

Research Article**Simultaneous determination of acid carnosic and carnosol
in rosemary-containing foods by high-performance liquid chromatography
with photodiode array detection (HPLC–PDA)**

Do Truc Quynh^{1,2*}, Nguyen Thanh Mai¹, Do Thi Hong Thuy²,
Lai Thi Thu Trang¹, Pham Thi Thanh Ha¹

¹Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

²National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

(Received: 09 Aug 2024; Revised: 11 Sep 2024; Accepted: 25 Sep 2024)

Abstract

The research was conducted to develop and validate a simultaneous quantification method for acid carnosic (CA) and carnosol (CAR) in rosemary-containing foods using high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (HPLC–PDA), with a simple and fast sample processing procedure. Analytical samples were extracted using a methanol–phosphoric acid mixture (99.5:0.5, v/v) at room temperature for 20 minutes. The chromatographic conditions were as follows: Sunfire C18 column (4.6 mm x 250 mm; 5 μm), mobile phase consisting of 0.1% phosphoric acid – acetonitrile (40:60, v/v), flow rate of 1 mL/min, injection volume of 10 μL, detection at 230 nm. The method was validated according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) criteria. The results showed that the method had good specificity, and the standard curves of acid carnosic and carnosol were linear in the concentration range of 2.5 – 200 μg/mL. The limits of detection (LOD) for acid carnosic and carnosol were 0.3 μg/mL and 0.25 μg/mL, respectively. The limits of quantification (LOQ) for acid carnosic and carnosol were 1 μg/mL and 0.75 μg/mL, respectively. The recovery rates were in the range of 98.8 – 100.6% (acid carnosic) and 97.5 – 102.2% (carnosol). Repeatability and internal reproducibility met the requirements of AOAC. The method was applied to evaluate the acid carnosic and carnosol levels in 20 food samples collected from the market, such as rosemary leaf powder, dried rosemary leaves, rosemary herbal tea ...

Keywords: acid carnosic, carnosol, rosemary leaves, HPLC-PDA, food.

* Corresponding author: Do Thi Truc Quynh (E-mail: trucquynh2298@gmail.com)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4375>

Xác định đồng thời acid carnosic và carnosol trong thực phẩm chứa lá hương thảo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-PDA)

Đỗ Trúc Quỳnh^{1,2*}, Nguyễn Thanh Mai¹, Đỗ Thị Hồng Thúy², Lại Thị Thu Trang¹,
Phạm Thị Thanh Hà¹

¹Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

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

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời acid carnosic và carnosol trong thực phẩm chứa lá hương thảo bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp detector chuỗi diod quang (HPLC-PDA), với quy trình xử lý mẫu đơn giản, nhanh chóng. Mẫu phân tích được chiết bằng kỹ thuật lắc ngang với hỗn hợp methanol - acid phosphoric (99,5:0,5, v/v) ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Các điều kiện sắc ký như sau: cột Sunfire C18 (4,6 mm x 250 mm; 5 μ m), pha động gồm acid phosphoric 0,1% - acetonitrile (40:60, v/v), tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm 10 μ L, phát hiện ở bước sóng 230 nm. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn của acid carnosic và carnosol tuyến tính trong khoảng nồng độ 2,5 – 200 μ g/mL. Giới hạn phát hiện (LOD) của acid carnosic và carnosol lần lượt là 0,3 μ g/mL và 0,25 μ g/mL. Giới hạn định lượng (LOQ) của acid carnosic và carnosol lần lượt là 1 μ g/mL và 0,75 μ g/mL. Độ thu hồi trong khoảng 98,8 – 100,6% (acid carnosic) và 97,5 – 102,2% (carnosol). Độ lặp lại và độ tái lặp nội bộ đạt yêu cầu theo AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để đánh giá hàm lượng acid carnosic và carnosol trong 20 mẫu thực phẩm thu thập trên thị trường như bột lá hương thảo, lá hương thảo khô, trà thảo mộc hương thảo ...

Từ khoá: acid carnosic, carnosol, lá hương thảo, HPLC-PDA, thực phẩm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Y học hiện đại có xu hướng tìm kiếm và phát triển các phương pháp điều trị bệnh với các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên mà vẫn mang lại hiệu quả. Trong đó, acid carnosic và carnosol là hai hợp chất được phân lập từ cây hương thảo (*Rosmarinus officinalis*) - loại cây sử dụng như một loại gia vị nấu ăn, thảo mộc dân gian đang thu hút sự chú ý lớn từ cộng đồng nghiên cứu y học và dược phẩm. Với đặc tính vượt trội về khả năng chống oxy hoá mạnh mẽ [1-3], tính kháng khuẩn [4, 5], chống viêm [3, 6, 7], CA và CAR đã được nghiên cứu để điều trị nhiều bệnh, từ các bệnh nhiễm trùng đến ung thư [8].

