



DOI:10.22144/ctujos.2024.346

## THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG L-CITRULLINE TRONG MỘT SỐ LOẠI DƯA HẦU BẰNG PHƯƠNG PHÁP UV-VIS

Vi Nhã Trần<sup>1,2\*</sup>, Trương Huỳnh Anh<sup>2</sup>, Phạm Thúy Nguyễn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoàng Oanh<sup>2</sup>, Nguyễn Ngọc Trang Thùy<sup>2</sup>, Trần Thị Minh Thu<sup>2</sup> và Lại Quốc Đạt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Kỹ thuật - Công nghệ Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): vntran.sdh222@hcmut.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 28/04/2024

Sửa bài (Revised): 19/06/2024

Duyệt đăng (Accepted): 03/07/2024

**Title:** Validation of UV-Vis method to determine L-citrulline in some watermelon species

**Author(s):** Vi Nha Tran<sup>1,2\*</sup>, Trương Huỳnh Anh<sup>2</sup>, Phạm Thúy Nguyễn<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoàng Oanh<sup>2</sup>, Nguyễn Ngọc Trang Thùy<sup>2</sup>, Trần Thị Minh Thu<sup>2</sup> và Lại Quốc Đạt<sup>1</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1</sup>Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam National University Ho Chi Minh City; <sup>2</sup>Can Tho University of Technology

### TÓM TẮT

Dưa hấu là một loại trái cây giàu L-citrulline, đặc biệt là trong vỏ quả, L-citrulline giúp cải thiện sức khỏe tim mạch, tăng cường miễn dịch và các lợi ích về sức khỏe tình dục. Phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis được sử dụng để xác định hàm lượng L-citrulline trong vỏ và thịt quả của bốn loại dưa hấu khác nhau ở bước sóng 490 nm. Kết quả là cả bốn loại dưa hấu khảo sát có hàm lượng L-citrulline trong thịt quả dao động từ 0,580 đến 1,12 mg/g ít hơn hàm lượng L-citrulline trong vỏ dưa hấu (0,76 đến 1,28 mg/g) (căn bản khô). Phương pháp định lượng L-citrulline bằng UV-Vis được thẩm định về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ lặp và tái lặp, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Tất cả kết quả đều có hệ số tương quan R<sup>2</sup>, độ tin cậy R và giá trị RSD đạt yêu cầu theo quy định AOAC (2016). Do đó phương pháp UV-Vis có thể sử dụng để xác định hàm lượng L-citrulline trong các loại trái cây khác trong tự nhiên.

**Từ khóa:** Diacetyl monoxime, dưa hấu, L-citrulline, thẩm định, UV-Vis

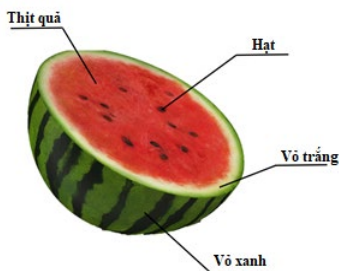
### ABSTRACT

Watermelon is a fruit rich in L-citrulline, especially in the fruit's skin, which improves heart health, boosts immunity and provides sexual health benefits. UV-Vis spectroscopy method was used to determine the L-citrulline content in the rind and flesh of four different watermelons at a wavelength of 490 nm. As a result, all four kinds of surveyed watermelon had L-citrulline content in watermelon flesh juice ranging from 0.580 to 1.12 mg/g, less than the L-citrulline content in watermelon rind juice (0.76 to 1.28 mg/g) (dwt). The method was validated for specificity, linearity, repeatability and repeatability, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. All results in correlation coefficient R<sup>2</sup>, reliability R and relative standard deviation RSD were required according to AOAC regulations (2016). Therefore, the UV-Vis method can be used to determine L-citrulline content in other natural fruits.

**Keywords:** Diacetyl monoxime, watermelon, L-citrulline, validation, UV-Vis

### 1. GIỚI THIỆU

Dưa hấu (*Citrullus lanatus* Thumb.) thuộc họ *Cucurbitaceae*, là nhóm cây chịu hạn, cây dạng thân leo, có bộ rễ lan xa (Paris et al., 2017). Quả có vỏ cứng, nhẵn và đa dạng về hình dạng, màu sắc, có thể nặng từ 2-15 kg. Hình dạng chính là thuôn dài, dạng oval hoặc tròn. Màu sắc của quả cũng thay đổi từ xanh đen, xanh đậm, xanh nhạt, có sọc hoặc không có sọc, một số giống mới lai tạo thì có cả màu vàng (Paris et al., 2017).



**Hình 1. Cấu tạo quả dưa hấu**

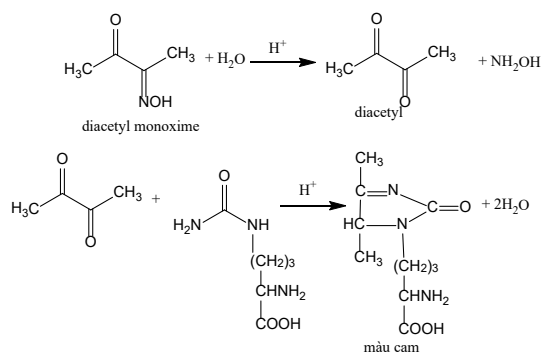
(Neglo et al., 2021)

