từ 600 đến 800 nm. Kết quả cho thấy acid gallic cho đỉnh hấp thụ cực đại tại 760 nm, vì vậy, để tài lựa chọn

bước sóng 760 nm để tiếp tục xây dựng phương pháp định lượng polyphenol.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu:

Bảng 1. Kết quả khảo sát quy trình xử lý mẫu

STT	Dung môi (% Ethanol)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Tỷ lệ DM/DL (ml/g)	Số lần chiết	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/10g cao khô)
1	40	70	3	9	1	825,84
2	50	70	3	9	1	890,52
3	60	70	3	9	1	891,17
4	50	60	3	9	1	850,21
5	50	70	3	9	1	887,69
6	50	80	3	9	1	950,72
7	50	80	2	9	1	862,44
8	50	80	3	9	1	953,16
9	50	80	4	9	1	927,98
10	50	80	3	6	1	817,64
11	50	80	3	9	1	952,61



12	50	80	3	12	1	953,23
13	50	80	3	9	1	951,76
14	50	80	3	9	2	1504,24
15	50	80	3	9	3	1505,82

Các yếu tố đều ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol từ hạt vải. Hàm lượng polyphenol tăng khi tăng nồng độ ethanol từ 40% lên 50% (825,84 lên 890,52 mg GAE/10 g cao khô), sau đó tăng rất ít ở 60% (891,17 mg GAE/10 g cao khô), cho thấy ethanol 50% là phù hợp nhất. Nhiệt độ chiết tăng từ 60°C lên 80°C làm hàm lượng polyphenol tăng từ 850,21 lên 950,72 mg/10 g cao khô. Thời gian chiết 3 giờ cho kết quả cao nhất (953,16 mg GAE/10 g cao khô), trong khi kéo dài đến 4 giờ làm hàm lượng polyphenol giảm. Tỷ lệ DM/DL tăng từ 6 lên 9 (mL/g) giúp nâng cao hiệu suất chiết, nhưng tăng lên tỉ lệ 12 (mL/g) chỉ cải thiện không đáng kể. Số lần chiết có ảnh hưởng rõ rệt nhất, khi tăng từ 1 lên 2 lần chiết, hàm lượng polyphenol tăng từ 951,76 lên 1504,24 mg GAE/10 g cao khô; chiết lần thứ 3 chỉ làm tăng rất ít (1505,82 mg GAE/10 g cao khô). Do đó, qua quá trình khảo sát bằng cách thay đổi đơn biến, chúng tôi lựa chọn được quy trình chiết xuất tối ưu cho định lượng, bao gồm: dung môi Ethanol 50%, nhiệt độ là 80°C, thời gian chiết là 3 giờ, tỷ lệ dung môi/dược liệu là 9 (mL/g), chiết 2 lần.

Phương pháp định lượng:

Hạt vải được sấy bằng tủ sấy đối lưu ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ để loại bỏ độ ẩm mà vẫn bảo toàn hoạt tính

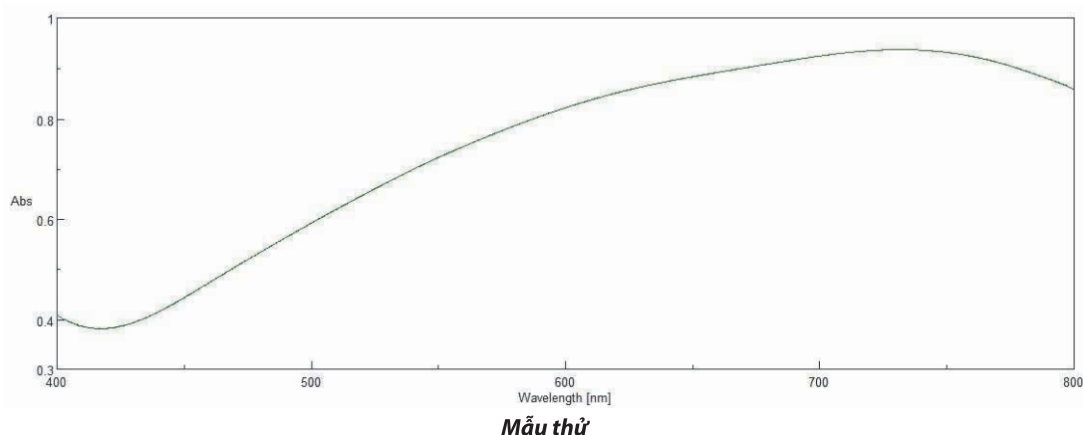
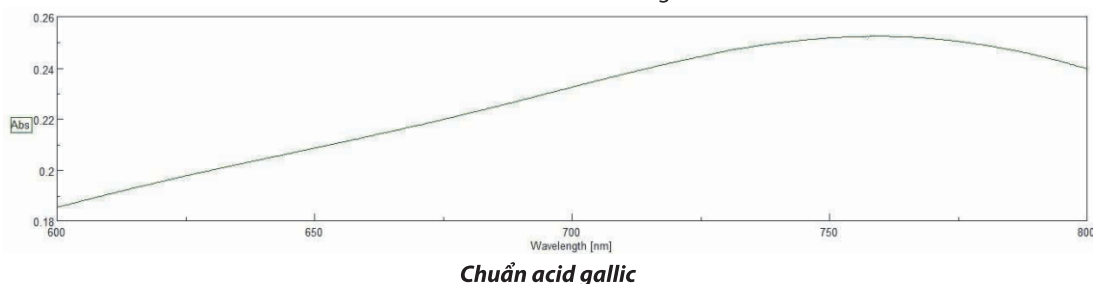
của polyphenol. Hạt khô được nghiền bằng máy nghiền, sau đó được rây qua rây có kích thước 2,00 mm thu được nguyên liệu thô dùng để chiết xuất.