Bên cạnh đó, người tiêu dùng ngày càng tập trung hơn vào sự an toàn và chất lượng của thực phẩm. Ở một số quốc gia, chiết xuất hương thảo (với hai hoạt chất chính là CA và CAR) đã được sử dụng làm chất phụ gia nguồn gốc tự nhiên trong công nghiệp thực phẩm do hoạt tính chống oxy hoá mạnh mẽ, tính kháng khuẩn tự nhiên, giúp ức chế sự phát triển của các vi sinh vật có hại, kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm và giảm bớt ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người [9, 10].

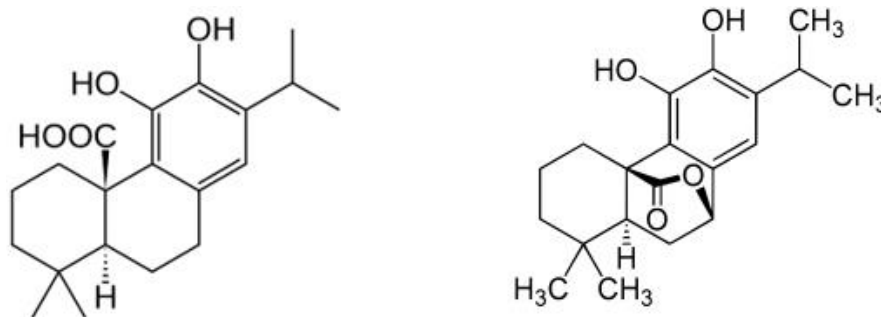
Hiện nay, trên thế giới có một số nghiên cứu về phương pháp định lượng đồng thời CA và CAR trên một số nền mẫu như: lá hương thảo (tươi hoặc khô), lá xô thơm (tươi hoặc khô), dầu ăn, sản phẩm chế biến sẵn, nước sốt... sử dụng các kỹ thuật như: điện di mao quản (CE), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các detector khác nhau [3, 11-14], sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS), sắc ký khí khối phổ (GC-MS) [6]. Tuy nhiên, các phương pháp về sắc ký khí hay sắc ký lỏng sử dụng detector khối phổ có nhược điểm là chi phí cao và thiết bị không phổ biến. Do đó, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là kỹ thuật được ưu tiên sử dụng trong các nền mẫu thực phẩm do tính phổ biến, độ nhạy, độ chính xác và hiệu suất thu hồi cao, đồng thời quá trình xử lý mẫu không quá phức tạp.

Tại Việt Nam, hương thảo là dược liệu sẵn có, được trồng ở một số tỉnh trung du miền núi phía Bắc, miền Trung, miền Nam, với hàm lượng CA và CAR có thể thay đổi tùy theo giống cây, hoàn cảnh môi trường. Vì vậy, với mục đích xây dựng một phương pháp định lượng hiệu quả, đáng tin cậy, chi phí thấp, nhằm kiểm soát nguồn nguyên liệu để lựa chọn các giống hương thảo chất lượng, làm tiền đề cho nghiên cứu thuốc mới và góp phần phát triển ngành công nghiệp thực phẩm, nghiên cứu này lựa chọn phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao detector chuỗi diod quang (HPLC-PDA) để xác định đồng thời CA và CAR trong thực phẩm chứa lá hương thảo, do kỹ thuật này có các ưu điểm về tính phổ biến, độ tin cậy, độ chọn lọc, độ nhạy cao, khoảng tuyến tính rộng, không phá hủy cấu trúc của mẫu và dễ dàng vận hành thiết bị, lựa chọn bước sóng phát hiện.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng chất nghiên cứu: acid carnosic và carnosol. Công thức cấu tạo của acid carnosic và carnosol được đưa ra tại Hình 1.



Hình 1. Công thức cấu tạo của acid carnosic và carnosol

Đối tượng mẫu nghiên cứu: các thực phẩm chứa lá hương thảo (bột lá hương thảo, lá hương thảo khô, trà thảo mộc hương thảo, bột gia vị ướp thịt hương thảo). Các mẫu được thu thập ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội và các trang thương mại điện tử.