Quả có thể được chia làm 3 phần chính: thịt quả, hạt và phần vỏ (Hình 1), trong đó phần thịt chiếm khoảng 68% tổng khối lượng, vỏ xấp xỉ 30% và hạt khoảng 2% (Abu-Hiamed, 2017). Phần vỏ chứa nhiều vitamin và muối khoáng, đặc biệt với lượng L-citrulline dồi dào nhất trong tự nhiên (Rimando & Perkins-Veazie, 2005; Duran Barón et al., 2021). Khi nhu cầu sử dụng và chế biến sản phẩm từ dưa hấu ngày càng tăng thì nguồn phụ phẩm vỏ dưa hấu thải ra môi trường ngày càng lớn. Với thành phần chiếm đến 30 - 35% tổng khối lượng quả và giàu L-citrulline hơn thịt quả (Rimando & Perkins-Veazie, 2005), vỏ dưa hấu là một nguồn tài nguyên tốt nên được tận dụng để chiết xuất L-citrulline. Việc tái sử dụng vừa giúp bảo vệ môi trường vừa mang lại hiệu quả cao trong thu hồi L-citrulline. Ở Việt Nam, dưa hấu là một loại trái cây được trồng rộng rãi có sản lượng lớn và vỏ dưa hấu hầu hết là bỏ đi (Đông & Thủy, 2020), vì vậy rất thuận lợi để làm nguồn thu L-citrulline.

Citrulline được tổng hợp trong cơ thể người một cách tự nhiên như một phụ phẩm của quá trình tổng hợp nitric oxide (NO) từ arginine, có vai trò chống oxy hóa và giãn mạch tiềm năng (Rimando & Perkins-Veazie, 2005; Caruso et al., 2017). Citrulline cũng như nhiều loại amino acid khác là thường tồn tại trong tự nhiên ở dạng L, do đó được gọi là L-citrulline (Paris, 2015; Ridwan et al., 2018a). L-citrulline là một α-amino acid không thiết

yếu có thể được tổng hợp trong cơ thể từ các hợp chất khác. L-citrulline có khả năng giảm đau mỗi cơ, tăng sức bền vận động và cải thiện chức năng sinh lý nam (Ridwan et al., 2018b). Loại amino acid này được bổ sung vào đồ uống dinh dưỡng thể thao và được xem là một loại thực phẩm chức năng dạng viên hay bột (Duran Barón et al., 2021).

Một số công trình trên thế giới đã công bố về phương pháp phân tích L-citrulline bằng các phương pháp như phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS) (Wenge et al., 2010), phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) (Gupta et al., 2019), phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Ridwan et al., 2018a, 2018b; Corleto et al., 2019; Johnson et al., 2022). Tuy nhiên phương pháp HPLC đòi hỏi nhiều kỹ thuật và thiết bị đặc tiền hơn các phương pháp khác, phương pháp TLC là phương pháp phổ biến được ứng dụng chủ yếu trong quá trình tách chất hơn là phân tích định lượng so với phương pháp UV-Vis và phương pháp HPLC. Ngoài ra cả phương pháp TLC và HPLC đều sử dụng khá nhiều dung môi trong quá trình phân tích và định lượng. Vì vậy trong bài báo này, phương pháp UV-Vis được ứng dụng để định lượng L-citrulline trong vỏ và thịt quả dưa hấu của bốn loại dưa hấu là Hắc Mỹ Nhân, Thành Long, Mặt Trời Đỏ và Huỳnh Châu tại thành phố Cần Thơ và thẩm định lại phương pháp này. Trong đó kỹ thuật quang phổ hấp thụ UV-Vis được sử dụng từ năm 1939 để xác định hàm lượng citrulline dựa trên sự hình thành hợp chất màu (độ hấp thụ cực đại ở 490 nm đối với citrulline) do phản ứng của L-citrulline với diacetyl monoxime trong môi trường acid theo cơ chế được mô tả bởi Holmes (1968) (Hình 2):



**Hình 2. Phản ứng tạo hợp chất màu của L-citrulline với diacetyl monoxime trong môi trường acid**

(Holmes, 1968)

Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ L-citrulline trong một phạm vi nhất

định (Fearon, 1939). Fearon (1939) còn cho rằng cường độ màu cam là kết quả của quá trình oxy hóa một vòng pyrimidine chuyển hóa thành (Holmes, 1968). Quá trình thẩm định được thực hiện với các tiêu chí như độ tuyến tính, độ lặp lại và tái lập, độ đúng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và phương pháp

#### 2.1.1. Nguyên liệu và hóa chất sử dụng

*Nguyên liệu:* Bốn loại dưa hấu được chuẩn bị cho thí nghiệm (Hình 3) bao gồm dưa hấu ruột đỏ có hạt Hắc Mỹ Nhân (xuất xứ Long An), dưa hấu ruột đỏ có hạt Thành Long (xuất xứ Long An) dưa hấu ruột đỏ không hạt Mặt Trời Đỏ (xuất xứ Long An) và dưa hấu vàng có hạt Huỳnh Châu (xuất xứ Long An) được mua tại nhà vườn quận Bình Thủy, TP. Cần Thơ. Các quả dưa hấu được lựa chọn theo tiêu chí là cuống còn xanh, vỏ cứng, không bị sâu, khối lượng trung bình một quả 1,5 ÷ 2 kg. Các quả dưa hấu được bảo quản ở nhiệt độ phòng và được tách riêng phần vỏ trắng để thu lấy dịch ép từ vỏ và

thịt quả dưa hấu. Thí nghiệm được thực hiện với tổng số quả dưa hấu là 12 quả, 3 quả cho mỗi loại dưa hấu.