Cân chính xác khoảng 10,00 g nguyên liệu thô hạt vải vào bình cầu 500 mL. Tiến hành chiết hồi lưu lần thứ nhất với các điều kiện về nhiệt độ, nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi/dược liệu, thời gian chiết và số lần chiết được lựa chọn. Thu lấy dịch chiết lần một. Thêm tiếp 90 mL ethanol vào bình cầu, tiến hành chiết hồi lưu với các điều kiện tương tự lần đầu. Gộp dịch chiết 2 lần, lọc qua phễu Buchner. Cô dịch chiết dưới áp suất giảm bằng hệ thống cô quay chân không Buchi, sấy khô thu cao. Cân chính xác lượng cao khô thu được. Cân chính xác khoảng 0,5 g cao khô, hòa tan định mức 100 mL, hút 1,0 mL pha loãng tới 20 mL để nồng độ dung dịch thử nằm trong khoảng 20–70 µg/mL trước khi tiến hành phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu.

Thẩm định phương pháp định lượng

Độ đặc hiệu:

Tiến hành quét phổ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử cho phản ứng với thuốc thử, quét phổ trong vùng bước sóng 400 - 800nm.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch mẫu thử và dung dịch mẫu chuẩn

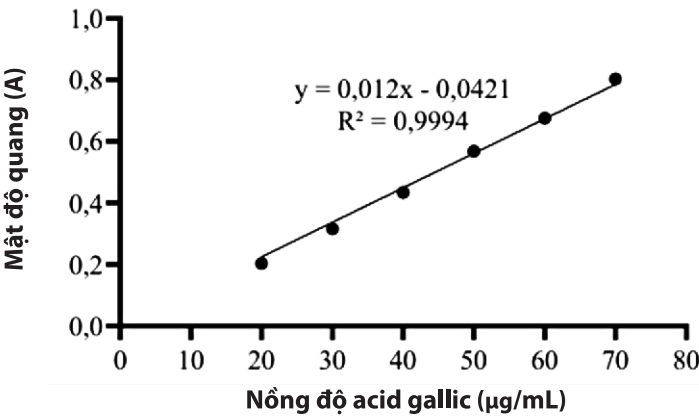


Mẫu thử và mẫu chuẩn có hình dạng phổ tương tự với duy nhất một đỉnh trong vùng bước sóng khảo sát. Tuy nhiên, đỉnh hấp thụ của mẫu thử và mẫu chuẩn không trùng khớp, cụ thể đỉnh của mẫu chuẩn ở bước sóng 760 nm và mẫu thử là 732,4 nm. Sự dịch chuyển này có thể giải thích bởi thành phần polyphenol trong hạt vải là một hỗn hợp phức tạp gồm nhiều hợp chất có cấu trúc khác nhau như flavonoid (catechin, proanthocyanidin), tannin và phenolic acid. Mỗi hợp chất này tạo phức hợp với thuốc

thử Folin-Ciocalteu có đặc trưng hấp thụ hơi khác biệt, dẫn đến phổ hấp thụ tổng hợp và dịch chuyển đỉnh so với chất chuẩn đơn chất là acid gallic.

