

Research Article**Study on determination of cynarin in dietary supplement containing artichoke by high performance liquid chromatography**

Mac Thi Thanh Hoa², Le Tuyet Chinh¹, Nguyen Thi Van Anh¹, Bui Trong Huy¹,
Nguyen Van Khoa², Nguyen Quang Hung², Cao Cong Khanh², Nguyen Duc Thanh^{3*}

¹Viet Nam University of Traditional Medicine and Pharmacy, Hanoi, Viet Nam

²National Institute for Food Control, Hanoi, Viet Nam

³Vietnam Military Medical Academy, Hanoi, Viet Nam

(Received: 20 May 2024; Revised: 27 May 2024; Accepted: 02 Jun 2024)

Abstract

There has been no announcement on the standardization and testing of cynarin in dietary supplements containing artichokes in Vietnam. The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to determine cynarin in dietary supplements containing artichokes. The sample was extracted twice with 80% methanol solvent and ultrasonicated at 50°C for 20 minutes. Centrifuge at 6000 rpm for 5 minutes, filter, and inject into HPLC system with XBridge C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) and corresponding pre-column, mobile phase consisting of two solvents phosphoric acid 0, 1% and acetonitrile eluted according to gradient program, flow rate 1mL/min, detection wavelength 322nm. The calibration curves for cynarin had $R^2 = 1$, and the validation parameters met AOAC standards. The method detection limits and the limit of quantification were 3.00 mg/kg and 10.0 mg/kg, respectively. The validated method was applied to determine cynarin in 15 dietary supplement samples. The content of cynarin varied depending on the manufacturer.

Keywords: Cynarin, artichoke, HPLC, dietary supplement.

* Corresponding author: Nguyen Duc Thanh (E-mail: nguyenducthanh@vmmu.edu.vn)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4351>

Copyright © 2024 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Nghiên cứu định lượng cynarin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa actiso bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Mạc Thị Thanh Hoa², Lê Tuyết Chinh¹, Nguyễn Thị Vân Anh¹, Bùi Trọng Huy¹,
Nguyễn Văn Khoa², Nguyễn Quang Hùng², Cao Công Khánh², Nguyễn Đức Thanh^{3*}

¹Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

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

³Học viện Quân Y, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

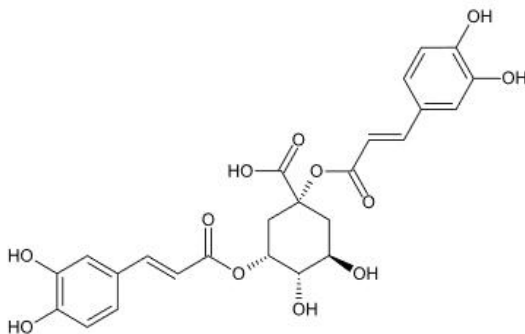
Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có công bố nào về việc tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm cynarin trong thực phẩm, thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa actiso. Do đó, để kiểm soát và đảm bảo chất lượng sản phẩm, nghiên cứu này đã phát triển phương pháp HPLC-PDA để định lượng cynarin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa actiso. Mẫu được chiết lập hai lần bằng hỗn hợp dung môi methanol: nước (80:20, v/v), siêu âm ở 50°C trong 20 phút. Dịch chiết được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút và lọc, tiêm vào hệ HPLC với cột XBridge C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) và tiền cột tương ứng. Pha động gồm hai dung môi acid phosphoric 0,1% và acetonitril rửa giải theo chương trình gradient, tốc độ dòng 1 mL/phút. Bước sóng phát hiện của cynarin là 322nm. Phương pháp cho khoảng tuyến tính 0,25 – 49,4 µg/mL ($R^2 = 1$), giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 3,0 mg/kg và 10 mg/kg, độ thu hồi từ 86,5 – 109%, độ lặp lại (1,43 – 4,48%) đáp ứng yêu cầu AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích hàm lượng cynarin trong 15 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe có actiso trên thị trường.

Từ khóa: Cynarin, actiso, HPLC, thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Actiso có tên khoa học là *Cynara scolymus* L., họ Cúc (Asteraceae), là dược liệu đem lại nhiều lợi ích cho sức khỏe con người như phục hồi tế bào gan, tăng chức năng chống độc của gan, phòng ngừa bệnh xơ vữa động mạch, làm hạ cholesterol máu, chống ung thư và chống oxy hóa [1]. Ngoài ra, actiso còn có tác dụng thông tiểu [2]. Theo Dược điển Việt Nam V, bộ phận dùng là lá đã phơi hoặc sấy khô [3]. Thành phần hóa học của lá của actiso bao gồm các acid hữu cơ, các hợp chất flavonoid (dẫn chất của luteolin) và các thành phần khác [4]. Thành phần chiếm hàm lượng cao là acid phenolic, trong đó acid dicaffeoyl-1,3-quinic (cynarin) là hoạt chất chính có vai trò quan trọng [2]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng cynarin có tác dụng trị sỏi mật, hạ cholesterol máu, tăng cường bảo vệ gan [5]. Gần đây, cynarin cũng được chứng minh có hoạt động chống lại virus gây suy giảm miễn dịch ở người (chống HIV-1; 44). Ngoài ra, cynarin có hoạt tính chống oxy hóa, kháng cholinergic, khả năng khử, loại bỏ gốc tự do và liên kết kim loại rõ rệt [6].