*Dịch ép vỏ và thịt quả dưa hấu:* Quả dưa hấu sau khi mua về sẽ được rửa sạch bằng dung dịch NaCl 10% rồi được rửa lại dưới vòi nước chảy để loại bỏ đất, bụi và vi sinh vật bám trên vỏ dưa hấu. Dùng dao bằng thép không gỉ để gọt bỏ vỏ xanh và tách hạt. Vỏ trắng và thịt quả dưa hấu sẽ được ép bằng máy ép trái cây ở nhiệt độ phòng. Dịch ép sẽ được lọc qua vải lọc có kích thước lỗ 1 µm để loại bỏ xác quả. Dịch lọc thô được tiếp tục lọc qua giấy lọc bằng thiết bị lọc chân không được loại bỏ các thành phần lơ lửng của thịt quả. Các dịch lọc sẽ được đem đi phân tích hàm lượng L-citrulline.

*Hóa chất sử dụng:* L-citrulline (tinh khiết 98%) (Đức), sodium hydroxide (Việt Nam), diacetyl monoxime (DAMO) (Đức), hydrochloric acid (Trung Quốc), phosphoric acid (Trung Quốc), sulfuric acid (Việt Nam), than hoạt tính (Việt Nam), methanol (Trung Quốc).



a. Dưa hấu Hắc Mỹ Nhân

b. Dưa hấu Thành Long

c. Dưa hấu Mặt Trời Đỏ

d. Dưa hấu Huỳnh Châu

**Hình 3: Các loại dưa hấu được sử dụng trong nghiên cứu**

#### 2.1.2. Phương pháp phân tích hàm lượng L-citrulline trong vỏ dưa hấu

Dịch chiết 10 mL vỏ trắng và thịt quả dưa hấu của bốn loại dưa hấu được khử màu bằng 2 g than hoạt tính, sau đó dịch này sẽ được pha loãng đến nồng độ thích hợp sao cho nồng độ của L-citrulline của mẫu nằm trong khoảng nồng độ của đường chuẩn. Tiếp theo, thêm vào 1 mL dung dịch đã pha loãng lần lượt là 4 mL nước cất, 2 mL hỗn hợp sulfuric acid và phosphoric acid (tỉ lệ thể tích 3:1), 0,25 mL dung dịch DAMO 30 g/L. Đun nóng các dung dịch trong bể điều nhiệt ở nhiệt độ 100°C trong

30 phút. Các mẫu được để nguội về nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ bằng máy quang phổ UV-Vis tại bước sóng 490 nm (Wenge et al., 2010). Thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp. Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp.

### 2.2. Thẩm định phương pháp UV-Vis

Sau khi thu được kết quả định lượng L-citrulline của các loại dưa hấu, chúng tôi tiến hành thẩm định phương pháp trên vỏ dưa của một trong bốn loại dưa hấu khảo sát với các tiêu chí sau:

2.2.1. Độ đặc hiệu

Quét phổ UV-Vis của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử trong khoảng bước sóng (200 - 800 nm). Ghi nhận phổ UV-Vis của mẫu thử có  $\lambda_{max}$  tương tự  $\lambda_{max}$  mẫu chuẩn; mẫu trắng không có độ hấp thụ tại  $\lambda$  đó. Trong đó mẫu trắng chỉ bao gồm 4 mL nước cất, 2 mL hỗn hợp sulfuric acid : phosphoric acid (tỉ lệ thể tích 3:1), 0,25 mL dung dịch DAMO 30 g/L. Mẫu chuẩn là mẫu L-citrulline 500 mg/L. Mẫu thử là mẫu nước ép vỏ dưa hấu pha loãng 30 lần.

2.2.2. Độ tuyến tính

– Cách tiến hành:

**Chuẩn bị dung dịch L - citrulline chuẩn:** Cân 25 mg bột L-citrulline chuẩn và định mức lên 25 mL bằng nước cất để thu được dung dịch L-citrulline chuẩn có nồng độ 1000 mg/L. Pha loãng về các nồng độ 200, 400, 600, 800 mg/L.

**Xây dựng đường chuẩn:** Dùng micropipet hút 0,5 mL dung dịch L-citrulline ở các nồng độ trên cho vào các ống nghiệm. Tiếp tục được pha loãng 0,5 mL các dung dịch này với 3,5 mL nước cất và đưa qua máy vortex để đồng nhất. Sau đó hút 0,5 mL dung dịch từ các ống nghiệm vào 6 ống nghiệm khác để tiến hành phản ứng tạo hợp chất màu với DAMO theo phương pháp của Wenge et al. (2010). Đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm của 6 ống nghiệm trên. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

– Tính toán:

Xây dựng phương trình hồi quy giữa độ hấp thụ và nồng độ L-citrulline (mg/L) bằng đồ thị y và x. Xác định giá trị  $R^2$ .

– Chỉ tiêu đánh giá: Giá trị  $R^2$ .

