

Xác định đồng thời crocin và crocetin trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector chuỗi diod quang (HPLC-PDA)

Đỗ Thị Hồng Thúy^{1,2*}, Phạm Văn Khuê¹, Nguyễn Thị Ánh Hương¹,
Vũ Thị Trang², Lê Thị Thúy², Lê Thị Hồng Hảo^{1,2}

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên – Đại học quốc gia Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 25/05/2023; Ngày chấp nhận đăng: 13/09/2023)

Tóm tắt

Crocin và crocetin là hai hợp chất có hoạt tính sinh học được tìm thấy trong nhụy hoa nghệ tây và quả dành dành. Trong công nghiệp thực phẩm, do có màu vàng hoặc vàng cam tự nhiên, chúng được sử dụng để tạo màu trong thực phẩm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hóa phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp detector chuỗi diod quang (HPLC-PDA) để xác định đồng thời crocin và crocetin trong thực phẩm. Mẫu phân tích được chiết bằng hỗn hợp acetonitril (ACN) : H₂O (1:1, v/v) tại nhiệt độ 40 °C trong 30 phút. Dung dịch mẫu được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA với các điều kiện: Cột Sunfire C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 μm), pha động gồm acid formic 0,1% và ACN sử dụng chương trình gradient. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn của crocin và crocetin có hệ số tương quan R² > 0,9997 và độ lặp lại, độ thu hồi đạt yêu cầu của AOAC. Giới hạn phát hiện (LOD) của crocin và crocetin lần lượt là 0,5 mg/kg và 0,25 mg/kg. Phương pháp đã được áp dụng để xác định đồng thời crocin và crocetin trong 15 mẫu thực phẩm cho kết quả: 13/15 mẫu phát hiện hàm lượng crocin, 11/15 mẫu phát hiện hàm lượng crocetin và 2/15 mẫu không phát hiện được cả crocin và crocetin. Trong đó, nhóm bột dành dành có chứa hàm lượng crocin và crocetin cao nhất (23,5 g/100g – 24,4 g/100g), mẫu chi tử khô - quả dành dành đã phơi hoặc sấy khô chứa hàm lượng crocin và crocetin cao thứ hai trong nhóm thực phẩm.

Từ khóa: crocin, crocetin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, HPLC, PDA, thực phẩm

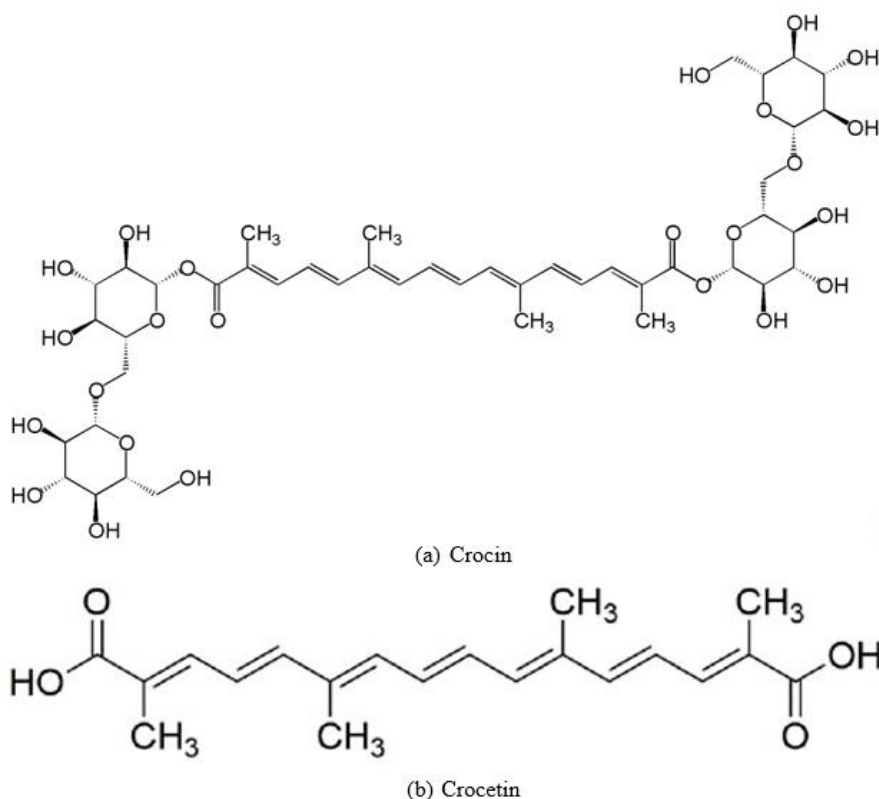
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Màu sắc của thực phẩm đóng vai trò quan trọng trong việc tạo nên giá trị cảm quan của thực phẩm, góp phần làm cho món ăn trở nên đẹp mắt, ngon miệng và phong phú hơn. Có thể dùng phẩm màu thực phẩm hoặc phẩm màu có nguồn gốc tự nhiên để tạo màu cho thực phẩm. Phẩm màu có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được quan tâm hơn do tính chất tự nhiên, an toàn cho người sử dụng. Trong số các chất tạo màu có nguồn gốc tự nhiên, crocin và

*Điện thoại: 0965332978 Email: hongthuy19199@gmail.com

crocetin là thành phần tạo màu vàng hoặc màu vàng cam trong thực phẩm, thường có trong quả dành dành và nhụy hoa nghệ tây.