Cynarin là một acid phenol dẫn xuất của acid caffeic, là chất kết tinh không màu, ít tan trong nước lạnh, tan nhiều trong nước nóng và các loại alcol. Cynarin là một acid yếu, khi tan trong dung dịch kiềm có màu vàng và không bền [7].



Hình 1. Công thức hóa học của cynarin

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu định lượng cynarin trong actiso bằng phương pháp HPLC trên hoa actiso, lá actiso, thực phẩm bảo vệ sức khỏe và dược phẩm chứa actiso. Qing Shen và cộng sự tiến hành phân tích 3 dẫn xuất acid cafeoylquinic trong hoa và lá actiso bằng LC-MS/MS với cột C18-silica (50 mm × 2,1 mm, 2,7 μm), chương trình gradient pha động gồm acid formic 0,1% và acetonitril (ACN). Phương pháp có giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của cynarin lần lượt là 0,008 ng/mL và 0,025 ng/mL [8]. Trong một công bố khác, Amanda de Assis Carneiro và cộng sự đã định lượng sáu dẫn xuất acid caffeoylquinic trong viên nén và viên nang chứa actiso. Mẫu được chiết bằng hỗn hợp dung môi methanol: nước (3:7, v/v). Cột sắc ký C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) với pha động gồm acid phosphoric 0,5% và acid phosphoric 0,5% trong acetonitril rửa giải theo chương trình gradient. Phương pháp có độ thu hồi từ 108 - 112%; RSD = 1,96%; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,27 μg/mL và 0,89 μg/mL [9].

Dược điển Việt Nam V quy định sử dụng phương pháp UV-Vis để xác định hàm lượng cynarin trong lá và cao đặc actiso [3]. Tại Việt Nam, Nguyễn Quốc Thắng và cộng sự đã xác định cynarin trong cao chiết actiso bằng sắc ký lỏng pha đảo với cột Shim-pack GISS C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 μm), pha động gồm hai dung môi methanol: acid acetic 5% = 10 : 90 (v/v). Phương pháp có tổng thời gian phân tích 25 phút, thời gian lưu của cynarin là 10,939 phút; LOD = 0,64 μg/mL và LOQ = 1,93 μg/mL [10]. Tuy nhiên, trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa nhiều dược liệu có thể ảnh hưởng đến độ chính xác của kết quả. Hơn nữa, trên nhiều thực phẩm bảo vệ sức khỏe chưa có công bố hàm lượng cynarin trong actiso. Vì vậy, nghiên cứu này đã phát triển phương pháp HPLC với detector PDA để định lượng cynarin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa actiso.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng và thẩm định trên ba nền mẫu dạng bột, dạng nhiều dầu và dạng lỏng được lưu hành trên thị trường.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn cynarin (98,7%) có nguồn gốc từ Chromadex (Mỹ), ASB-00003991-005, 00003991-915. Các dung môi methanol, acetonitril, acid ortho-phosphoric, acid formic, acid acetic đều có nguồn gốc từ Merck (Đức). Nước dùng trong nghiên cứu được làm sạch từ hệ thống MilliQSP (Merck, Đức).

Dung dịch chuẩn gốc 494 $\mu\text{g/mL}$ được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng 12,5 mg chuẩn cynarin trên cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg, chuyển vào bình định mức 25 mL. Hòa tan và định mức bằng methanol. Các dung dịch chuẩn trung gian và chuẩn làm việc được pha loãng từ chuẩn gốc với dung môi methanol.

2.3. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Alliance – Waters e2695 kết nối với detector 2998 PDA của hãng Waters. Cột sắc ký XBridge C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm) với tiền cột tương ứng của hãng Waters và các dụng cụ phụ trợ khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Điều kiện HPLC-PDA

Dựa vào tài liệu tham khảo [9, 11, 12] và các điều kiện sẵn có tại phòng thí nghiệm, sử dụng cột sắc ký XBridge C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm) với detector PDA. Tốc độ dòng 1 mL/phút và thể tích tiêm mẫu 10 μL . Tiến hành nghiên cứu các điều kiện HPLC-PDA gồm:

Trên cơ sở quét phổ UV-Vis, lựa chọn bước sóng phát hiện trong khoảng 190-800nm đối với cynarin chuẩn và chọn bước sóng hấp thụ cực đại.

Khảo sát thành phần pha động: Khảo sát 03 hệ dung môi pha động: hệ dung môi 1 (acid formic 0,1% và ACN), hệ dung môi 2 (acid acetic 1% và ACN), hệ dung môi 3 (acid phosphoric 0,1% và ACN). Sau đó tiến hành khảo sát các chương trình pha động đẳng dòng và gradient.

2.4.2. Quy trình xử lý mẫu

Dựa vào tài liệu tham khảo [8, 9, 12], quy trình xử lý mẫu dự kiến như sau: Mẫu được đồng nhất, cân 0,5 g vào ống ly tâm 50 mL. Thêm dung môi chiết (methanol; methanol : nước, 80 : 20, v/v; methanol : nước, 50 : 50, v/v), lắc ngang hoặc rung siêu âm 10, 20, 30 phút ở điều kiện nhiệt độ 30°C, 50°C, 80°C. Dịch được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 6000 vòng/phút. Gạn dịch vào bình định mức 50 mL, các lần chiết sau (khảo sát chiết 1, 2, 3 lần) tiếp tục gộp dịch vào bình định mức 50 mL. Định mức đến vạch bằng dung môi chiết, lọc qua màng lọc 0,45 μm thu được dịch chiết và tiêm vào hệ thống HPLC-PDA.