2.2.3. Độ lặp lại

– Cách tiến hành:

Hấp phụ 10 mL nước ép vỏ dưa hấu qua 2 g than hoạt tính để khử màu. Pha loãng 0,5 mL dịch trích đã lọc với a mL nước cất (a lần lượt là 1,5; 3,5; 5; 10; 25; 50). Các dịch pha loãng sẽ được phản ứng tạo hợp chất màu với DAMO theo phương pháp của Wenge et al. (2010). Đo độ hấp thụ các mẫu ở bước sóng 490 nm. Độ lặp lại được thực hiện với mỗi mẫu pha loãng được lặp lại 3 lần. Độ tái lặp được thực hiện trên mẫu pha loãng 10 lần và lặp lại 6 lần.

– Tính toán:

Từ phương trình đường chuẩn, tính được hàm lượng L-citrulline của mẫu sau khi pha loãng x (g/L). Hàm lượng L-citrulline X (g/L) trong mẫu ban đầu là:

$$X \text{ (g/L)} = x * f$$

Trong đó, f là hệ số pha loãng mẫu.

– Chỉ tiêu đánh giá: Nồng độ L-citrulline trung bình  $\bar{C}$  (mg/L), độ lệch chuẩn SD (%) và độ lệch chuẩn tương đối RSD (%).

2.2.4. Độ đúng

– Cách tiến hành:

**Chuẩn bị mẫu gốc:** pha dung dịch chuẩn L-citrulline có nồng độ 1000 mg/L.

**Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn:** Hấp phụ 10 mL nước ép vỏ dưa hấu qua 2 g than hoạt tính để khử màu. Hút 5 mL dịch lọc rồi thêm chính xác 0,1 mL dung dịch chuẩn 1000 mg/L (thêm chuẩn 100 mg/L) (Ridwan et al., 2018a). Pha loãng 0,5 mL dịch đã thêm chuẩn với 3,5 mL nước cất. Hút 0,5 mL dịch trên vào 1 ống nghiệm mới để tiến hành phản ứng hợp chất màu với DAMO theo Wenge et al. (2010). Đo độ hấp thụ của mẫu ở bước sóng 490 nm. Xác định nồng độ L-citrulline trong dịch pha loãng x (g/L) bằng phương pháp nội suy từ phương trình đường chuẩn. Lặp lại thí nghiệm này với thể tích thêm chuẩn là 0,1 mL; 0,2 mL; 0,4 mL dung dịch chuẩn 1000 mg/L. Mỗi nồng độ chất thêm chuẩn được lặp lại 6 lần.

– Tính toán:

Độ thu hồi  $R_{th}$  (%):

$$R_{th} \text{ (%) } = \frac{C_{tc} - C_o}{C_c} \times 100\%$$

trong đó:  $C_{tc}$  là nồng độ đo được trong mẫu thêm chuẩn,  $C_o$  là nồng độ đo được trong mẫu không thêm chuẩn,  $C_c$  là nồng độ chuẩn thêm vào.

- Chỉ tiêu đánh giá: Độ thu hồi  $R_{th}$  (%).

2.2.5. Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ tin cậy dựa trên mẫu thử

– Cách tiến hành:

Hấp phụ 10 mL nước ép vỏ dưa hấu qua 2 g than hoạt tính để khử màu. Pha loãng 0,5 mL dịch trích đã lọc với 50 mL nước cất. Dịch pha loãng sẽ được phản ứng tạo hợp chất màu với DAMO theo phương pháp của Wenge et al. (2010). Đo độ hấp thụ các mẫu ở bước sóng 490 nm. Thí nghiệm được lặp lại 10 lần (n = 10).

– Tính toán:

Giới hạn phát hiện LOD (mg/L):

$$LOD = SD \times 3$$

Giới hạn định lượng LOQ (mg/L):

$$LOQ = SD \times 10$$

Đánh giá độ tin cậy của LOD bằng giá trị R, trong đó R được tính bằng công thức:

$$R = \frac{\bar{C}}{LOD}$$

– Chỉ tiêu đánh giá: độ tin cậy R.

### 2.3. Xử lý kết quả

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013 để xác định độ tuyến tính, tính toán các giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối, độ thu hồi. Các thông số thẩm định phương pháp như giá  $R^2$ , độ lệch chuẩn tương đối, độ thu hồi và độ tin cậy của LOD được đối chiếu theo hướng dẫn của AOAC (2016).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

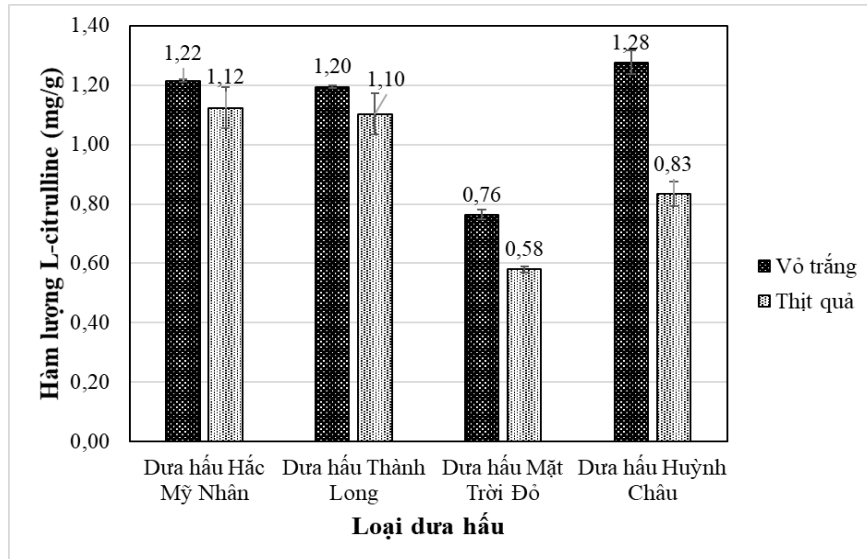
### 3.1. Hàm lượng L-citrulline trong vỏ và thịt quả của một số loại dưa hấu

