

Nghiên cứu định lượng hợp chất phenol toàn phần trong nhựa mù u dư phẩm (*C. inophyllum* L.) bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

Hà Minh Hiền¹, Hà Ngọc Mai¹, Nguyễn Khắc Quỳnh Cư¹
Võ Thị Bạch Huệ¹, Nguyễn Văn Thệ¹

¹Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

Đặt vấn đề

Nhựa dư phẩm thu được trong quá trình sản xuất và tinh chế dầu mù u chiếm tỷ lệ đáng kể. Thật vậy, hạt mù u chứa 41-51% dầu thô, trong dầu thô có 71,5% dầu béo và 28,5% nhựa. Dầu mù u từ lâu đã có nhiều tài liệu nghiên cứu về các hợp chất phenol như xanthon, coumarin... Nhưng bên cạnh sản phẩm là dầu, nhựa mù u dư phẩm cũng có thể có nhiều hợp chất phenol có ích bên trong thể chất nhựa phế thải^[1].

Để có thể tận dụng nguồn dư phẩm này và để làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tận thu các hợp chất phenol từ phế phẩm này, cần có một phương pháp phân tích xác định hợp chất phenol toàn phần. Phương pháp dung thuốc thử Folin-Ciocalteu sử dụng rộng rãi để xác định hợp chất phenol toàn phần có chứa acid phospho-tungstic và phospho-molybdic là chất oxy hóa bị khử bởi các nhóm OH phenol cho màu xanh lam có hấp thụ cực đại ở 765 nm do sự tạo phức xanh tungsten và xanh molybden. Tuy nhiên, đây là phương pháp chung. Các yếu tố như: hàm lượng, trình tự thêm thuốc thử, hàm lượng dung dịch natri carbonat, chất chuẩn sử dụng, thời gian chờ và nhiệt độ có thể phải điều chỉnh tùy theo mẫu. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài: "Nghiên cứu định lượng hợp chất phenol toàn phần trong nhựa mù u dư phẩm (*C. inophyllum* L.) bằng phương pháp quang phổ UV-Vis".

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Nhựa mù u dư phẩm của quá trình sản xuất dầu mù u thu được tại các nơi sản xuất dầu mù u tinh chế vào năm 2008 ở thành phố Hồ Chí Minh.

Thiết bị, hóa chất, dung môi

Máy quang phổ tử ngoại khả kiến Shimadzu UV-2450 (Nhật Bản).

Natri carbonat khan là loại tinh khiết phân tích, chuẩn acid gallic hàm lượng 99,2% (Sigma-Aldrich), thuốc thử Folin-Ciocalteu pha sẵn (Merck).

Phương pháp nghiên cứu

Dựa vào phương pháp định lượng hợp chất phenol toàn phần trong trà bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu, đo quang ở bước sóng 765 nm của ISO, tính lượng hợp chất phenol toàn phần theo acid gallic^[2,5]. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng^[3]. Tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng.

Chuẩn bị mẫu thử

Hòa tan các hợp chất phenol toàn phần bằng dung môi thích hợp rồi định mức đến thể tích quy định. Lọc mẫu thử. Lấy một thể tích xác định dịch lọc cho phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu trong môi trường kiềm của dung dịch natri carbonat 20%.

Chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác khoảng 0,1 gam chuẩn acid gallic, hòa tan trong nước và pha loãng thành 100 mL thu được dung dịch chuẩn gốc acid gallic khoảng 1 mg/mL. Sau đó lần lượt hút 1, 2, 3, 4 và 5 mL dung dịch chuẩn gốc acid gallic và pha loãng thành 100 mL để thu được các dung dịch acid gallic có nồng độ khoảng 10, 20, 30, 40 và 50 µg/mL. Thêm vào các dung dịch này thuốc thử Folin-Ciocalteu, nước, dung dịch natri carbonat 20%. Mẫu thử và mẫu chuẩn để yên 30 phút rồi tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm. Tiến hành song song với mẫu trắng.

Thay đổi hàm lượng, trình tự thêm thuốc thử.