Đối với chiết 1 lần: thêm 40 mL dung môi chiết. Đối với chiết 2 lần: mỗi lần thêm 20 mL dung môi chiết và gộp dịch. Đối với chiết 3 lần: lần 1 và lần 2 thêm 20 mL dung môi chiết, lần 3 thêm 10 mL dung môi chiết và gộp dịch.

Đối với nền mẫu dạng dầu: thêm khoảng 25 mL n-hexan, đập nắp, lắc đều bằng vortex, sau đó ly tâm 6000 vòng/phút trong vòng 5 phút. Gạn dịch và để khô tự nhiên trong tủ hút, sau đó thực hiện tương tự quy trình chiết mẫu như trên.

2.4.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp dựa trên các quy định của AOAC [13]:

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích mẫu trắng (thành phần được trình bày trong Bảng 1), mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn.

Bảng 1. Thành phần nền mẫu trắng

Nền mẫu	Thành phần
Dạng bột	Cao dược liệu (cao kế sữa, cao khúng khéng, cao ngũ vị tử, cao giảo cổ lam, cao cà gai leo, cao diệp hạ châu, cao kim ngân hoa), tinh bột, talc, magnesium stearate, PVP K30.
Dạng dầu	Cao khô dược liệu (cao kế sữa, cao khô rau đắng đất, cao khô bìm bìm), dầu đậu nành, gelatin, palm oil, glycerin, sorbitol, lecithin, sáp ong trắng, nước tinh khiết.
Dạng lỏng	Cao đặc dược liệu (cao kế sữa, nhân trần, bồ công anh, cúc hoa vàng, cam thảo, kim ngân hoa), đường kính (chất tạo ngọt tự nhiên), acid citric, natri benzoat, tinh dầu bạc hà, nước tinh khiết.

Xây dựng đường chuẩn: Yêu cầu đường chuẩn phải có hệ số $R^2 \geq 0,995$ và độ chệch của từng điểm không vượt quá $\pm 15\%$.

Độ lặp lại: Độ lặp lại được xác định ở 3 mức nồng độ khác nhau. Thêm một lượng chuẩn xác định vào mẫu trắng, phân tích lặp lại 6 lần bằng phương pháp đã khảo sát. Dựa vào kết quả của các lần phân tích, tính và đánh giá độ lệch chuẩn tương đối RSD_r theo yêu cầu của AOAC.

Độ tái lập: Đánh giá độ tái lập của phương pháp, hai người khác nhau tiến hành phân tích trên cùng chung phương pháp, trên các mẫu được chuẩn bị giống nhau. Dựa vào kết quả các lần phân tích, tính và đánh giá qua thông số RSD_R theo yêu cầu của AOAC.

Độ thu hồi: Độ thu hồi được xác định ở 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao. Thêm một lượng chuẩn xác định vào mẫu trắng, phân tích lặp lại 6 lần bằng phương pháp đã khảo sát.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng (LOD và LOQ) của phương pháp được xác định thông qua phân tích lặp lại 10 lần mẫu trắng thêm chuẩn (trong khoảng 5-7 lần LOD ước lượng), tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD) của nồng độ xác định được. LOD và LOQ tương ứng bằng 3SD và 10SD, hệ số $R = x_{tb}/LOD$ phải trong khoảng từ 4-10

2.4.4 Phân tích mẫu thực

Dựa vào phương trình đường chuẩn và diện tích pic của mẫu thu được, tính nồng độ của chất phân tích trong dịch mẫu.

Hàm lượng cynarin có trong mẫu thử được tính theo công thức sau, X (mg/100g đối với dạng bột và dạng dầu; mg/100mL đối với dạng lỏng):

$$X = \frac{C \times V \times k \times 100}{m \times 1000}$$

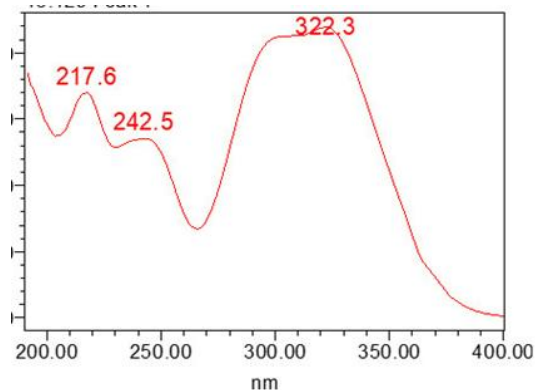
Trong đó: C là nồng độ chất phân tích được tính từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$), V là thể tích dịch chiết định mức (mL), k là hệ số pha loãng, m là khối lượng mẫu cân (g), 100 là hệ số quy đổi từ 1 g sang 100 g hoặc từ 1 mL sang 100 mL, 1000 là hệ số quy đổi μg sang mg.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện HPLC-PDA

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) của cynarin (Hình 2) cho thấy cynarin có cực đại hấp thụ chính ở các bước sóng tương ứng là 322,3 nm. Để giảm ảnh hưởng của dung môi, tạp chất và đảm bảo được độ nhạy của phương pháp trong nghiên cứu này bước sóng phát hiện của detector được lựa chọn tại 322 nm.