Trong Hình 4, hàm lượng L-citrulline trong các bộ phận thịt quả và vỏ trắng của các loại dưa hấu khác nhau. Chứng tỏ L-citrulline được phân bố khác nhau trong dưa hấu phụ thuộc vào loại dưa hấu. Nhìn chung, L-citrulline tập trung nhiều trong vỏ trắng của quả dưa hấu ở các loại dưa hấu được khảo sát. Khi so sánh ba loại dưa cùng màu thịt quả là màu đỏ thì dưa hấu có hạt Hắc Mỹ Nhân và Thành Long có hàm lượng L-citrulline trong vỏ và thịt quả đều cao hơn loại dưa hấu không hạt Mặt Trời Đỏ. Đối với ba loại dưa hấu có hạt nhưng khác nhau về màu thịt quả, loại dưa hấu ruột vàng Huỳnh Châu có hàm lượng L-citrulline trong vỏ cao hơn nhưng trong thịt quả lại thấp hơn hai loại dưa hấu ruột đỏ có hạt. Điều này chứng tỏ sự lai tạo giống dưa hấu mới cũng ảnh hưởng đến sự phân bố L-citrulline trong quả dưa hấu.

Một số nghiên cứu cũng cho kết quả về L-citrulline trong vỏ dưa hấu là lớn nhất. Kết quả so sánh hàm lượng L-citrulline trong vỏ và thịt quả sẽ

khác nhau khi phương pháp tính (cân bản khô hoặc cân bản ướt) cũng như phương pháp phân tích khác nhau. Vỏ dưa hấu sẽ chứa hàm lượng L-citrulline theo trọng lượng tươi lớn hơn trong thịt quả nhưng sẽ cho kết quả ngược lại khi tính theo trọng lượng khô (Rimando & Perkins-Veazie, 2005; Ridwan et al., 2018a). Rimando và Perkins-Veasiz còn giải thích rằng sự khác biệt này là do độ ẩm của hai bộ phận khác nhau, cụ thể là 95% ẩm ở vỏ dưa và 90% ẩm ở ruột dưa. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu của Rimando and Perkins-Veasiz (2005) đối với loại dưa ruột đỏ thì hàm lượng L-citrulline trong cả thịt quả và vỏ trắng của dưa hấu không hạt đều lớn hơn dưa hấu có hạt.

Gu et al. (2023) cũng phân tích được thịt quả dưa hấu có hàm lượng citrulline cao nhất bằng cách sử dụng mô hình đơn lớp tế bào *Caco-2* biểu mô ruột người trong ống nghiệm (Gu et al., 2023). Gu và cộng sự còn giải thích sự khác nhau này là do sự khác nhau trong quá trình tiêu thụ thức ăn khác nhau của các bộ phận dưa hấu, kết quả sinh khả dụng citrulline cho thấy tỉ lệ vận chuyển trong vỏ dưa hấu cao hơn so với trong thịt quả. Ngoài ra, kết quả ở Hình 4 cũng cho thấy hàm lượng L-citrulline trong vỏ dưa hấu ruột vàng Huỳnh Châu có hạt lớn hơn các loại dưa hấu ruột đỏ khác nhưng theo Ridwan et al. (2018) thì lại cho kết quả ngược lại. Joshi et al. (2019) thì lại cho rằng không có sự khác nhau về hàm lượng L-citrulline trong cả vỏ và thịt quả (Joshi et al., 2019). Những kết quả khác nhau trong sự phân bố L-citrulline của các loại dưa hấu khác nhau đã bị ảnh hưởng bởi giống loại, gen, điều kiện trồng trọt, thời tiết, nhiệt độ, lượng nước cung cấp của mỗi khu vực khác nhau (Volino et al., 2021). Davis et al. (2011) đã chứng minh rằng nồng độ L-citrulline bị ảnh hưởng bởi môi trường và thay đổi đáng kể trong các nền văn hóa khác nhau (Davis et al., 2011). Tóm lại, hàm lượng L-citrulline phân bố trong vỏ nhiều hơn ruột quả của các loại dưa hấu khác nhau. Vì vậy, vỏ dưa hấu Hắc Mỹ Nhân được cố định cho quy trình thẩm định phương pháp UV-Vis bởi vì loại dưa này phổ biến và thu mua dễ dàng trong suốt thời gian nghiên cứu.