Crocetin và crocin (digentiobiosyl ester của crocetin) là thành phần có hoạt tính sinh học của nghệ tây được sử dụng làm gia vị cao cấp, có công thức cấu tạo ở Hình 1. Ngoài ra, chúng cũng được tìm thấy trong quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis), là vị thuốc thảo dược cổ truyền – chi tử. Khi sử dụng qua đường uống, crocetin nhanh chóng được hấp thu vào tuần hoàn máu và phân bố rộng rãi vào các mô ngoài mạch máu của cơ thể. Crocetin và crocin đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc phòng ngừa và/hoặc điều trị một số bệnh như xơ vữa động mạch, thiếu máu cơ tim, sốt xuất huyết, ung thư và chấn thương não [1, 2]. Các hợp chất này phát huy tác dụng sinh học và dược lý chủ yếu thông qua khả năng chống oxy hóa mạnh của chúng. Bên cạnh các hoạt tính sinh học quý, do crocetin và crocin có màu vàng nên chúng cũng được sử dụng với vai trò là chất tạo màu có nguồn gốc tự nhiên trong chế biến thực phẩm.



Hình 1. Công thức cấu tạo của crocin (a) và crocetin (b)

Người tiêu dùng có xu hướng lựa chọn các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên để đảm bảo tính an toàn của sản phẩm. Dựa trên xu hướng này, các nhà sản xuất đã dần thay thế việc sử dụng phẩm màu tổng hợp bằng các loại phẩm màu chiết xuất từ tự nhiên. Mặc dù phẩm màu có nguồn gốc tự nhiên an toàn và có nhiều lợi ích với sức khỏe con người nhưng giá thành cao và độ bền màu kém hơn so với phẩm màu tổng hợp. Do đó, để giúp các nhà sản xuất kiểm soát chất lượng sản phẩm, để đảm bảo quyền lợi người tiêu dùng, việc phát triển

các phương pháp phân tích các chất màu có nguồn gốc tự nhiên đang ngày được quan tâm và phát triển.

Hiện nay, trên thế giới, có một số nghiên cứu đã được công bố về phương pháp xác định crocin và crocetin trên một số nền mẫu như: nhụy hoa nghệ tây (saffron), quả dành dành (chi tử), mì tôm, nước giải khát... sử dụng các kỹ thuật như: sắc ký bản mỏng TLC [3], điện di mao quản CE [4], quang phổ (UV), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [5-10]... Trong đó, phương pháp sắc ký lỏng (HPLC) là kỹ thuật được nhiều nghiên cứu sử dụng do tính phổ biến, độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao, đồng thời quá trình xử lý mẫu trong các nền mẫu thực phẩm tương đối đơn giản. Do đó, nghiên cứu này lựa chọn phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA để xác định đồng thời crocin và crocetin trong thực phẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: mẫu gia vị, bánh kẹo, mứt, thạch, mì tôm, chi tử khô, quả dành dành, bột dành dành lấy ngẫu nhiên trên địa bàn thành phố Hà Nội.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các chất chuẩn: Chất chuẩn Crocin và crocetin từ TRC; độ tinh khiết $\geq 95\%$, các hóa chất: acid formic, methanol, ethanol, acetonitril từ Merck.

2.3. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Alliance, Waters) trang bị detector PDA; cột sắc ký Sunfire C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và các thiết bị phụ trợ khác của phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp xử lý mẫu

Cân chính xác 0,1 – 5,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống falcon 50 mL, thêm 30 mL dung môi CH₃CN:H₂O (1:1, v/v), lắc đều. Rung siêu âm ở nhiệt độ 40 °C trong 30 phút. Gạn dịch chiết vào bình định mức 50 mL. Chiết lặp lại bằng 20 mL CH₃CN:H₂O (1:1, v/v). Gộp dịch lọc vào bình định mức và định mức đến vạch 50 mL. Dung dịch được lọc qua giấy lọc và màng lọc 0,45 μ m trước khi tiêm vào hệ thống HPLC.

2.4.2. Điều kiện phân tích HPLC-PDA

Điều kiện phân tích đồng thời crocin và crocetin bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), detector: PDA, tốc độ dòng: 1,0 mL/phút, thể tích tiêm: 10 μ L.

Thành phần pha động: Kênh A: acid formic 0,1% và kênh B: ACN với chế độ gradient: Từ 0 đến 7 phút giảm từ 80% A xuống 70% A, giảm tiếp xuống 30% A trong 3 phút, giữ ổn định trong 5 phút, tăng lên 80% A và giữ ổn định trong 5 phút. Tổng thời gian phân tích là 20 phút.