2.2. Hoá chất, chất chuẩn

Các chất chuẩn: chuẩn acid carnosic (TRC, độ tinh khiết $\geq 95,0\%$) và chuẩn carnosol (LGC, độ tinh khiết $96,8\%$). Các dung môi tinh khiết dùng cho HPLC: acetonitrile, methanol được cung cấp bởi hãng Merck. Hoá chất tinh khiết phân tích: acid phosphoric, acid formic, acid acetic (Merck).

2.3. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Alliance, Waters e2695) trang bị detector PDA với phần mềm xử lý kết quả Empower 3 (Waters, Mỹ); cột sắc ký Sunfire C18 (4,6 mm x 250 mm; 5 μ m) và các thiết bị phụ trợ khác của phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Điều kiện phân tích

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

Thành phần pha động: acid phosphoric 0,1% trong nước:acetonitrile (40:60, v/v) với chế độ đẳng dòng [11].

2.4.2. Phương pháp xử lý mẫu

Cân chính xác khoảng 0,5 g bột lá hương thảo, chính xác đến 0,1 mg vào ống ly tâm 50 mL. Dựa vào tài liệu tham khảo [3, 13, 14], khảo sát trên 4 loại dung môi chiết mẫu là acid phosphoric 0,5% trong MeOH, acetone, ethanol, methanol. Tiến hành thêm khoảng 40 mL dung môi chiết mẫu vào, đậy nắp và chiết bằng các kỹ thuật, thời gian, nhiệt độ, số lần chiết khác nhau để lựa chọn phương pháp phù hợp. Sau quá trình chiết, đem ly tâm các ống trong 5 phút với tốc độ 6000 vòng/ phút, nhiệt độ 20°C. Gạn dịch chiết vào bình định mức 50 mL, tráng lại phần cặn bằng dung môi chiết mẫu và định mức vừa đủ đến vạch, lắc đều. Sau đó, hút chính xác 5,0 mL dịch chiết trên vào bình định mức 20 mL, định mức vừa đủ đến vạch bằng dung môi chiết mẫu tương ứng, lắc đều. Lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45 μ m vào lọ mẫu và phân tích sắc ký.

2.4.3. Thẩm định phương pháp phân tích

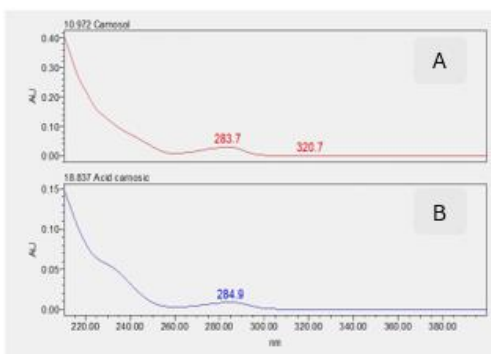
Đánh giá thẩm định phương pháp thông qua các thông số sau: độ phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu sử dụng mẫu trắng là hỗn hợp dung môi chiết mẫu, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định theo tỷ lệ S/N, xây dựng đường chuẩn, độ chụm của phương pháp (độ lặp lại và độ chụm trung gian), độ đúng của phương pháp (độ thu hồi) được tiến hành trên nền mẫu bột lá hương thảo.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu hoá điều kiện sắc ký

3.1.1. Khảo sát lựa chọn bước sóng phát hiện

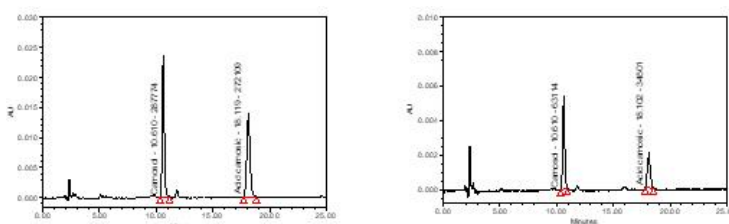
Tiến hành quét phổ UV-Vis của CA và CAR trong mẫu chuẩn hỗn hợp ở dải bước sóng 210 – 400 nm để xác định bước sóng thích hợp phát hiện hai chất. Dựa vào phổ UV-Vis thu được khi phân tích sắc ký mẫu chuẩn hỗn hợp (Hình 2), nhận thấy rằng bước sóng có cực đại hấp thụ của carnosol là 284 nm và của acid carnosic là 285 nm, tuy nhiên độ hấp thụ của cả 2 chất lại cao hơn tại bước sóng 230 nm. Từ kết quả sắc ký đồ tại các bước sóng khác nhau (Hình 3), tín hiệu thu được ở bước sóng 230 nm cao hơn so với 284 nm nên 2 chất phân tích chính sẽ ít chịu ảnh hưởng của nhiễu đường nền. Do đó, bước sóng phát hiện 230 nm có độ hấp thụ tốt, giúp thuận tiện lấy sắc ký đồ trong quá trình phân tích, đủ nhạy để phát hiện và định lượng ngay cả khi trong mẫu thử 2 chất này có hàm lượng nhỏ. Do đó, lựa chọn 230 nm là bước sóng phát hiện đồng thời acid carnosic và carnosol.