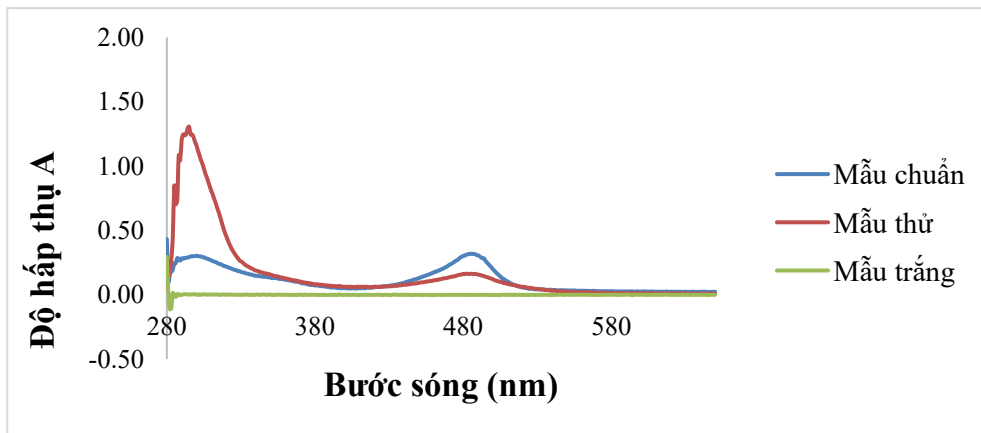
Hình 4: Hàm lượng L-citrulline phân bố trong các loại dưa hấu khác nhau

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu được trình bày trong Hình 5, phổ UV-Vis của mẫu nước ép vỏ dưa hấu có định hấp

thu tại bước sóng 490 nm tương tự mẫu chuẩn, độ hấp thụ của mẫu trắng không có độ hấp thụ tại bước sóng 490 nm.



Hình 5: Phổ UV-Vis lần lượt của mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu trắng

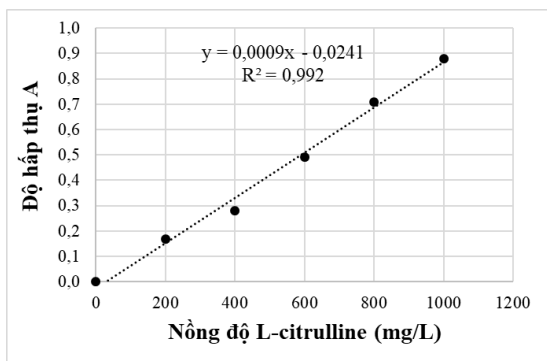
3.2.2. Độ tuyến tính

Độ tuyến tính là kết quả dựa vào đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa độ đáp ứng của độ hấp thụ A (y) và nồng độ (x). Độ tuyến tính được biểu thị bằng phương trình hồi quy  $y = ax + b$  với hệ số tương quan tuyến tính  $R^2$ . Nếu hệ số hồi quy tuyến tính  $0,99 \leq R^2 \leq 1$  thì mối tương quan giữa hai biến thể hiện tuyến tính rõ rệt. Kết quả độ tuyến được trình bày trong Bảng 1 và Hình 6.

Bảng 1. Kết quả phân tích hồi quy mối tương quan giữa nồng độ và độ hấp thụ của L-citrulline

Nồng độ (mg/L)	Độ hấp thụ (A)			Trung bình
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	
0	0,000	0,000	0,000	0,000
200	0,164	0,184	0,156	0,168
400	0,299	0,256	0,284	0,280
600	0,499	0,531	0,442	0,491
800	0,667	0,762	0,694	0,708
1000	0,808	0,922	0,910	0,880





**Hình 6: Đồ thị biểu diễn sự tổng quan mật độ quang vào nồng độ dung dịch L-citrulline**

Phương trình hồi quy tuyến tính:

$$y = 0,0009x - 0,0241$$

Hệ số tương quan:  $R^2 = 0,992$ .

**Bảng 2. Kết quả độ lặp lại định lượng L-citrulline với các hệ số pha loãng khác nhau**

Hệ số pha loãng	3	7	10	20	50	100
Lần lặp 1	5777,222	8800,556	10172,222	8462,963	5375,926	10640,741
Lần lặp 2	5628,333	8839,444	9494,444	7996,296	6135,185	9233,333
Lần lặp 3	5759,444	9036,481	9431,481	8425,926	5357,407	9566,667
Trung bình C (mg/L)	5721,667	8892,160	9699,383	8295,062	5622,840	9813,580
SD	81,316	126,489	410,699	259,400	443,801	735,475
RSD (%)	1,421	1,422	4,234	3,127	7,893	7,494

**Bảng 3. Kết quả độ tái lặp định lượng L-citrulline với các hệ số pha loãng là 10**

Lần lặp	1	2	3	4	5	6
Độ hấp thụ (A)	0,418	0,422	0,440	0,436	0,458	0,473
Nồng độ C <sub>Citrulline</sub> (mg/L)	4915,926	4956,667	5156,667	5112,222	5360,370	5523,333
Trung bình C (mg/L)	5170,864					
SD	234,376					
RSD (%)	4,533					

**Nhận xét:** Kết quả định lượng L-citrulline với độ lặp lại n = 3 trong Bảng 2 cho thấy độ lặp lại của các mẫu ở 6 hệ số pha loãng là 3; 7; 10; 20; 50 và 100 lần có giá trị RSD nằm trong khoảng từ 1,4 đến 7,8%, trong khi đó giá trị RSD của độ tái lặp (n = 6) ở Bảng 3 là 4,5%. Đối chiếu với quy định của AOAC 2016 thì kết quả độ lặp lại nằm trong giới hạn cho phép là 11% và độ tái lặp tối đa là 7,3% (AOAC, 2016).