2.4.3. Phương pháp thẩm định

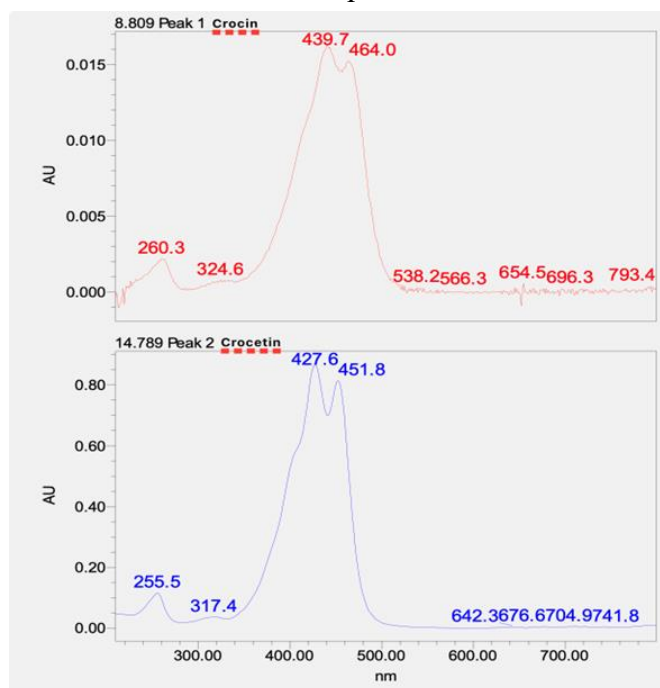
Đánh giá thẩm định phương pháp thông qua các thông số sau: Độ đặc hiệu sử dụng mẫu trắng là hỗn hợp dung môi chiết mẫu, đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOQ) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định theo tỷ lệ S/N, độ chụm của phương pháp (độ lặp lại), độ đúng của phương pháp (độ thu hồi) được tiến hành trên các nền mẫu: mỳ tôm, quả dành dành, mít, thạch, nước giải khát.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện sắc ký lỏng

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Để lựa chọn bước sóng thích hợp ghi sắc ký đồ khi phân tích đồng thời crocin và crocetin trên detector PDA, tiến hành quét phổ UV-Vis trong khoảng 190 – 800 nm, chọn cực đại hấp thụ cho mỗi chất và thu được kết quả như Hình 2.



Hình 2. Phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của crocin (hình trên) và crocetin (hình dưới)

Để giảm ảnh hưởng của dung môi và tạp chất nhưng vẫn đảm bảo được độ nhạy của phương pháp, bước sóng 440 nm được lựa chọn để xác định đồng thời crocin và crocetin.

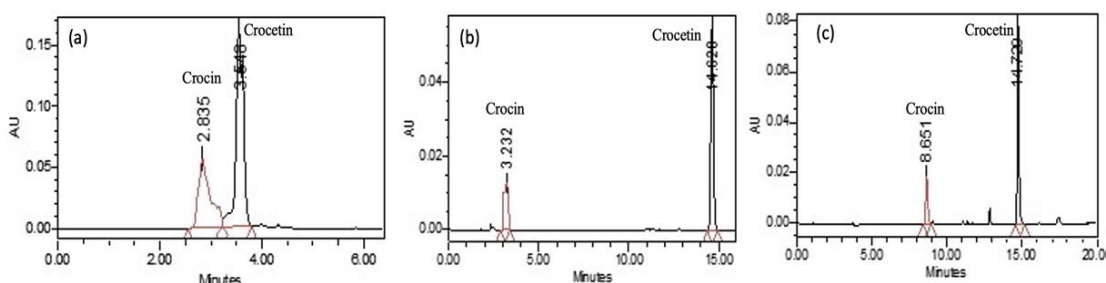
3.1.2. Khảo sát pha động

Pha động là yếu tố quyết định đến hiệu quả tách sắc ký. Nhìn chung, pha động có thể ảnh hưởng đến: độ chọn lọc của hệ pha, thời gian lưu giữ của chất phân tích, độ rộng của pic sắc ký... Tham khảo một số tài liệu [2, 9, 10], các dung môi được lựa chọn khảo sát gồm: acid formic 0,1% : ACN (1:9,v/v) chế độ đẳng dòng; acid formic 0,1% và ACN với chương trình gradient 1 và 2 tương ứng với Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient

<i>Gradient 1</i>				<i>Gradient 2</i>			
Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/phút)	Acid formic 0,1% (%)	ACN (%)	Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (mL/phút)	Acid formic 0,1% (%)	ACN (%)
0,00	1,00	70	30	0,00	1,00	80	20
5,00	1,00	70	30	5,00	1,00	70	30
10,00	1,00	30	70	10,00	1,00	30	70
15,00	1,00	30	70	15,00	1,00	30	70
15,10	1,00	70	30	15,10	1,00	80	20
20,00	1,00	70	30	20,00	1,00	80	20