Hình 2. Phổ hấp thụ của carnosol và acid carnosic theo bước sóng

A. Carnosol

B. Acid carnosic

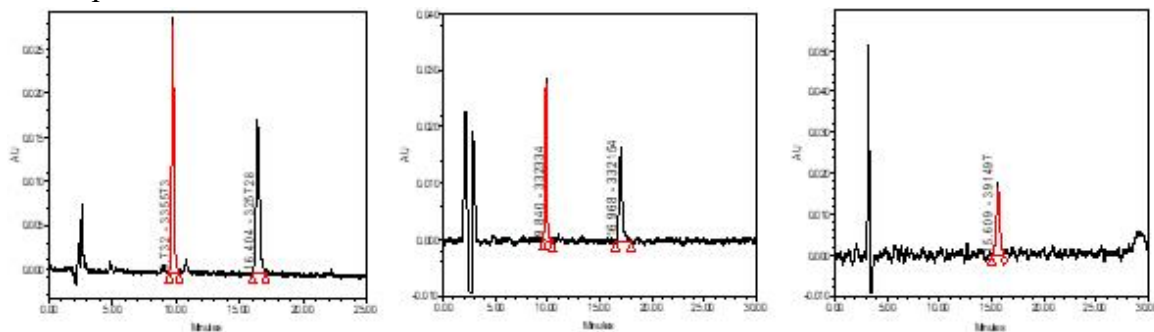


Hình 3. Sắc ký đồ khảo sát bước sóng phát hiện trên mẫu chuẩn hỗn hợp

3.1.2. Khảo sát lựa chọn thành phần pha động

Khảo sát 3 loại pha động: (1) dung môi pha mẫu trắng (xác định mức độ ổn định của đường nền); (2) dung dịch chuẩn đơn CA, CAR (xác định vị trí của mỗi chất dựa vào thời gian lưu, phổ hấp thụ) và (3) dung dịch chuẩn hỗn hợp (xác định khả năng tách, hình dáng pic của 2 chất phân tích).