Độ tuyến tính:

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Từ dung dịch chuẩn gốc acid gallic pha loãng chính xác để được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml. Đo độ hấp thụ của các dung dịch này ở bước sóng 760 nm.



Hình 3. Mối tương quan giữa mật độ quang và nồng độ acid gallic

Trong khoảng nồng độ làm việc của đường chuẩn (20–70 µg/mL), acid gallic có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và độ hấp thụ, đạt yêu cầu AOAC với $R^2 = 0,9994 \geq 0,99$ và phương trình $y = 0,012x - 0,0421$.

Độ lặp lại:

Độ lặp lại cùng ngày:

Tiến hành chiết 6 mẫu độc lập, đo UV - Vis 3 lần tại bước sóng 760 nm và lấy giá trị trung bình.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ lặp lại cùng ngày của phương pháp

Mẫu	Khối lượng bột hạt vải (g)	Hàm ẩm bột hạt vải (%)	Khối lượng cao khô đem cân (g)	Hàm ẩm cao khô (%)	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/10g cao khô)	Hàm lượng polyphenol Trung bình $\pm$ SD (mg GAE/10g cao khô)	RSD (%)
1	10,0095	10,72	0,5002	4,85	1468,84	1497,01 $\pm$ 20,69	1,38
2	10,0128		0,5028	4,96	1475,21		
3	10,0203		0,4996	4,93	1514,61		
4	10,0289		0,5020	4,68	1517,64		
5	10,0168		0,5107	4,72	1497,56		
6	10,0154		0,5003	4,81	1508,71		

(Hàm ẩm bột hạt vải xác định trên mẫu bột hạt vải đồng nhất, áp dụng chung cho 6 mẫu)

Tại mức hàm lượng >10%, độ lặp lại của phương pháp (RSD) phải đạt $\leq 2,0\%$ (Theo AOAC). Kết quả phân tích cho thấy RSD = 1,38%, như vậy độ lặp lại của phương pháp

định lượng polyphenol tổng số (tính theo acid gallic) trong hạt vải đạt yêu cầu của phép phân tích.

Độ lặp lại khác ngày:

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại khác ngày của phương pháp

Mẫu	Khối lượng bột hạt vải (g)	Hàm ẩm bột hạt vải (%)	Khối lượng cao khô đem cân (g)	Hàm ẩm cao khô (%)	Hàm lượng polyphenol (mg GAE/10g cao khô)	Hàm lượng polyphenol Trung bình $\pm$ SD (mg GAE/10g cao khô)	RSD (%)
1	10,0098	10,72	0,4952	4,90	1472,35	1505,33 $\pm$ 22,19	1,47



2	10,0112	0,5078	5,01	1498,15
3	10,0156	0,4946	4,88	1489,74
4	10,0275	0,5070	4,63	1519,46
5	10,0189	0,5056	4,67	1523,33
6	10,0214	0,5006	4,76	1528,92

(Hàm ẩm bột hạt vải xác định trên mẫu bột hạt vải đồng nhất, áp dụng chung cho 6 mẫu)

Tiến hành chiết 6 mẫu độc lập vào ngày khác, đo UV-Vis 3 lần tại bước sóng 760 nm và lấy giá trị trung bình. Kết quả phân tích cho thấy RSD = 1,47%, như vậy độ lặp lại khác ngày của phương pháp định lượng polyphenol tổng số (tính theo acid gallic) trong hạt vải đạt yêu cầu của phép phân tích.

Độ đúng:

Tiến hành chiết bột hạt Vải và thêm một lượng chính

xác chuẩn acid gallic có nồng độ lần lượt bằng 80%, 100%, 120% nồng độ tuyến tính bất kỳ vào mẫu thử đã xác định hàm lượng sao cho tổng nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Thực hiện mỗi nồng độ 3 mẫu lặp lại riêng biệt.