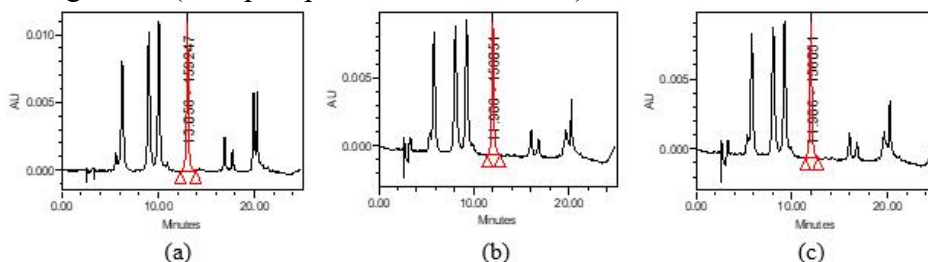


Hình 2. Phổ UV-Vis của cynarin trong dung môi methanol

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...

Tiến hành khảo sát ba hệ dung môi pha động với chương trình gradient được trình bày trong Bảng 3: hệ dung môi 1 (acid formic 0,1% và ACN), hệ dung môi 2 (acid acetic 1% và ACN), hệ dung môi 3 (acid phosphoric 0,1% và ACN).



Hình 3. Sắc ký đồ của cynarin với pha động (a) hệ dung môi 1 (acid formic 0,1% và ACN), (b) hệ dung môi 2 (acid acetic 1% và ACN), (c) hệ dung môi 3 (acid phosphoric 0,1% và ACN)

Qua sắc ký đồ thu được với 3 hệ dung môi khảo sát (Hình 3), cả 3 hệ đều cho khả năng tách cynarin khỏi các nền mẫu và chất cản trở. Tuy nhiên, khi so sánh các thông số (Bảng 2) với hệ dung môi 3 cho diện tích, chiều cao pic lớn nhất và tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu cung lớn nhất giúp làm tăng độ nhạy của phương pháp, độ rộng chân pic nhỏ nhất, số đĩa lý thuyết lớn nhất giúp làm tăng độ chọn lọc cho chất phân tích, cũng như hình dáng pic gọn đẹp. Do đó, hệ dung môi chứa H_3PO_4 0,1% và ACN được lựa chọn làm pha động.

Bảng 2. Khảo sát dung môi pha động

Dung môi pha động	Spic (μV*sec)	Hpic (μV)	S/N	N (đĩa/m)	Width50% (sec)
Hệ dung môi 1	159247	10975	84,95	25700	0,190
Hệ dung môi 2	156051	9676	23,84	16200	0,219
Hệ dung môi 3	217115	17613	93,58	33200	0,166

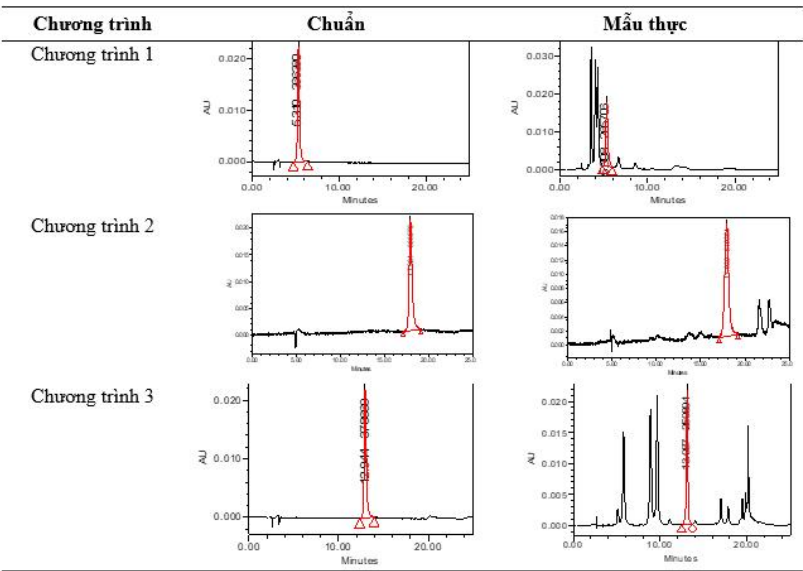
* S/N: Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu; N: Số đĩa lý thuyết; Width50%: Độ rộng chân pic

Để tăng khả năng tách tối ưu chất phân tích, tiến hành khảo sát 3 chương trình pha động: Chương trình 1 (acid phosphoric 0,1%: ACN = 60: 40, v/v), chương trình 2 (acid phosphoric 0,1%: ACN = 90: 10, v/v), chương trình 3 (Kênh A: acid phosphoric 0,1% và kênh B: ACN với chương trình gradient được thể hiện trong Bảng 3).

Bảng 3. Chương trình gradient

Thời gian (min)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
0,00	90,0	10,0
3,00	90,0	10,0
16,00	78,0	22,0
17,00	60,0	40,0
20,00	60,0	40,0
20,50	90,0	10,0
25,00	90,0	10,0

Kết quả (Hình 4) cho thấy, cả 3 chương trình khi phân tích mẫu chuẩn tinh khiết đều cho pic đẹp, cân xứng. Tuy nhiên chương trình 1 thời gian lưu quá ngắn nên dễ bị lẫn với tạp chất khi phân tích mẫu thực. Chương trình 2 tăng tỷ lệ acid phosphoric 0,1% khiến cho thời gian rửa giải kéo dài, các tạp bị lưu giữ lâu trong cột gây bẩn hệ thống. Chương trình 3 cho thời gian lưu vừa phải, tách tốt chất phân tích ra khỏi tạp trong mẫu thực. Do vậy, chương trình 3 là chương trình gradient được lựa chọn.