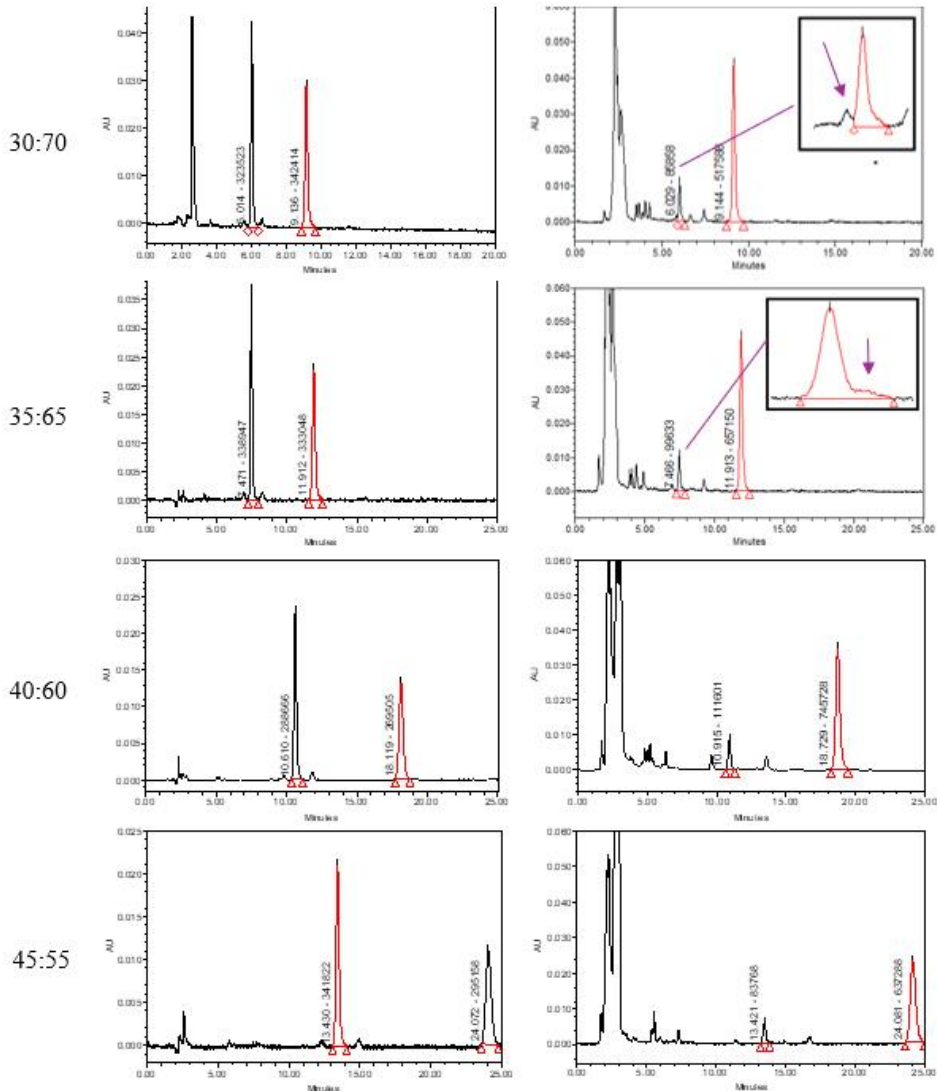
Qua các sắc ký đồ (CAR rửa giải ra sớm hơn CA) nhận thấy khi phân tích pha động (3) cho kết quả nền nhiễu cao, tín hiệu thu được thấp hơn so với 2 pha động còn lại, pha động (3) cũng chứa thành phần methanol có độ nhớt cao hơn acetonitrile, làm tăng lực cản khi pha động phân tích qua cột sắc ký, dẫn đến áp suất máy tăng cao, khó ổn định. Với pha động (1) và (2), nhận thấy rằng cả 2 chất cần phân tích đều cho ra pic gọn đẹp, cân xứng, thời gian lưu tương tự nhau, kết quả phân tích pha động (1) cho đường nền phẳng, ít nhiễu hơn. Dựa theo tài liệu tham khảo, pha động (1) là acid phosphoric 0,1% - acetonitrile (40:60, v/v) được lựa chọn [11]. Sắc ký đồ khảo sát lựa chọn thành phần pha động trên mẫu chuẩn hỗn hợp được đưa ra tại Hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ khảo sát lựa chọn thành phần pha động trên mẫu chuẩn hỗn hợp

3.1.3. Khảo sát lựa chọn tỉ lệ giữa các thành phần trong pha động

Lựa chọn tỉ lệ thể tích các thành phần trong pha động để thu được sắc ký đồ phù hợp nhất. Ở tỉ lệ 30:70 và 35:65 (Hình 5), kết quả sắc ký đồ trên mẫu chuẩn hỗn hợp cho thấy các pic tạp bên cạnh đã tách ra khỏi pic CAR (pic rửa giải sớm hơn), tuy nhiên trên nền mẫu thử pic CAR bị xen phủ với các pic tạp xung quanh (30:70, v/v) và bị kéo đuôi (35:65, v/v). Ở tỉ lệ 45:55, thời gian phân tích quá dài khiến doãng chân pic. Vì vậy, tỉ lệ 40:60 là phù hợp hơn cả để pic hoạt chất chính có thể tách hoàn toàn khỏi pic tạp, độ phân giải tốt và thời gian phân tích không quá dài. Do đó, lựa chọn pha động acid phosphoric 0,1% - acetonitrile tỉ lệ 40:60 (v/v).