Kết quả và bàn luận

Thẩm định phương pháp định lượng hợp chất phenol toàn phần trong dịch chiết nước

Tính tuyến tính

Khảo sát khoảng tuyến tính của dung dịch chuẩn acid gallic

- Chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác 100 mg chuẩn acid gallic cho vào bình định mức 100 mL. Pha loãng bằng nước đến thể tích để được dung dịch chuẩn gốc 1 mg/mL. Lần lượt hút 1,25, 2,5, 3,75, 5,0 và 6,25 mL dung dịch chuẩn gốc này cho vào bình định mức 50 mL và pha loãng bằng nước đến thể tích. Sau đó hút mỗi bình 1 mL các dung dịch trên cho vào các bình định mức 25 mL. Thêm chính xác 1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu, 10 mL nước, dung dịch natri carbonat 20% đến thể tích. Để yên 30 phút, đo mật độ quang các dung dịch chuẩn tại bước sóng 765 nm

Tiến hành song song với mẫu trắng có thuốc thử

Bảng 1: Kết quả khảo sát tính tuyến tính trên dung dịch chuẩn acid gallic

STT	Nồng độ acid gallic ($\mu\text{g/mL}$)	A_{765}
1	1	0,122
2	2	0,263
3	3	0,394
4	4	0,508
5	5	0,652
6	6	0,765
7	7	0,859

Phương trình hồi quy $y = 0,124x$
 $R^2 = 0,9972$

Khảo sát khoảng tuyến tính của dịch chiết nước hợp chất phenol toàn phần

- Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 1 g nhựa cho vào bình nón 100 mL, thêm 30 mL nước. Sau đó đem siêu âm trong 60 phút, cho vào bình lắng 125 mL, tráng với 10 mL nước cất, thu lớp nước cho vào bình định mức 50 mL và pha loãng bằng nước đến thể tích. Lọc qua 2 lớp giấy lọc, bỏ 10 mL dịch lọc đầu. Lần lượt lấy 1, 2, 3, 4 và 5 mL dịch lọc thu được cho vào bình định mức

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ đúng

Mức chuẩn thêm vào	Lượng chuẩn thêm vào (μg)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lượng chuẩn tìm thấy (μg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80%	1,6	0,363	0,389	0,389	1,24	77,5
100%	2,0	0,409	0,416	0,433	1,55	77,5
120%	2,4	0,446	0,46	0,491	1,93	80,4

Tỷ lệ phục hồi trung bình: 78,5%

25 mL. Thêm chính xác 1 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu, 10 mL nước cất, dung dịch natri carbonat 20% đến thể tích. Để yên 30 phút, lọc qua 2 lần giấy lọc, đo mật độ quang các dung dịch thử tại bước sóng 765 nm

Tiến hành song song với mẫu trắng có thuốc thử.

Bảng 2: Kết quả khảo sát tính tuyến tính trên dịch chiết nước

STT	Thể tích dịch chiết (mL)	Độ hấp thụ (A_{765})
1	1	0,238
2	2	0,411
3	3	0,564
4	4	0,759
5	5	0,844

Phương trình hồi quy $y = 0,156x$
 $R^2 = 0,9888$

Độ lặp lại

Tiến hành chuẩn bị mẫu thử như trong phần khảo sát khoảng tuyến tính của dịch chiết nước hợp chất phenol toàn phần. Lấy 1 mL dịch lọc đem đo mật độ quang tại bước sóng 765 nm. Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD = 2,04%

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	Độ hấp thụ (A_{765})	Hàm lượng (%)	Kết quả
1	0,241	0,241	$\bar{X} = 0,245\%$ $SD = 0,005$ $RSD = 2,04\%$ $\mu = 0,245 \pm 0,005\%$
2	0,242	0,243	
3	0,238	0,238	
4	0,250	0,250	
5	0,247	0,248	
6	0,251	0,251	

Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn

Thêm một lượng chuẩn acid gallic tương ứng với 80%, 100% và 120% hàm lượng mẫu thử vào 1 mL dịch chiết, sau đó cho phản ứng với thuốc thử Folin-Ciocalteu rồi đem đo mật độ quang tại bước sóng 765 nm. Xác định tỷ lệ phục hồi. Mỗi mẫu thực hiện 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Các số liệu ghi trong bảng 4 cho thấy phương pháp có độ đúng thấp với tỷ lệ phục hồi trung bình là 78,5%