Kết quả cho thấy, khi sử dụng pha động là acid formic 0,1% và ACN ở chế độ độ đẳng dòng thì pic của các chất phân tích không tách được khỏi nhau. Khi sử dụng pha động là acid formic 0,1% và ACN theo chương trình gradient 1 thì pic các chất phân tích tách được khỏi nhau, tuy nhiên pic crocin không cân đối và tín hiệu crocin cũng ra sớm tại phút 3,2 làm kết quả khi phân tích không đảm bảo. Khi sử dụng acid formic 0,1% và ACN theo chương trình gradient 2 thì cho kết quả các chất phân tích tách ra khỏi nhau, crocin ra trước ở 8,651 phút và crocetin ra sau ở 14,729 phút, hai pic nhọn hơn, tín hiệu đường nền thấp. Vì vậy, trong nghiên cứu này pha động acid formic 0,1% và ACN theo chương trình gradient 2 được lựa chọn để phân tích đồng thời crocin và crocetin. Hình 3 là sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp crocin và crocetin sử dụng pha động acid formic 0,1% và ACN theo chương trình gradient 2.

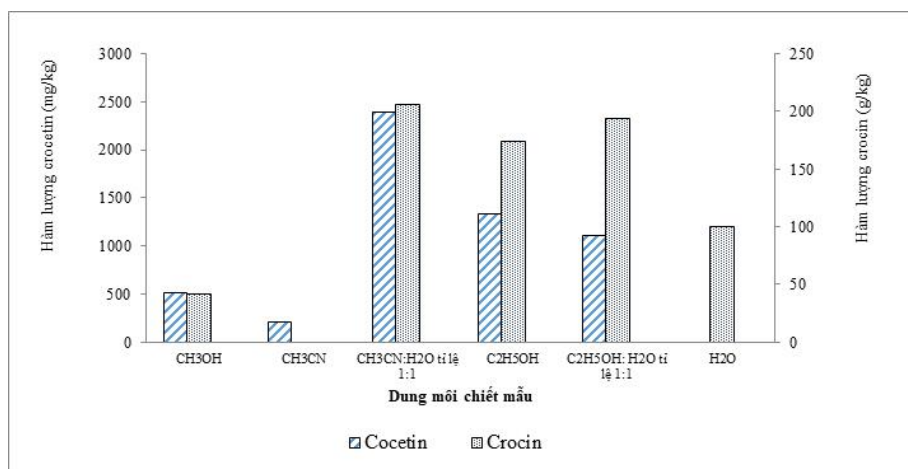


Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp hai chất: (a) ở chế độ đẳng dòng, (b) sử dụng chương trình gradient 1, (c) sử dụng chương trình gradient 2

3.2. Tối ưu hóa điều kiện xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Do crocin có khả năng tan tốt trong nước, tan ít trong dung môi hữu cơ. Crocetin tan ít trong nước, tan tốt trong dung môi hữu cơ và tham khảo một số tài liệu [2, 9, 10], các loại dung môi thủy phân khác nhau (CH₃CN, CH₃OH, C₂H₅OH, H₂O, CH₃CN:H₂O (1:1,v/v), C₂H₅OH:H₂O (1:1, v/v) đã được lựa chọn để khảo sát trên nền mẫu bột dành dành. Kết quả thể hiện ở trong Hình 4.

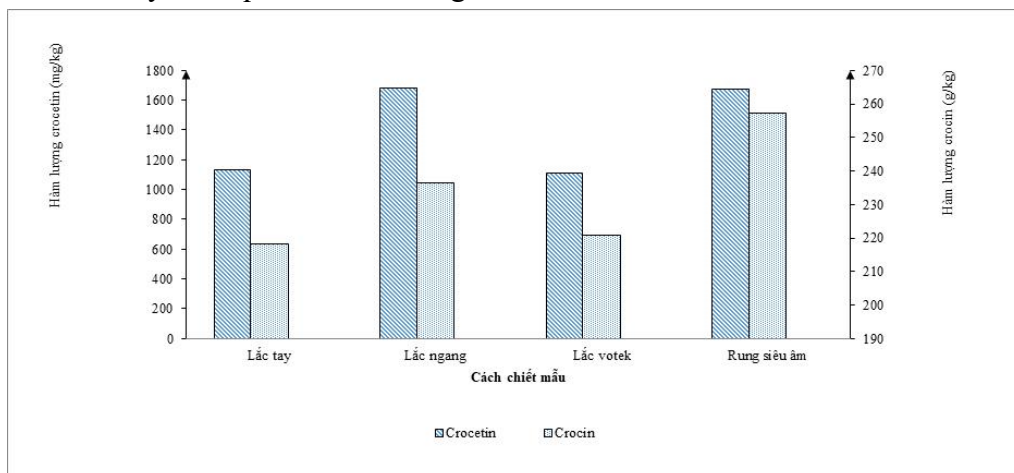


Hình 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết mẫu

Kết quả chỉ ra trong Hình 3 cho thấy: Hàm lượng của crocin và crocetin khi sử dụng CH₃CN:H₂O (1:1, v/v) cho hàm lượng chất phân tích cao nhất. Do đó, dung môi CH₃CN:H₂O (1:1, v/v) được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát kỹ thuật chiết mẫu