Hình 5. Sắc ký đồ các mẫu khảo sát tỉ lệ pha động

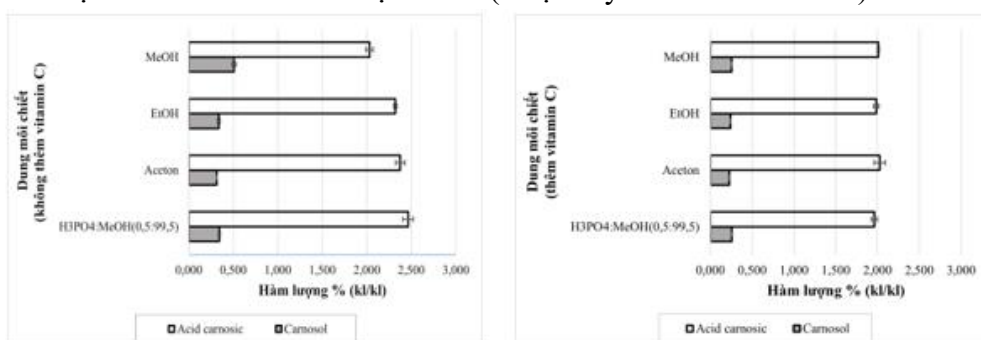
3.2. Tối ưu hoá quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát lựa chọn dung môi chiết mẫu

Với khảo sát dung môi chiết mẫu không thêm chất chống oxy hoá, hàm lượng CA, CAR và tổng hàm lượng 2 chất chiết được có sự khác nhau đối với 4 loại dung môi khảo sát.

Nhận thấy chiết mẫu bằng $H_3PO_4:MeOH$ (0,5:99,5, v/v) cho hàm lượng CA và tổng hàm lượng 2 chất cao nhất, còn khi chiết mẫu bằng MeOH thì hàm lượng CAR cao nhất. Tuy nhiên, với dung môi chiết là MeOH, nhận thấy có sự oxy hoá chuyển đổi CA thành CAR (Hình 6a). Các nghiên cứu trước đây cũng đã mô tả điều này và gợi ý việc sử dụng thêm chất chống oxy hoá khi chiết để bảo vệ 2 chất, ngăn quá trình biến đổi diễn ra [12]. Vì vậy, khảo sát này được lặp lại với sự có mặt của vitamin C (Hình 6b).

Với khảo sát dung môi chiết mẫu có thêm chất chống oxy hoá (vitamin C), nhận thấy hàm lượng CA, CAR và tổng hàm lượng 2 chất không có sự khác biệt lớn đối với 4 loại dung môi khảo sát. Đặc biệt với dung môi chiết là MeOH, CA không còn bị oxy hoá thành CAR, quan sát thấy ở tỉ lệ CA và CAR giữ nguyên như các dung môi còn lại (Hình 6b). Tuy nhiên, theo khảo sát này nhận thấy hiệu suất chiết của cả 2 chất bị giảm nhiều so với dung môi không thêm vitamin C. Vì vậy, quay lại với khảo sát ban đầu khi không có mặt vitamin C, $H_3PO_4:MeOH$ (0,5:99,5, v/v) được lựa chọn làm dung môi chiết mẫu vì tổng hàm lượng 2 chất chiết được cao nhất và CA ổn định nhất (ít bị chuyển đổi thành CAR).

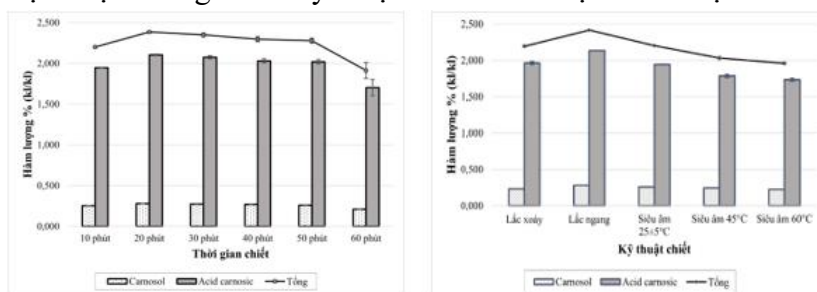


a) Không thêm chất chống oxy hoá b) Có thêm chất chống oxy hoá (vitamin C)

Hình 6. Kết quả khảo sát lựa chọn dung môi chiết mẫu

3.2.2. Khảo sát lựa chọn thời gian chiết mẫu

Qua kết quả thể hiện ở Hình 5a, từ thời gian 10 phút đến 20 phút, hàm lượng 2 chất chiết được có sự tăng lên, điều đó có thể khẳng định rằng nếu chỉ chiết trong 10 phút thì các hoạt chất trong bột lá hương thảo chưa được hoà tan hoàn toàn ra trong dung môi. Từ 20 phút trở về sau, hàm lượng chất chiết được bắt đầu giảm dần vì CA và CAR là các chất không bền, dễ bị oxy hoá. Đến 60 phút, hàm lượng cả 2 chất có sự giảm mạnh trong dung môi chiết. Do đó, lựa chọn thời gian chiết mẫu 20 phút để tiến hành các khảo sát tiếp theo. Kết quả khảo sát lựa chọn thời gian và kỹ thuật chiết mẫu được đưa ra tại Hình 7.