Thẩm định phương pháp định lượng hợp chất phenol toàn phần trong dịch chiết kiềm

Hàm lượng thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%

Khảo sát khoảng tuyến tính của dung dịch chuẩn acid gallic

- Chuẩn bị mẫu chuẩn:

Cân chính xác 100 mg acid gallic cho vào bình định mức 100 mL. Pha loãng bằng nước để được dung dịch chuẩn gốc 1 mg/mL. Hút lần lượt 1,25, 2,5, 3,75; 5,0 và 6,25 mL và pha loãng bằng nước đến thể tích. Sau đó hút mỗi bình 1 mL dung dịch vừa pha loãng cho vào bình định mức 25 mL. Thêm chính xác 10 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, dung dịch natri carbonat 20% vừa đủ tới vạch. Để yên 30 phút, đo độ hấp thụ tại bước sóng 765 nm

Tiến hành song song với mẫu trắng có thuốc thử

Bảng 5: Kết quả khảo sát tính tuyến trên dung dịch chuẩn acid gallic

Stt	Nồng độ acid gallic (µg/mL)	A ₇₆₅
1	1	0,086
2	2	0,186
3	3	0,284
4	4	0,390
5	5	0,482
6	6	0,590
7	7	0,675

Phương trình hồi quy: $y = 0,099x - 0,0114$

$R^2 = 0,9995$

Khảo sát khoảng tuyến tính của dịch chiết kiềm hợp chất phenol toàn phần

- Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 1 gam nhựa Mù u, lắc 3 lần với dung dịch natri carbonat 20%, mỗi lần với 10 mL. Lọc qua 2 lớp giấy lọc, tráng lọc 2 lần bằng dung dịch natri carbonat 20%, mỗi lần 5 mL. Bổ sung dung dịch natri carbonat 20% vừa đủ 50 mL. Lần lượt lấy 1, 2, 3, 4 và 5 mL dịch lọc thu được cho vào bình định mức 25 mL

Bảng 8: Kết quả khảo sát độ đúng

Mức chuẩn thêm vào	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	A ₇₆₅			Lượng chuẩn tìm thấy (µg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
		Lần 1	Lần 2	Lần 3		
80%	2,9	0,469	0,464	0,467	2,7	93,1
100%	3,63	0,536	0,531	0,536	3,38	93,1
120%	4,36	0,595	0,598	0,593	3,99	91,5

Tỷ lệ phục hồi trung bình: 92,6%

Thêm chính xác 10 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%, dung dịch natri carbonat 20% đến thể tích. Để yên 30 phút, lọc qua 2 lần giấy lọc, đo mật độ quang các dung dịch thử tại bước sóng 765 nm.

Tiến hành song song với mẫu trắng có thuốc thử.

Bảng 6: Kết quả khảo sát tính tuyến trên dịch chiết kiềm

STT	Thể tích dịch chiết (mL)	Độ hấp thụ (A ₇₆₅)
1	1	0,12
2	2	0,215
3	3	0,273
4	4	0,296
5	5	0,323

Phương trình hồi quy: $y = 0,0487x + 0,0993$

$R^2 = 0,9124$

Độ lặp lại

Tiến hành chuẩn bị mẫu thử như trong phần khảo sát khoảng tuyến tính của dịch chiết kiềm hợp chất phenol toàn phần. Lấy 2 mL dịch lọc đem đo mật độ quang tại bước sóng 765 nm. Kết quả trình bày ở bảng 7 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD = 1,56%.

Bảng 7: Kết quả khảo sát độ lặp lại

Stt	Độ hấp thụ (A ₇₆₅)	Hàm lượng (%)	Kết quả
1	0,208	0,07	$\bar{X} = 0,07\%$ $SD = 0,001$ $RSD = 1,56\%$ $\mu = 0,07 \pm 0,001\%$
2	0,215	0,072	
3	0,209	0,07	
4	0,208	0,07	
5	0,206	0,069	
6	0,207	0,069	

Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn như trong phần độ đúng của mục thẩm định phương pháp

Các số liệu ghi trong bảng 8 cho thấy phương pháp có độ đúng cải thiện với tỷ lệ phục hồi trung bình là 92,6%.