Cách chiết mẫu ảnh hưởng khá lớn đến khả năng phân tán và chiết các chất ra khỏi nền mẫu. Dựa vào điều kiện phòng thí nghiệm, bốn cách chiết khác nhau: sử dụng lắc tay, sử dụng máy lắc ngang, lắc vortex và sử dụng bể rung siêu âm đã được lựa chọn khảo sát trong nghiên cứu này. Kết quả thể hiện trong Hình 5.



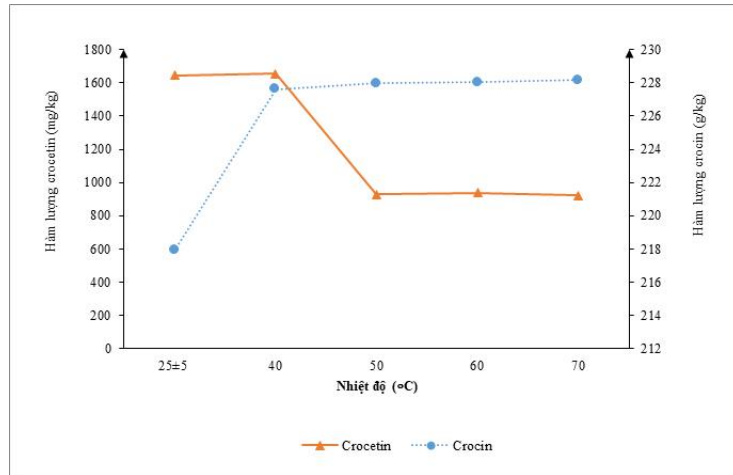
Hình 5. Kết quả khảo sát kỹ thuật chiết mẫu

Dựa vào kết quả thu được, đối với crocetin khi sử dụng lắc ngang và rung siêu âm cho kết quả khác nhau không có nghĩa. Tuy nhiên, đối với crocin khi sử dụng rung siêu âm thì cho hàm lượng cao hơn khi sử dụng lắc ngang. Do đó, kỹ thuật rung siêu âm được lựa chọn trong nghiên cứu này.

3.2.3. Khảo sát nhiệt độ chiết mẫu

Do nhiệt độ là một yếu tố ảnh hưởng đến độ tan và khả năng tách của chất phân tích ra khỏi nền mẫu. Từ đó, trên cùng một nền mẫu bột dành dành, tiến hành chiết mẫu ở các

mức nhiệt độ khác nhau: nhiệt độ phòng (25 ± 5 °C), 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C. Kết quả khảo sát thể hiện trong Hình 6.

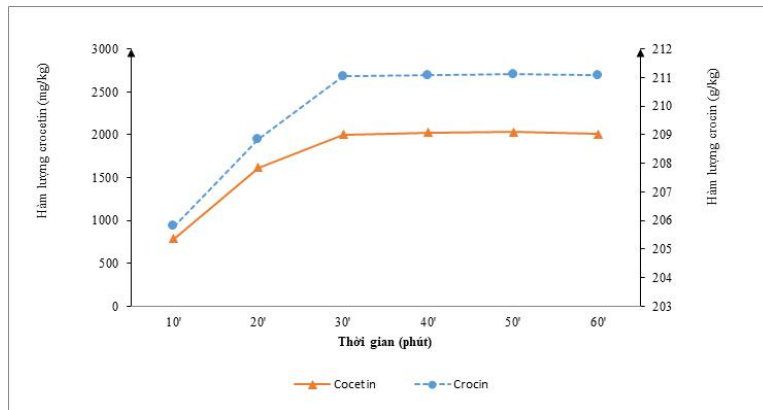


Hình 6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết mẫu

Dựa vào kết quả thu được trong Hình 6, hàm lượng của crocetin đạt cao nhất trong khoảng nhiệt độ phòng đến 40 °C và giảm khi tăng nhiệt độ từ 50 °C đến 70 °C. Hàm lượng crocin trong mẫu tăng lên từ nhiệt độ phòng đến 40 °C và không có sự khác biệt có nghĩa ở các nhiệt độ 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C. Do đó, nhiệt độ 40 °C được lựa chọn làm nhiệt độ chiết mẫu cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.4 Khảo sát thời gian chiết mẫu

Trên cùng một nền mẫu bột dành dành, tiến hành chiết mẫu ở các mức thời gian rung siêu âm khác nhau: 10 phút, 20 phút, 30 phút, 40 phút, 50 phút, 60 phút đối với nền mẫu bột dành dành. Kết quả khảo sát thể hiện trong Hình 7.