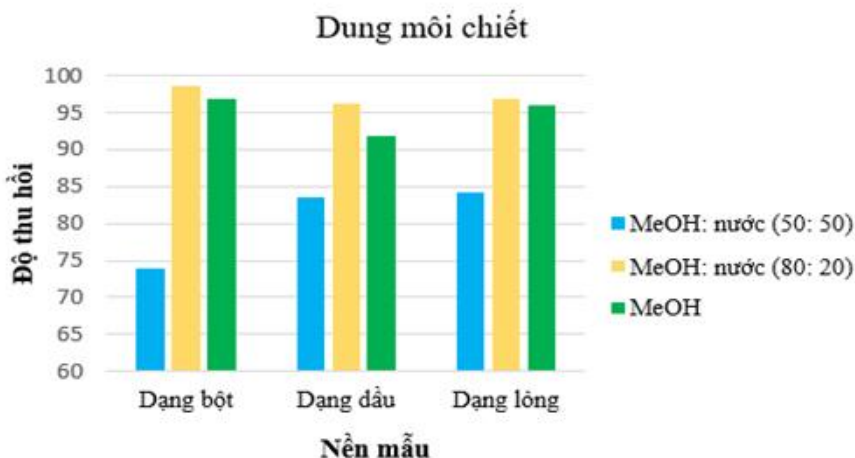


Hình 4. Sắc ký đồ cynarin chuẩn và mẫu thực với các chương trình pha động

3.2. Tối ưu điều kiện xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Dung môi chiết ảnh hưởng tới hiệu quả chiết của phương pháp. Tiến hành khảo sát lựa chọn dung môi chiết là methanol với các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện trong Hình 5.

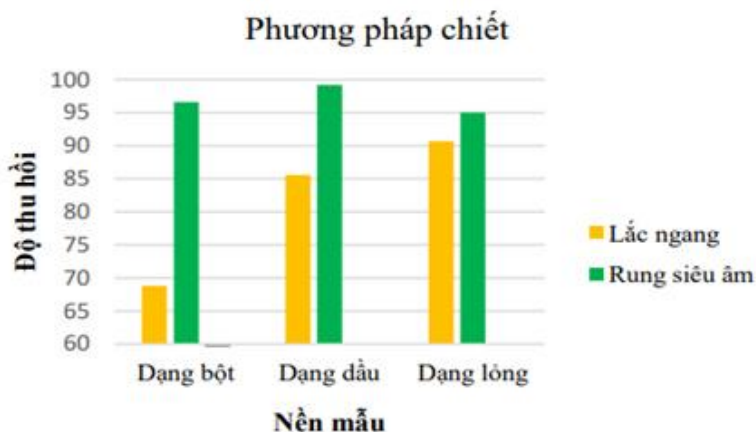


Hình 5. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Kết quả cho thấy, với cả 3 loại nền mẫu bột, dầu và lỏng, methanol 80% đều cho hiệu quả chiết tốt hơn so với methanol 50% và 100%. Do đó, nghiên cứu này lựa chọn methanol 80% làm dung môi chiết.

3.2.2. Khảo sát phương pháp chiết

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, tiến hành khảo sát 2 cách chiết: sử dụng máy lắc ngang và sử dụng bể rung siêu âm. Kết quả thể hiện trong Hình 6.

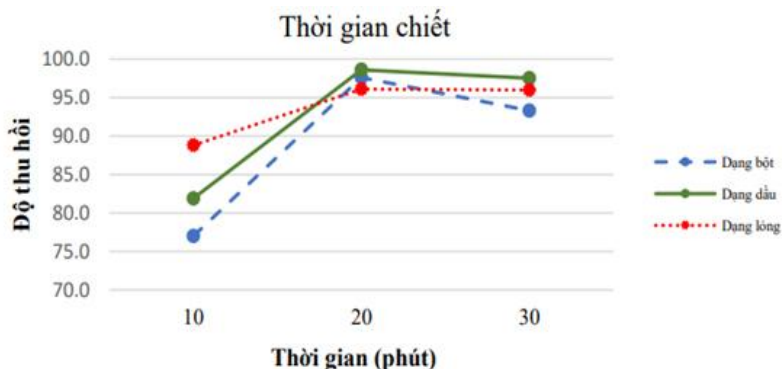


Hình 6. Kết quả khảo sát kỹ thuật chiết

Kết quả cho thấy, chiết bằng phương pháp rung siêu âm cho hiệu quả chiết tốt hơn so với chiết bằng phương pháp lắc ngang ở cả 3 nền mẫu. Do đó, kỹ thuật rung siêu âm được lựa chọn cho nghiên cứu này.

3.2.3. Khảo sát thời gian chiết

Thời gian chiết cũng là yếu tố ảnh hưởng đến lượng chất phân tích. Thời gian quá ngắn thì chất phân tích chưa thể hòa tan hết. Ngược lại, thời gian quá dài sẽ tốn thời gian chiết mẫu. Vì thế, tiến hành khảo sát chiết trong các thời gian khác nhau, kết quả khảo sát được thể hiện trong Hình 7.