a) Kết quả khảo sát thời gian chiết mẫu b) Kết quả khảo sát kỹ thuật chiết mẫu

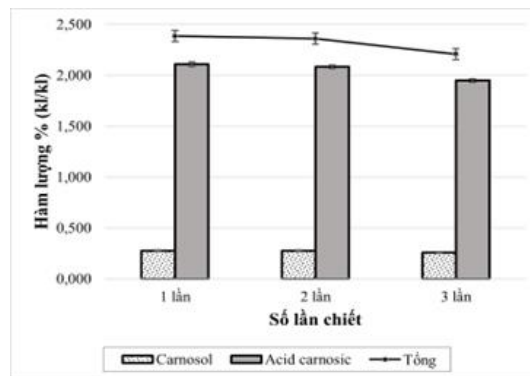
Hình 7. Kết quả khảo sát thời gian và kỹ thuật chiết mẫu

3.2.3. Khảo sát lựa chọn kỹ thuật chiết mẫu

Kỹ thuật chiết mẫu khảo sát: lắc ngang và siêu âm (nhiệt độ phòng, 45°C, 60°C) dựa theo kết quả khảo sát thời gian chiết mẫu (20 phút); lắc xoáy 1 phút. Từ kết quả khảo sát (Hình 7b), nhận thấy chiết với phương pháp lắc ngang cho kết quả cao nhất về hàm lượng CA, CAR và tổng hàm lượng 2 chất chiết được từ bột lá hương thảo. Kỹ thuật chiết lắc ngang tối ưu hơn các kỹ thuật lắc xoáy do có thể thực hiện đồng thời với số lượng mẫu thử lớn, lực lắc tác động nhẹ nhàng nên chất phân tích bền hơn, đảm bảo trộn đồng đều nên sẽ chiết được tối đa lượng chất phân tích. Bên cạnh đó, chiết siêu âm dễ làm tăng nhiệt độ do năng lượng sóng siêu âm tạo nhiệt, làm chất phân tích không ổn định. Do đó, lựa chọn kỹ thuật chiết lắc ngang để tiến hành khảo sát tiếp theo.

3.2.4. Khảo sát lựa chọn số lần chiết mẫu

Số lần chiết mẫu khảo sát: chiết 1 lần, chiết 2 lần, chiết 3 lần. Từ kết quả thể hiện tại Hình 6 cho thấy hàm lượng CA, CAR và tổng hàm lượng 2 chất chiết được từ bột lá hương thảo không có sự khác biệt giữa 1 lần và 2 lần chiết. Đồng thời, quy trình chiết 3 lần hàm lượng 2 chất giảm dần do chúng không bền, bị oxy hoá. Do đó, lựa chọn chiết 1 lần để tối ưu hoá quy trình và tiết kiệm thời gian chiết, đảm bảo sự ổn định của 2 chất phân tích. Vì vậy, lựa chọn số lần chiết mẫu là 1 lần. Kết quả khảo sát lựa chọn số lần chiết mẫu được đưa ra tại Hình 8.



Hình 8. Kết quả khảo sát lựa chọn số lần chiết mẫu

3.2.5. Khảo sát khối lượng cân mẫu

Bột lá hương thảo là thực phẩm có nguồn gốc thực vật, việc cân một lượng bột đủ lớn là rất quan trọng để đảm bảo sự đồng nhất mẫu. Điều này giúp giảm thiểu sai số do sự phân bố không đồng đều của các thành phần trong mẫu bột, từ đó cải thiện độ chính xác và độ tin cậy của kết quả phân tích. Theo quy trình đã xây dựng, nhóm nghiên cứu từ ban đầu dự kiến lượng cân mẫu bột lá hương thảo là 0,5 g.

Nhằm mục tiêu tối ưu hoá quy trình xử lý mẫu và tiết kiệm dung môi, thời gian, khối lượng mẫu được khảo sát trong khoảng 0,12 – 0,13 g mà không có bước pha loãng dịch chiết 4 lần ở cuối quy trình.