3.2.4. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được xác định bằng cách đánh giá độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả phân tích L-citrulline trong mẫu dịch ép vỏ dưa

**Nhận xét:** Trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0 đến 1000 mg/L, tại bước sóng 490 nm cho thấy sự tương quan tuyến tính giữa độ hấp thụ và nồng độ chất khảo sát với hệ số tương quan gần 1 ( $R^2 > 0,99$ ), chứng tỏ có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa độ hấp thụ A và nồng độ chất khảo sát. Nồng độ L-citrulline càng lớn thì độ hấp thụ A càng tăng và ngược lại. Phương trình:  $y = 0,0009x - 0,0241$  là phương trình đường chuẩn xác định hàm lượng L-citrulline trong vỏ dưa hấu.

3.2.3. Độ lặp lại và tái lặp

Độ lặp lại và tái lặp của phương pháp được xác định bằng cách đánh giá độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của các kết quả phân tích L-citrulline trong mẫu dịch ép vỏ dưa hấu với các độ pha loãng khác nhau. Kết quả độ lặp lại được trình bày ở Bảng 2 và độ tái lặp được trình bày ở Bảng 3.

hấu và mẫu dịch ép vỏ dưa hấu có thêm L-citrulline chuẩn ở 3 mức độ là nồng độ thấp (100 mg/L), nồng độ trung bình (200 mg/L) và nồng độ cao (400 mg/L). Kết quả được trình bày ở Bảng 4 với các giá trị độ thu hồi tương ứng với các mẫu có thêm chuẩn L-citrulline 100 mg/L, 200 mg/L và 400 mg/L.

**Nhận xét:** Kết quả định lượng L-citrulline trong vỏ dưa hấu và các mẫu thêm chuẩn với độ lặp lại n = 6 trong Bảng 4 cho thấy độ thu hồi 87 - 105%. Đối chiếu với quy định của AOAC 2016 thì kết quả độ thu hồi nằm trong giới hạn cho phép là 80 - 110% (AOAC, 2016).

**Bảng 4. Kết quả độ thu hồi xác định trên mẫu thử thêm chuẩn**

Nồng độ chuẩn thêm vào (mg/L)	Độ hấp thụ (A)	Nồng độ C <sub>Citrulline</sub> (mg/L)	Trung bình C <sub>Citrulline</sub> (mg/L)	C <sub>tim lại</sub> (mg/L)	Độ thu hồi (%)
100	1,409	1114,633	1169,207	99,167	99
	1,491	1178,411			
	1,444	1141,856			
	1,443	1141,078			
	1,495	1181,522			
	1,593	1257,744			
200	1,580	1247,633	1243,485	173,444	87
	1,548	1222,744			
	1,565	1235,967			
	1,571	1240,633			
	1,507	1190,856			
	1,677	1323,078			
400	1,748	1378,300	1488,744	418,704	105
	1,837	1447,522			
	1,947	1533,078			
	1,960	1543,189			
	1,981	1559,522			
	1,867	1470,856			

**3.2.5. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ tin cậy**

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng sẽ được tính toán dựa trên kết quả độ lệch chuẩn có độ lặp lại n = 10 lần được trình bày ở bảng 5. Ngoài ra, giá trị độ tin cậy R sẽ được xác định dựa trên giới hạn phát hiện LOD đối với mẫu thử là mẫu nước ép vỏ dưa hấu đã được pha loãng 100 lần.

**Bảng 5. Kết quả đo nồng độ L-citrulline của mẫu thử dịch vỏ dưa hấu (n = 10)**

Độ hấp thụ A	C <sub>Citrulline</sub> (mg/L)	Trung bình $\bar{C}$ Citrulline (mg/L)	SD
0,058	91,222	89,22	7,3
0,059	92,333		
0,046	77,889		
0,059	92,333		
0,059	92,333		
0,062	95,667		
0,063	96,778		
0,061	94,556		
0,048	80,111		
0,047	79,000		

Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó giá trị xác định được lớn hơn độ không đảm bảo đo của phương pháp. Đây là nồng độ thấp nhất của chất phân tích trong mẫu có thể phát hiện được nhưng chưa thể định lượng được (đối với phương pháp định lượng). Vì vậy nếu  $4 < R < 10$  thì nồng độ dung dịch

thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy (Son và ctv, 2010).

Từ bảng 5, giá trị LOD, LOQ và R được tính như sau:

$$LOD = 7,3 \times 3 = 21,8 \text{ mg/L}$$

$$LOQ = 7,3 \times 10 = 73,0 \text{ mg/L}$$

$$R = \frac{89,2}{21,8} = 4,1$$

Đối chiếu với kết quả thu được, có thể thấy giá trị R của mẫu thử nằm trong khoảng phù hợp.

**4. KẾT LUẬN**

Dưa hấu có sự phân bố L-citrulline khác nhau ở các bộ phận trong quả (L-citrulline trong thịt quả dao động từ 0,580 đến 1,12 mg/g, còn trong vỏ dưa hấu là 0,76 đến 1,28 mg/g tính theo trọng lượng khô), trong đó vỏ dưa hấu là nguồn phụ phẩm thường được thải ra môi trường mà ít được sử dụng lại tại Việt Nam, tuy nhiên lại là nguồn cung cấp L-citrulline nhiều nhất trong quả dưa hấu. Ngoài ra, nghiên cứu đã thẩm định phương pháp định lượng L-citrulline trong vỏ dưa hấu bằng quang phổ UV-Vis, dựa vào phản ứng tạo màu với thuốc thử diacetyl monoxime. Phương pháp định lượng phù hợp với hệ thống quang phổ UV-Vis, đảm bảo độ tuyến tính, độ đúng tương đối với tỉ lệ % chất chuẩn tìm lại nằm trong khoảng cho phép là 80 - 110%, các giá trị RSD của độ lặp lại và độ tái lập cũng nằm