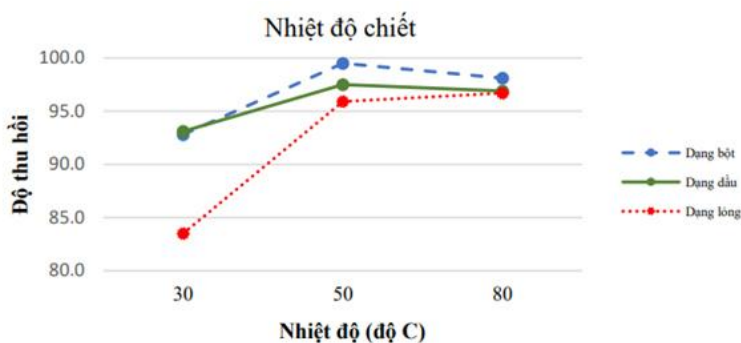


Hình 7. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Kết quả chỉ ra rằng khi chiết trong thời gian 20 phút và 30 phút hiệu quả chiết cao hơn hiệu khi chiết trong thời gian 10 phút. Hiệu quả chiết trong thời gian 20 và 30 phút không có sự sai khác đáng kể, vì vậy, để tiết kiệm thời gian nghiên cứu này chọn thời gian chiết 20 phút.

3.2.4. Khảo sát nhiệt độ chiết

Nhiệt độ cũng là một trong những yếu tố làm ảnh hưởng tới khả năng hòa tan của một chất. Khi nhiệt độ tăng thì khả năng hòa tan cũng tăng. Thực hiện khảo sát các nhiệt độ chiết khác nhau, kết quả được thể hiện trong Hình 8.



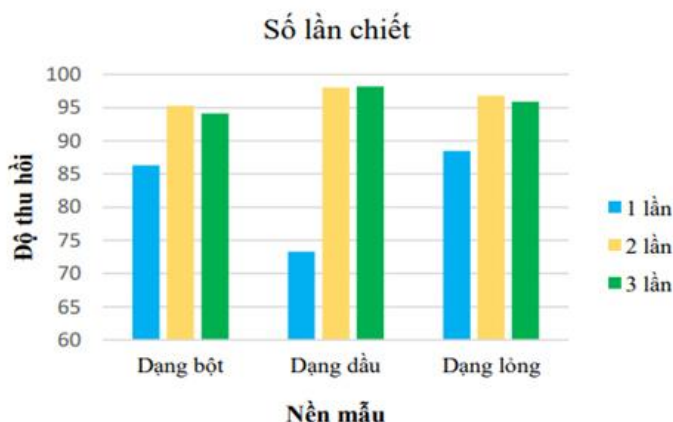
Hình 8. Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết

Kết quả chỉ ra rằng hiệu suất chiết ở 50°C và 80°C có hiệu suất chiết tương đương nhau. Tuy nhiên, ở nhiệt độ cao (80°C) sẽ tăng độ tan của một số tạp chất, dẫn đến dịch chiết có nhiều tạp chất sẽ khó lọc và gây bẩn hệ thống phân tích. Hơn nữa, nhiệt độ cao sẽ tốn năng lượng hơn, do đó, nhiệt độ 50°C được lựa chọn cho nghiên cứu này.

3.2.5. Khảo sát số lần chiết lặp

Chiết lặp lại là một cách để đảm bảo chất phân tích được chiết tối đa ra khỏi nền mẫu. Kết quả được thể hiện ở Hình 9, khi số lần chiết tăng lên 2, 3 lần, hàm lượng chất phân tích đều cao hơn chiết 1 lần với cả 3 nền mẫu. Hàm lượng cynarin sau khi chiết 3 lần và chiết

2 lần tương đương nhau. Vì vậy, để kết quả chiết mẫu đảm bảo đồng thời tiết kiệm thời gian và dung môi, nghiên cứu lựa chọn chiết 2 lần.

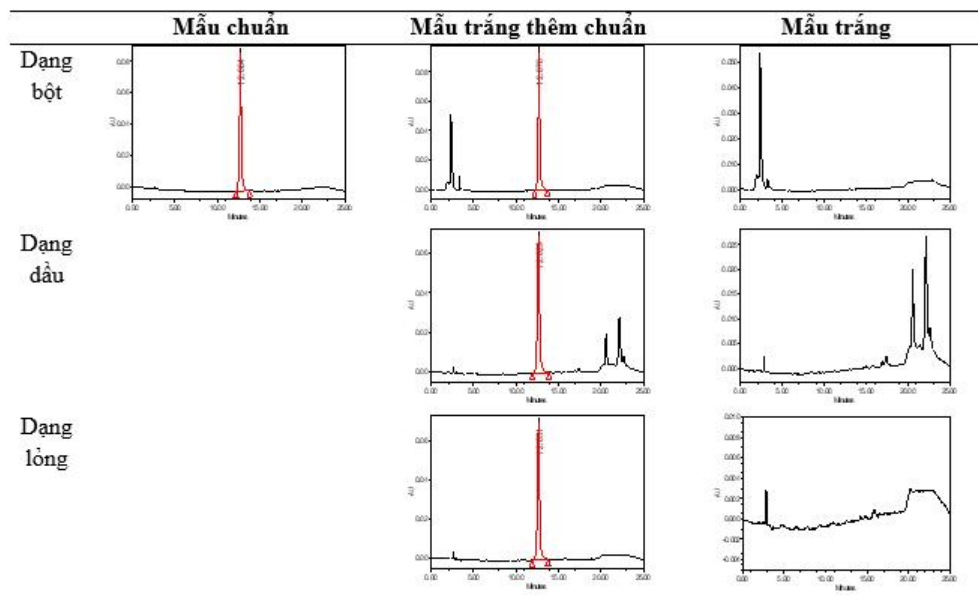


Hình 9. Kết quả khảo sát số lần chiết lặp

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Với cả 3 nền mẫu đều cho kết quả (Hình 10) mẫu trắng không cho tín hiệu phân tích, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn cho tín hiệu chất phân tích tại cùng thời gian lưu với sai lệch nhỏ hơn 3%. Như vậy, quy trình đã xây dựng có độ đặc hiệu tốt, không cho dương tính giả.