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Hàm lượng thuốc thử Folin-Ciocalteu 20%

Khảo sát khoảng tuyến tính của dịch chiết kiểm hợp chất phenol toàn phần

- Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu thử: Tiến hành như trên nhưng thay bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu 20%

Bảng 9: Kết quả khảo sát tính tuyến tính trên dung dịch chuẩn acid gallic

STT	Nồng độ acid gallic (µg/mL)	A ₇₆₅
1	1	0,118
2	2	0,264
3	3	0,390
4	4	0,502
5	5	0,650
6	6	0,766
7	7	0,859

Phương trình hồi quy: $y = 0,1245x - 0,0114$
 $R^2 = 0,9971$

Bảng 10: Kết quả khảo sát tính tuyến tính trên dịch chiết kiểm

STT	Thể tích dịch chiết (mL)	Độ hấp thu (A ₇₆₅)
1	1	0,098
2	2	0,148
3	3	0,196
4	4	0,241
5	5	0,269

Phương trình hồi quy: $y = 0,0435x + 0,0599$
 $R^2 = 0,9904$

Bảng 12: Kết quả khảo sát độ đúng

Mức chuẩn thêm vào	Lượng chuẩn thêm vào (µg)	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lượng chuẩn tìm thấy (µg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80%	2,42	0,571	0,561	0,562	2,33	96,3
100%	3,03	0,667	0,657	0,659	3,1	102,3
120%	3,64	0,724	0,735	0,713	3,61	99,2

Tỷ lệ phục hồi trung bình. 99,3%

Tỷ lệ phục hồi theo AOAC 95-105%

Phương pháp định lượng hợp chất phenol toàn phần trong nhựa mù u dư phẩm với hàm lượng và trình tự thêm thuốc thử Folin-Ciocalteu khác nhau cho kết quả: dịch chiết nước: $0,245 \pm 0,005\%$, dịch chiết kiểm và thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% $0,07 \pm 0,001\%$; dịch chiết kiểm và thuốc thử Folin-Ciocalteu 20%: $0,065 \pm 0,001\%$.

Bàn luận

Theo phương pháp của ISO xác định hợp chất phenol toàn phần trong trà bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu (ISO 14502-1), mẫu thử chiết

Độ lặp lại

Tiến hành chuẩn bị mẫu thử như trong phần khảo sát khoảng tuyến tính của dịch chiết hợp chất phenol toàn phần. Lọc qua 2 lần giấy lọc, đo mật độ quang các dung dịch thử tại bước sóng 765 nm.

Lấy 2 mL dịch lọc đem đo mật độ quang tại bước sóng 765 nm. Kết quả trình bày ở bảng 11 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD = 2,14%

Bảng 11: Kết quả khảo sát độ lặp lại

STT	Độ hấp thu (A ₇₆₅)	Hàm lượng (%)	Kết quả
1	0,261	0,063	$\bar{X} = 0,065\%$ SD = 0,001 RSD = 2,14% $\mu = 0,065 \pm 0,001\%$ RSD theo AOAC = 3,7%
2	0,273	0,066	
3	0,263	0,064	
4	0,267	0,065	
5	0,27	0,066	
6	0,262	0,063	

Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn như trong phần độ đúng của mục thẩm định phương pháp

Các số liệu ghi trong bảng 12 cho thấy phương pháp có độ đúng cao với tỷ lệ phục hồi trung bình là 99,3%

bảng dung môi có nước, cho thuốc thử vào dịch chiết, để yên từ 3-8 phút rồi thêm dung dịch natri carbonat, sau đó để yên trong 60 phút để tạo màu^[5] Phương pháp đề nghị mặc dù có khác biệt với phương pháp ISO về trình tự thêm thuốc thử Folin-Ciocalteu và dung dịch natri carbonat vẫn phù hợp với quy trình gốc do Folin và Ciocalteu đề xuất^[6] Thời gian tạo màu chỉ trong 30 phút và hàm lượng thuốc thử Folin-Ciocalteu là 20%. Với mẫu nhựa khi xử lý bằng

(Xem tiếp trang 16)