trong giới hạn cho phép, do đó phương pháp có độ chính xác cao. Các giá trị LOD và LOQ có độ tin cậy thuộc khoảng  $4 < R < 10$ . Vì vậy phương pháp UV-Vis là phương pháp đủ đáp ứng cho việc đánh

giá, kiểm tra hàm lượng L-citrulline trong các loại quả trong tự nhiên một cách nhanh chóng và đơn giản.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abu-Hiamed, H. (2017). Chemical Composition, Flavonoids and  $\beta$ -sitosterol Contents of Pulp and Rind of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Fruit. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16, 502-507. doi:10.3923/pjn.2017.502.507
- AOAC. (2016). Appendix F. Guidelines for Standard Method Performance Re-quirements.
- Davis, A. R., Webber, C. L., Fish, W. W., Wehner, T. C., King, S., & Perkins-Veazie, P. (2011). L-Citrulline Levels in Watermelon Cultigens Tested in Two Environments. *HortScience horts*, 46(12), 1572-1575. doi:10.21273/HORTSCI.46.12.1572
- Đông, T. T. H., & Thúy, T. T. N. (2020). Ảnh hưởng của liều lượng phân bón đến ba giống dưa hấu thử nghiệm tại tỉnh Quảng Bình. *Tạp Chí Khoa học Và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 4(3), 1734-1745.
- Duran Barón, R., Valle-Vargas, M. F., Quintero-Gamero, G., Quintanilla-Carvajal, M. X., & Alean, J. (2021). Encapsulation of citrulline extract from watermelon (*Citrullus lanatus*) by-product using spray drying. *Powder Technology*, 385, 455-465. doi:https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.03.014
- Fearon, W. R. (1939). The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. *Biochem J*, 33(6), 902-907. doi:10.1042/bj0330902
- Gu, I., Balogun, O., Brownmiller, C., Kang, H. W., & Lee, S.-O. (2023). Bioavailability of Citrulline in Watermelon Flesh, Rind, and Skin Using a Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Model. *Applied Sciences*, 13(8), 4882.
- Gupta, P. K., Reddy, K., Sinha, A., Paleti, J., Lokur, A., Praveen, C., & Gupta, K. (2019). Production and optimization of L-citrulline by using watermelon peels. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 3231-3237.
- Holmes, E. J. (1968). A HISTOCHEMICAL TEST FOR CITRULLINE ADAPTATION OF THE CARBAMIDO DIACETYL REACTION TO HISTOLOGIC SECTIONS WITH POSITIVE RESULTS IN PILOMATRIXOMAS (CALCIFYING EPITHELIOMAS). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16(2), 136-146. doi:10.1177/16.2.136
- Joshi, V., Joshi, M., Silwal, D., Noonan, K., Rodriguez, S., & Penalosa, A. (2019). Systematized biosynthesis and catabolism regulate citrulline accumulation in watermelon. *Phytochemistry*, 162, 129-140. doi:10.1016/j.phytochem.2019.03.003
- Neglo, D., Tettey, C., Essuman, E., Kortei, N., Boakye, A., Hunkpe, G., Armah, F., Kwashie, P., & Waikhom, S. D. (2021). Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *Scientific African*, 11, 582. doi:10.1016/j.sciaf.2020.e00582
- Paris, H. S. (2015). Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Ann Bot*, 116(2), 133-148. doi:10.1093/aob/mcv077
- Paris, H. S., Tadmor, Y., & Schaffer, A. A. (2017). Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber. In B. Thomas, B. G. Murray, & D. J. Murphy (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edition) (pp. 209-217). Oxford: Academic Press.
- Ridwan, R., Abdul Razak, H. R., Adenan, M., & Saad, W. (2018a). Separation of L-arginine and L-citrulline in Red And Yellow Crimson Watermelon (*Citrullus Lanatus*) Juices Extract using HPLC Gradient Mode. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 22, 785-793. doi:10.17576/mjas-2018-2205-06
- Ridwan, R., Abdul Razak, H. R., Adenan, M. I., & Md Saad, W. M. (2018b). Development of Isocratic RP-HPLC Method for Separation and Quantification of L-Citrulline and L-Arginine in Watermelons. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 4798530. doi:10.1155/2018/4798530
- Rimando, A. M., & Perkins-Veazie, P. M. (2005). Determination of citrulline in watermelon rind. *J Chromatogr A*, 1078(1-2), 196-200. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.009
- Son, T. C., Đà, P. X., Hào, L. T. H., & Trung, N. T. (2010). *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
- Volino, M., Pinheiro, V., Vieira de Oliveira, G., Conte Junior, C., & Alvares, T. (2021). Storage stability of L-citrulline in cucumber (*Cucumis sativus*) and watermelon (*Citrullus lanatus*) juices. *Brazilian Journal of Development*, 7, 26849-26859.
- Wenge, L., Zhao, S., Cheng, Z., Wan, X., Yan, Z., & King, S. R. (2010). Lycopene and citrulline contents in watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit with different ploidy and changes during fruit development. *Acta Horticulturae*, 871, 543-550. doi:10.17660/ActaHortic.2010.871.75.