Hình 10. Sắc ký đồ tính đặc hiệu trên 3 nền mẫu

3.3.2. Đường chuẩn

Tiến hành đo dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi từ 0,25-49,4 $\mu\text{g/mL}$. Xây dựng mối quan hệ sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ chất phân tích thu được đường chuẩn của cynarin có phương trình $y = 51847x - 357,17$ với $R^2 = 1$ và độ chệch (bias) (%) đều $\leq 15\%$, đạt yêu cầu của AOAC.

3.3.3. Độ lặp lại, độ tái lập và độ thu hồi

Kết quả thẩm định độ lặp lại, độ tái lập và độ thu hồi được chỉ ra ở Bảng 4 và Bảng 5. Độ lặp lại và độ tái lập đều đạt yêu cầu theo AOAC.

Bảng 4. Kết quả độ lặp lại và độ tái lập của cynarin trong 3 nền mẫu

Nền mẫu	Độ lặp lại (RSD _r , %)				Độ tái lập (RSD _R , %)		
		Hàm lượng trung bình (g/kg)	Kết quả	Yêu cầu	Hàm lượng trung bình (g/kg)	Kết quả	Yêu cầu
Dạng bột	1 µg/mL	0,024	3,04	≤ 16%	0,02	4,20	≤ 11%
	10 µg/mL	0,46	3,76	≤ 11%	0,46	3,82	≤ 7,3%
	100 µg/mL	0,99	1,44	≤ 8%	1,00	2,93	≤ 5,3%
Dạng dầu	1 µg/mL	0,024	2,88	≤ 16%	0,02	4,22	≤ 11%
	10 µg/mL	0,22	2,00	≤ 11%	0,22	3,16	≤ 7,3%
	100 µg/mL	2,14	3,37	≤ 8%	2,10	4,07	≤ 5,3%
Dạng lỏng	1 µg/mL	0,022	4,48	≤ 16%	0,02	4,51	≤ 11%
	10 µg/mL	0,19	2,78	≤ 11%	0,19	3,63	≤ 7,3%
	100 µg/mL	2,25	1,43	≤ 8%	2,20	2,90	≤ 5,3%

Độ thu hồi của dạng bột từ 87,4-109%, của dạng dầu từ 86,7%-106% và với dạng lỏng 86,5-102% đều nằm trong giới hạn cho phép của AOAC. Như vậy, phương pháp phù hợp để phân tích cynarin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Bảng 5. Kết quả độ thu hồi của cynarin trong 3 nền mẫu

Nền mẫu		Độ thu hồi (%)		
		Hàm lượng trung bình (g/kg)	Kết quả	Yêu cầu
Dạng bột	1 µg/mL	0,02	95,2-109	80-110
	10 µg/mL	0,46	88,9-98,9	80-110
	10 µg/mL	0,92	84,7-101	80-110
Dạng dầu	1 µg/mL	0,02	86,7-106	80-110
	10 µg/mL	0,23	92,2-96,7	80-110
	100 µg/mL	2,38	95,7-102	90-107
Dạng lỏng	1 µg/mL	0,02	86,5-102	80-110
	10 µg/mL	0,45	89,8-98,1	80-110
	100 µg/mL	2,41	95,8-101	90-107

3.3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành phân tích lặp lại 12 lần mẫu trắng thêm chuẩn ở mức 0,25 µg/mL trên ba nền mẫu TPBVSK dạng bột, dạng dầu và dạng lỏng. Kết quả LOD và LOQ xác định được trình bày trong Bảng 6.

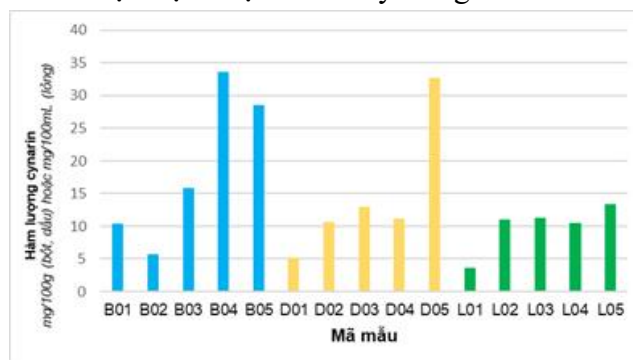
Bảng 6. LOD và LOQ của cynarin trong 3 nền mẫu

Nền mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Kết quả		
		LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	R
Dạng bột	0,25	3,00	10,00	7,94
Dạng dầu	0,25	3,00	10,00	7,90
Dạng lỏng	0,25	3,00	10,00	7,39

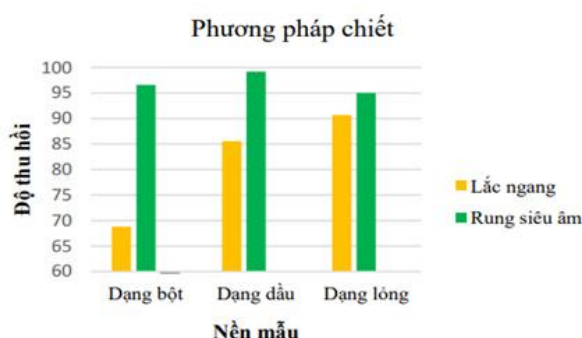
Kết quả cho thấy hệ số $R = x_{tb}/\text{LOD}$ của cả 3 dạng nền mẫu đều nằm trong khoảng 4 – 10 đáp ứng yêu cầu của AOAC.