Sau đó đem đo mật độ quang và dựa vào phương trình đường chuẩn, tính được hàm lượng chuẩn thu hồi.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Mức (%)	STT	Lượng Acid gallic thêm vào (µg/ml)	Lượng Acid gallic thu được (µg/ml)	Độ thu hồi (%)	Trung bình ± SD (%)	RSD (%)
80%	1	40	39,25	98,12	99,32 ± 1,14	1,14
	2	40	39,78	99,45		
	3	40	40,15	100,38		
100%	1	50	50,88	101,76	99,97 ± 1,61	1,61
	2	50	49,32	98,64		
	3	50	49,75	99,50		
120%	1	60	59,91	99,85	100,15 ± 0,45	0,45
	2	60	59,95	99,92		
	3	60	60,40	100,67		

Định lượng Polyphenol toàn phần (tính theo acid gallic) đã nghiên cứu trên nền mẫu thử có độ thu hồi từ 98,12 - 101,76%, đều nằm trong giới hạn cho phép thẩm định về phương pháp đối với phân tích mẫu của AOAC (đối với mẫu

có hàm lượng >10%, lượng chuẩn tìm lại phải nằm trong khoảng 98-102%). Phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

Đánh giá hàm lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải

Bảng 5. Kết quả đánh giá hàm lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải

STT	Khối lượng bột hạt vải (g)	Hàm ẩm bột hạt vải (%)	Khối lượng cao khô đem cân (g)	Hàm ẩm cao khô (%)	Hàm lượng polyphenol toàn phần (mg GAE/10g cao khô)	Hàm lượng trung bình ± SD (mg GAE/10g cao khô)
1	10,0238	10,72	0,5046	4,98	1470,20	1485,63 ± 16,12
2	10,1168		0,4970	4,63	1484,34	
3	10,0054		0,5107	4,72	1502,36	

Hàm lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải được xác định trên 3 mẫu lặp lại độc lập. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol dao động từ 1470,20 đến 1502,36 mg GAE/10 g cao khô, với giá trị trung bình là 148,56 ± 1,61 mg GAE/g cao khô, tương đương 9,58 ± 0,10 mg GAE/g dược liệu.

BÀN LUẬN

Xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải bằng quang phổ UV-Vis

Phương pháp định lượng Polyphenol toàn phần dựa

trên phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu và đo quang tại bước sóng 760 nm đã được xây dựng và thẩm định thành công theo hướng dẫn của AOAC. Việc khảo sát bước sóng cực đại xác định 760 nm phù hợp với đặc trưng hấp thụ của phức hợp. Quy trình chiết xuất tối ưu với ethanol 50%, nhiệt độ 80°C và tỷ lệ dung môi/dược liệu 9:1 (ml/g) cho hiệu suất chiết tốt, giúp giải phóng hiệu quả các hợp chất polyphenol từ hạt vải. Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua việc so sánh phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn acid gallic trong vùng bước sóng 600-800 nm. Kết quả cho thấy cả hai phổ đều có hình dạng tương đồng, với chỉ một đỉnh

hấp thụ chính và không xuất hiện các đỉnh phụ lạ. Cụ thể, đỉnh hấp thụ cực đại của dung dịch chuẩn acid gallic xuất hiện tại 760 nm, trong khi mẫu thử hạt vải đạt cực đại tại 732,4 nm. Sự dịch chuyển bước sóng có thể giải thích bởi thành phần polyphenol trong hạt vải là một hỗn hợp phức tạp gồm nhiều hợp chất có cấu trúc hóa học khác nhau, chẳng hạn như flavonoid (catechin, epicatechin), proanthocyanidin (tannin ngưng tụ), phenolic acid. Việc định lượng này mang tính chất sàng lọc bước đầu. Phương trình hồi quy tuyến tính có hệ số tương quan $R^2 = 0,9994$ trong khoảng nồng độ 20-70 $\mu\text{g/ml}$, đạt yêu cầu AOAC ($\geq 0,99$), chứng tỏ độ tuyến tính rõ ràng và phù hợp cho định lượng. Độ lặp lại có cùng ngày và khác ngày có RSD thấp hơn nhiều so với giới hạn 2,0% theo AOAC, cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao và ổn định. Mẫu thử có độ thu hồi từ 98,12 - 101,76% nằm hoàn toàn trong khoảng cho phép 98-102% của AOAC, đáp ứng yêu cầu tiêu chuẩn AOAC.

Các thông số thẩm định đều đạt yêu cầu, chứng minh phương pháp định lượng bằng UV-Vis sử dụng thuốc thử Folin-Ciocalteu là đáng tin cậy để định lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải Việt Nam. Đây là cơ sở khoa học quan trọng để áp dụng trong kiểm nghiệm chất lượng nguyên liệu và sản phẩm từ hạt vải.

Đánh giá hàm lượng Polyphenol toàn phần trong hạt Vải

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải (tính theo acid gallic) đạt trung bình $148,56 \pm 1,61$ mg GAE/g cao khô, tương đương 9,58 mg GAE/g được liệu.