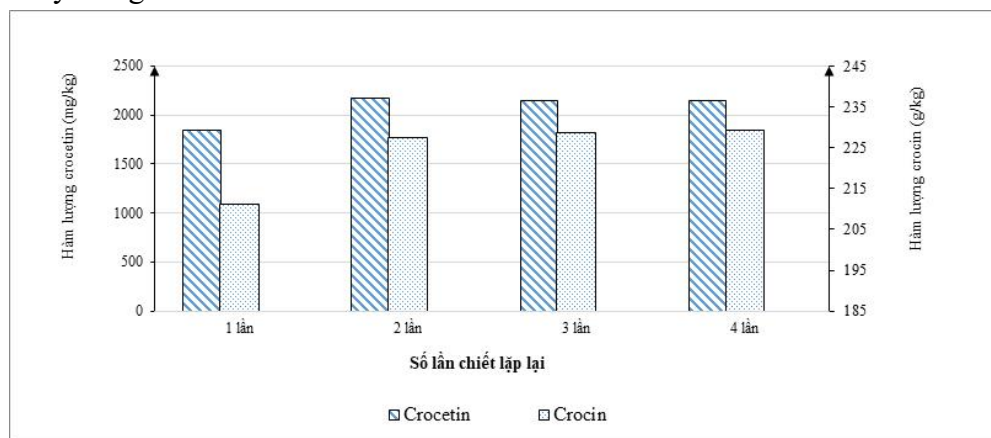


Hình 7. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết mẫu

Kết quả chỉ ra trong Hình 7 cho thấy hàm lượng crocin và crocetin thu được trong mẫu ở thời gian chiết 30 phút trở lên cho kết quả hàm lượng hai chất chiết không có sự thay đổi. Để tiết kiệm thời gian và đảm bảo hiệu quả, thời gian chiết mẫu 30 phút được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.5. Khảo sát số lần chiết lặp lại

Chiết lặp lại là một cách để đảm bảo chất phân tích được chiết tối đa ra khỏi nền mẫu. Nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát số lần chiết lặp lại: 1 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần. Kết quả được trình bày trong Hình 8.

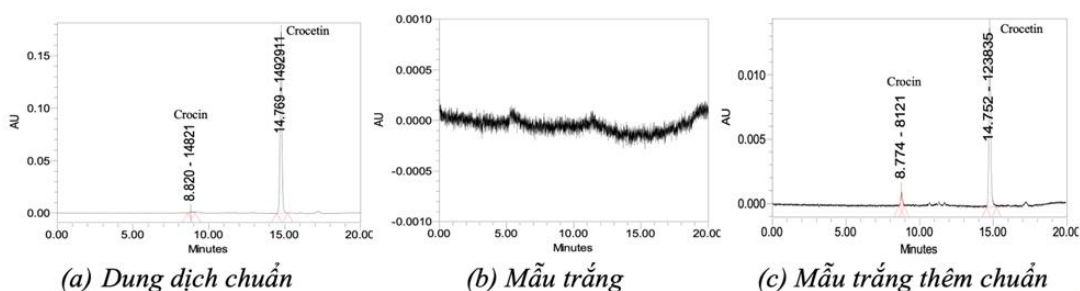


Hình 8. Kết quả khảo sát số lần chiết lặp lại

Kết quả Hình 8 cho thấy, đối với cả crocin và crocetin, khi chiết lặp lại 2 lần trở lên thì cho kết quả khác nhau không có nghĩa. Như vậy, để tiết kiệm thời gian cũng như hóa chất mà kết quả chiết mẫu đảm bảo thì nghiên cứu lựa chọn chiết lặp lại 2 lần.

3.3. Thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn. Kết quả chỉ ra mẫu trắng không cho tín hiệu chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn cho tín hiệu chất phân tích tại cùng thời gian lưu với sai lệch thời gian lưu không quá 1%. Do đó, phương pháp có độ đặc hiệu tốt. Kết quả được thể hiện trên Hình 9.



Hình 9. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu

Đường chuẩn được xây dựng với nồng độ thay đổi từ 1,50 mg/L đến 50 mg/L đối với crocin, thay đổi từ 0,75 mg/L đến 15 mg/L đối với crocetin bằng cách khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu diện tích pic vào nồng độ. Kết quả phương trình đường chuẩn, hệ số tương quan, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của các chất phân tích được trình bày trong Bảng 2. Độ chụm (RSD%) và độ đúng (R%) của các chất phân tích trên một số nền mẫu được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 2. Kết quả phương trình đường chuẩn, LOD và LOQ của chất phân tích

Tên chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Crocin	$y = 4903,7x - 6608,7$	0,9997	0,5	1,65
Crocetin	$y = 102519x - 62164$	0,9999	0,25	0,85

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ chụm và độ đúng

Nền mẫu	Thông số	Kết quả%		Thông số	Kết quả%	
		Crocin	Crocetin		Crocin	Crocetin
Mì tôm		3,3	1,9		92,2-102,2	90,6-106,1
Quả dành dành		3,6	3,6		91,1-104,8	95,0-102,3
Mứt	RSD%	4,5	5,2	R%	90,9-103,3	90,0-103,9
Thạch		4,8	3,2		93,1-101,7	91,9-104,3
Nước giải khát		2,5	2,2		83,2-97,7	87,6-108,7

Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn của crocin và crocetin lần lượt có hệ số tương quan $R^2 = 0,9997$ và $R^2 = 0,9999$. Độ lặp lại (RSD: 1,9-5,2%) và độ thu hồi (R: 83-108%) đạt yêu cầu của AOAC. Giới hạn phát hiện (LOD) của crocin và crocetin lần lượt là 0,5 mg/kg và 1,65 mg/kg. Giới hạn định lượng (LOQ) của crocin và crocetin lần lượt là 0,25 mg/kg và 0,85 mg/kg. LOD của các chất phân tích trong nghiên cứu này thấp hơn hoặc tương đương so với LOD của chất phân tích trong một số nghiên cứu trên thế giới [6, 7]. Như vậy, phương pháp có độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác đạt yêu cầu phân tích đồng thời hàm lượng crocin và crocetin trong nền mẫu thực phẩm.

3.4. Phân tích đồng thời hàm lượng crocin và crocetin trong một số mẫu thực tế

Áp dụng quy trình phân tích tối ưu ở trên để phân tích hàm lượng crocin và crocetin trong các mẫu thực phẩm trên thị trường Hà Nội thu được kết quả trong Bảng 4.

Kết quả phân tích 15 mẫu khác nhau nêu trong Bảng 4 cho thấy có 13/15 mẫu phát hiện hàm lượng crocin, 11/15 mẫu phát hiện hàm lượng crocetin và có 2/15 mẫu không phát hiện được cả crocin và crocetin. Trong đó, nhóm bột dành dành có chứa hàm lượng crocin và crocetin cao nhất (23,5 g/100g – 24,4 g/100g), mẫu chỉ tử khô – nguyên liệu đầu để tạo ra bột dành dành, có chứa hàm lượng crocin và crocetin lớn thứ hai. Các nhóm thực phẩm bổ sung như thực phẩm chức năng, nước sốt, gia vị, mì tôm, nước giải khát, mứt thì có hàm lượng tổng crocin và crocetin nằm trong khoảng từ 1,98 mg/kg đến 108 mg/kg. Kết quả cho thấy các mẫu có nguồn gốc từ quả dành dành có chứa hàm lượng crocin và crocetin phù hợp để thay thế các phẩm màu tổng hợp màu vàng, màu cam trong chế biến và sản xuất thực phẩm.

Bảng 4. Kết quả phân tích trên một số nền mẫu thực phẩm

<i>TT</i>	<i>Tên mẫu</i>	<i>Hàm lượng Crocin</i>	<i>Hàm lượng Crocetin</i>	<i>Hàm lượng tổng crocin và crocetin</i>
	<i>Mẫu nguyên liệu</i>	<i>g/100g</i>	<i>g/100g</i>	<i>g/100g</i>
1	Bột dành dành 1	23,1	0,42	23,5
2	Bột dành dành 2	23,8	0,72	24,4
3	Chi từ khô	3,13	0,30	3,43
	<i>Mẫu thành phẩm</i>	<i>mg/kg</i>	<i>mg/kg</i>	<i>mg/kg</i>
4	Thực phẩm chức năng 1	61,1	30,9	92,0
5	Thực phẩm chức năng 2	65,4	16,4	81,8
6	Nước sốt 1	57,2	16,3	73,5
7	Nước sốt 2	60,9	KPH	60,9
8	Gia vị 1	65,6	20,8	86,4
9	Gia vị 2	75,5	KPH	75,5
10	Mì tôm 1	61,9	16,8	78,7
11	Mì tôm 2	1,24	0,74	1,98
12	Nước giải khát 1	4,68	1,76	6,44
13	Nước giải khát 2	KPH	KPH	KPH
14	Mứt 1	82,2	25,6	108
15	Mứt 2	KPH	KPH	KPH