3.4. Phân tích mẫu thực

Áp dụng quy trình đã xây dựng và thẩm định, tiến hành phân tích hàm lượng cynarin trong 15 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe có actiso; trong đó 5 mẫu dạng bột, 5 mẫu dạng dầu và 5 mẫu dạng lỏng. Các mẫu đều được lấy mẫu, mã hóa và lưu theo đúng quy trình của Viện kiểm nghiệm an toàn về sinh thực phẩm quốc gia. Kết quả phân tích được trình bày trong Hình 11. Sắc ký đồ mẫu đại diện được trình bày trong Hình 12.



Hình 11. Hàm lượng cynarin trong mẫu thực. Trong đó, B01-B05: TPBVSK dạng bột, D01-D05: TPBVSK dạng dầu, L01-L05: TPBVSK dạng lỏng



Hình 12. Sắc ký đồ đại diện cho mẫu thực

Với 15 mẫu thực phẩm chức năng được phân tích, hàm lượng cynarin dao động khoảng 5,76-33,6 mg/100g đối với sản phẩm dạng bột; 5,16-32,7 mg/100g đối với sản phẩm dạng dầu và 3,65-13,4 mg/100mL với sản phẩm dạng lỏng. Hàm lượng cynarin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe đang lưu hành trên thị trường có sự biến đổi rất lớn dù cho cùng dạng bào chế, phụ thuộc vào từng nhãn hàng. Các sản phẩm dạng lỏng trong nghiên cứu này có hàm lượng cynarin thấp hơn so với hai dạng bào chế còn lại là dạng bột và dạng dầu.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phát triển thành công phương pháp HPLC-PDA để định lượng cynarin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Quy trình xử lý mẫu tương đối đơn giản, có thể dễ dàng triển khai ở các cơ sở kiểm nghiệm địa phương. Phương pháp cho giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được xác định lần lượt là 3,00 mg/kg và 10,00 mg/kg đối với cả 3 nền mẫu dạng bột, dạng dầu và dạng lỏng. Các thông số thẩm định đều đáp ứng các tiêu chuẩn của AOAC. Phương pháp đã được áp dụng trong thực tế tại Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K. Schütz, D. Kammerer, R. Carle, and A. Schieber, "Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPL-DAD-ESI/MS," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, pp. 4090-4096, 2014.
- [2]. Ngo Thu Van and Tran Hung, *Pharmacognosy I*, Medical Publishing House, Hanoi, 2011, pp. 405-409 (In Vietnamese).
- [3]. Ministry of Health, *Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, Hanoi, 2018 (in Vietnamese).
- [4]. A. M. A. G Nasser, "Phytochemical study of *Cynara scolymus* L. (Artichoke) (Asteraceae) Cultivated in Iraq, Detection and identification of phenolic acid compounds Cynarin and chlorogenic acid," *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 21(1), pp. 6-13, 2012.
- [5]. Herbal Medicine, Artichoke, *Pharmaceutical press*, London, 2007.
- [6]. L. Panizzi, M. L. Scarpati, "Cynarine". [Online]. Available: <https://drugs.ncats.io/drug/85D81U9JAV>, [Accessed 02/02/2024].
- [7]. Do Huy Bich et al., *Medicinal plants and medicinal animals in Vietnam I*, Science and Technics Publishing House, Hanoi, 2006, pp. 79-81 (in Vietnamese).
- [8]. Q. Shen, Z. Dai, Y. Lu, "Rapid determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. by ultra-fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry based on a fused core C18 column," *Journal of Separation Science*, vol. 33, pp. 3152-3158, 2010.
- [9]. A. A. Carneiro, Y. Y. Barros, M. M. Freitas et al., "Identification and quantification of caffeoylquinic and derivatives in *Cynara scolymus* L. tablets and capsules," *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 11(6), pp. 94-102, 2017.
- [10]. Nguyen Quoc Thang, Vo Thị Kim Hoa, Do Thi Long et al., "Validation of a method for the simultaneous determination of Cynarin and chlorogenic acid in *Cynara scolymus* L. extract using reversed-phase high-performance liquid chromatography," *Journal of Analytical Sciences*, vol. 26, no. 3A/2021, pp. 212-219, 2021 (in Vietnamese).
- [11]. K. Schütz, E. Muks, R. Carle, and A. Schieber, "Quantitative determination of phenolic compounds in Artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by

high-performance liquid chromatography,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, pp. 8812-8817, 2006.

- [12]. USP 38 – NF33/ Dietary Supplements: Echinacea angustifolia, 2015.
- [13]. Tran Cao Son, *Method validation in chemical and microbiological analysis*, Science and Technics Publishing House, 2010 (in Vietnamese).