So sánh với nghiên cứu của Daorueang trên hạt vải Thái Lan, tổng hàm lượng polyphenol trong cao chiết đạt $89,5 \pm 3,7$ mg GAE/g cao chiết khi chiết bằng ethanol tuyệt đối [8]. Kết quả của nghiên cứu này ($148,56 \pm 1,61$ mg GAE/g cao khô) cao hơn rõ rệt. Sự khác biệt về hàm lượng polyphenol giữa các nghiên cứu có thể đến từ nhiều yếu tố. Về giống và nguồn gốc, hạt vải trong nghiên cứu này thuộc giống trồng tại Lục Ngạn (miền Bắc Việt Nam), khác biệt di truyền so với hạt vải Thái Lan [8]. Về điều kiện trồng trọt, khí hậu nhiệt đới gió mùa, lượng mưa và đặc điểm thổ nhưỡng vùng trồng ảnh hưởng đến khả năng tích lũy hợp chất phenolic thứ cấp trong hạt. Về kỹ thuật chiết, nghiên cứu này dùng ethanol 50% ở 80°C, có độ phân cực trung bình, ưu tiên chiết các polyphenol phân cực - trong khi Daorueang [8] dùng ethanol tuyệt đối; sự khác biệt về dung môi và nhiệt độ chiết dẫn đến độ chọn lọc và hiệu suất chiết polyphenol khác nhau.

Kết quả này khẳng định rằng hạt vải - một phụ phẩm thường bị loại bỏ trong chế biến quả vải - là nguồn nguyên liệu giàu polyphenol, có tiềm năng lớn để khai thác làm thực phẩm bảo vệ sức khỏe hoặc nguyên liệu được phẩm với hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm

mạnh. Việc đạt được hàm lượng cao và ổn định nhờ phương pháp đã thẩm định sẽ là nền tảng quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo về chiết xuất quy mô lớn, bào chế sản phẩm và đánh giá hoạt tính sinh học trên mô hình *in vitro/in vivo*.

KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng polyphenol toàn phần dựa trên phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu và đo quang phổ UV-Vis tại bước sóng 760 nm đã được xây dựng và thẩm định thành công theo tiêu chuẩn AOAC 2016 và ICH. Các thông số thẩm định (độ đặc hiệu, độ tuyến tính với $R^2 = 0,9994$, độ lặp lại $RSD \leq 2,0\%$ với độ thu hồi 98,12–101,76% đều đạt yêu cầu, chứng minh phương pháp đơn giản và đáng tin cậy khi áp dụng trên hạt vải Việt Nam.

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng polyphenol toàn phần trong hạt vải đạt trung bình $148,56 \pm 1,61$ mg GAE/g cao khô, tương đương 9,58 mg GAE/g được liệu. Hàm lượng này ở mức khá cao so với một số nghiên cứu trên hạt vải ở các quốc gia khác, khẳng định giá trị của phụ phẩm hạt vải - nguồn nguyên liệu giàu polyphenol có tiềm năng chống oxy hóa mạnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Menzel C. The lychee crop in Asia and the Pacific. *RAP publication*, 2002, 16.
2. Choi SA, Lee JE, Kyung MJ, Youn JH, et al. Anti-diabetic functional food with wasted litchi seed and standard of quality control. *Applied Biological Chemistry*, 2017, 60(2), pp.197-204.
3. Sai-ut S, Kingwascharapong P, Mazumder MAR, Rawdkuen S. Optimization of ethanolic extraction of phenolic antioxidants from lychee and longan seeds using response surface methodology. *Foods*, 2023, 12(15), pp.2827.
4. Zhu XR, Wang H, Sun J, Yang B, et al. Pericarp and seed of litchi and longan fruits: constituent, extraction, bioactive activity, and potential utilization. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2019, 20(6), pp.503-512.
5. Bộ Khoa học và Công nghệ. TCVN 9745-1:2013 (ISO 14502-1:2005, Định chính kỹ thuật 1:2006). *Chè - Xác định các chất đặc trưng của chè xanh và chè đen - Phần 1: Hàm lượng polyphenol tổng số trong chè - Phương pháp đo màu dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu*, Hà Nội, 2013.
6. AOAC International. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* (Appendix F), 2016.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*, 2005.
8. Daorueang D. Phenolic content and antioxidant activity of lychee seed extract. *Naresuan Phayao Journal*, 2019, 12(2), pp.25-27.