So với các nghiên cứu đã công bố [4, 6, 7, 10], đối tượng áp dụng của phương pháp trong nghiên cứu này phong phú và đa dạng hơn, từ các mẫu nguyên liệu có hàm lượng cao đến các mẫu thực phẩm có hàm lượng thấp. Đặc biệt, phương pháp vẫn có thể thực hiện được với các mẫu thực phẩm có hàm lượng mỗi chất phân tích thấp hơn 1% mà không cần sử dụng đến kỹ thuật cao như LC-MS/MS [6, 7].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xác định đồng thời hàm lượng crocin và crocetin trong thực phẩm bằng phương pháp sắc sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector diode quang (HPLC-PDA). Quy trình phân tích được tối ưu cho một số nền mẫu thực phẩm. Phương pháp cũng đã được thẩm định về độ đặc hiệu, đường chuẩn, độ chụm, độ đúng và giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng. Các thông số thẩm định đều đạt yêu cầu của AOAC. Quy trình đã được áp dụng để phân tích 15 mẫu thực phẩm khác nhau. Phương pháp có thể được mở rộng để xác định đồng thời hàm lượng crocin và crocetin trong nhiều loại thực phẩm khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, với mã số NIFC.ĐTCS.22.10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. L. Xi, & Z. Qian, *Pharmacological properties of crocetin and crocin (digentiobiosyl ester of crocetin) from saffron*. Natural Product Communications, vol. 1, no. 1, 1934578X0600100112, 2006.
- [2]. E. Christodoulou, M. E. Grafakou, E. Skaltsa, N. Kadoglou, N. Kostomitsopoulos, & G. Valsami, "Preparation, Chemical characterization and determination of crocetin's pharmacokinetics after oral and intravenous administration of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract to C57/BL6J mice," *Journal of pharmacy and pharmacology*, vol. 71, no. 5, pp. 753-764, 2019.
- [3]. N. Ozeki, H. Oka, Y. Ito, E. Ueno, T. Goto, T. Hayashi & H. Matsumoto, "A reversed-phase thin-layer chromatography/scanning densitometric method for the analysis of gardenia yellow in food using crocetin as an indicator," *Journal of liquid chromatography & related technologies*, vol. 24, no. 18, pp. 2849-2860, 2001.
- [4]. T. Watanabe, "Separation and determination of yellow Gardenia pigments for food and iridoid constituents in Gardenia fruits by micellar electrokinetic chromatography," *Food Science and Technology International, Tokyo*, vol. 4, no. 1, 54-58, 1998.
- [5]. A. Girme, S. Pawar, C. Ghule, S. Shengule, G. Saste, A. K. Balasubramaniam & L. Hingorani, "Bioanalytical method development and validation study of neuroprotective extract of Kashmiri saffron using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS): In Vivo pharmacokinetics of apocarotenoids and carotenoids," *Molecules*, vol. 26, no. 6, 1815, 2021.
- [6]. M. Suchareau, A. Bordes, & L. Lemée, "Improved quantification method of crocins in saffron extract using HPLC-DAD after qualification by HPLC-DAD-MS," *Food Chemistry*, vol. 362, 130199, 2021.
- [7]. W. Yang, J. Wang, X. Li & Z. Du, "A new method research for determination of natural pigment crocin yellow in foods by solid-phase extraction ultrahigh pressure liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218(11), pp. 1423-1428, 2011.
- [8]. W. E. Zhou, Y. Zhang, Y. Li, Y. Ling, H. N. Li, S. H. Li, & F. Zhang, "Determination of gardenia yellow colorants in soft drink, pastry, instant noodles with ultrasound-assisted extraction by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrum," *Journal of Chromatography A*, vol.1446, pp. 59-69, 2016.
- [9]. N. Li, G. Lin, Y. W. Kwan, & Z. D. Min, "Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 849, no. 2, 3pp. 49-355. 1999.

- [10]. F. Yin, X. Wu, L. Li, Y. Chen, T. Lu, W. Li & W. Yin, "Quality control of Gardeniae Fructus by HPLC-PDA fingerprint coupled with chemometric methods," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 53, no. 10, pp. 1685-1694, 2015.

Simultaneous determination of crocin and crocetin in food samples by high-performance liquid chromatography (HPLC-PDA)

Do Thi Hong Thuy^{1,2}, Pham Van Khue¹, Nguyen Thi Anh Huong¹,
Vu Thi Trang², Le Thi Thuy², Le Thi Hong Hao^{1,2}

¹ University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

² National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

Abstract

Crocine and crocetine are two bioactive compounds found in saffron and gardenia. In the food industry, due to their natural yellow or orange color, they are used as food colouring. The study was carried out to optimize the high-performance liquid chromatography combined with a photodiode detector (HPLC-PDA) to simultaneously determine the crocine and crocetine content in food. Analytical samples were ultrasonicated with ACN:H₂O (1:1, v/v) solvent for 30 minutes. The sample solution was determined by HPLC – PDA with the following conditions: Sunfire C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm; 5 µm) mobile phase consisting of 0.1% formic acid and ACN using gradient program. The method has good specificity, the standard curves of crocine and crocetine have correlation coefficients $R^2 > 0.999$, respectively, repeatability and recovery meet AOAC requirements. The limit of detection (LOD) for crocine and crocetine were 0.5 mg/kg and 0.25 mg/kg, respectively. The method has been applied to simultaneously determine crocine and crocetine in 15 real samples and results in 13 out of 15 samples detecting crocine content, 11 out of 15 samples detecting crocetine content, and in 2 out of 15 samples. neither crocine nor crocetine was detected. The gardenia powder group contained the highest content of crocine and crocetine (23.5 g/100g – 24.4 g/100g) and dried lychee samples - sun-dried or dried gardenia contains the second highest concentrations of crocine and crocetine in the food group.

Keywords: *Crocine, crocetine, high-performance liquid chromatography, HPLC, PDA, food*