Qua kết quả khảo sát, trong cùng một khối lượng cân mẫu (0,5 g hoặc 0,12 g), hàm lượng CA và CAR chiết được có độ lệch chuẩn tương đối RSD < 2% cho 6 lần phân tích, giá trị hàm lượng trung bình ở 2 cách cân cho kết quả tương tự nhau. Đồng thời, sử dụng Test thống kê cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng CA và CAR chiết được với 2

cách cân trên. Do đó, để tối ưu hoá quy trình, giảm sai số (do bước pha loãng), tiết kiệm lượng mẫu và dung môi hoá chất, lựa chọn khối lượng cân bột lá hương thảo là khoảng 0,12 - 0,13 g. Bên cạnh đó, do hàm lượng CA và CAR trong bột lá hương thảo có sự chênh lệch lớn nên lượng cân mẫu khoảng 0,12 gam là hợp lý để dịch chiết phân tích sắc ký có nồng độ CA không quá lớn và nồng độ CAR không quá nhỏ. Vì vậy, lựa chọn khối lượng cân mẫu bột lá hương thảo là 0,12 – 0,13 g.

3.2.6. Khảo sát độ ổn định của acid carnosic và carnosol trong lọ mẫu theo thời gian

Khảo sát được thực hiện bằng cách tiêm sắc ký lặp lại dung dịch chuẩn đơn CA 20 µg/mL và dung dịch chuẩn đơn CAR 20 µg/mL theo các mốc thời gian khảo sát trong vòng 18 giờ: mới pha, sau 1 giờ, sau 2 giờ, sau 4 giờ, sau 8 giờ, sau 12 giờ, sau 16 giờ, sau 18 giờ. Từ kết quả thu được trên sắc ký đồ mẫu chuẩn đơn, nhận thấy cả 2 chất đều ổn định trong dung môi pha mẫu H₃PO₄ - MeOH (0,5:99,5, v/v) mà không cần cho thêm chất chống oxy hoá để bảo vệ chúng (thể hiện qua độ lệch chuẩn tương đối RSD% của diện tích pic CA và CAR là 1,6% và 0,7% sau các mốc thời gian phân tích). Do đó, sau khi chuẩn bị và xử lý mẫu, dịch chiết trong lọ mẫu vẫn giữ được sự ổn định của 2 hoạt chất chiết được trong vòng 18 giờ, thuận lợi cho việc phân tích đồng thời nhiều mẫu thử trong ngày. Ngoài ra, tiến hành pha dãy đường chuẩn trong dung môi H₃PO₄ - MeOH (0,5:99,5, v/v) để đảm bảo sự ổn định nồng độ CA và CAR trong mẫu chuẩn hỗn hợp.

3.3. Thẩm định phương pháp phân tích

3.3.1. Độ phù hợp hệ thống

Độ phù hợp hệ thống được đánh giá thông qua việc phân tích lặp lại 6 lần liên tiếp mẫu chuẩn hỗn hợp CA và CAR 100 µg/mL. Dựa trên sắc ký đồ, thời gian lưu, diện tích pic đáp ứng của 2 hoạt chất cần phân tích qua 6 lần phân tích sắc ký, kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu là 0,1% (CA), 0,2% (CAR) và của diện tích pic là 1,0% (CA), 1,1% (CAR), các thông số đều đạt yêu cầu thấp hơn 2,0%. Các pic cân đối, có hệ số đối xứng trong khoảng 1,16 – 1,20. Số đĩa lý thuyết lớn. Do đó, phương pháp đạt yêu cầu về độ phù hợp hệ thống.

3.3.2. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích mẫu trắng (dung môi pha mẫu), mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu chuẩn hỗn hợp CA và CAR. Kết quả chỉ ra mẫu trắng không cho tín hiệu chất phân tích, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn cho tín hiệu chất phân tích tại cùng thời gian lưu. Phổ của CA và CAR trên sắc ký đồ mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn trùng với phổ của CA và CAR trên sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp. Các pic CA và CAR trên sắc ký đồ mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu chuẩn đều đạt độ tinh khiết sắc ký. Do đó, phương pháp có độ đặc hiệu tốt.

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

LOD và LOQ của phương pháp được đánh giá thông qua việc tiến hành phân tích các mẫu chuẩn hỗn hợp CA và CAR với nồng độ giảm dần còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích. Ghi lại sắc ký đồ và xác định tỷ lệ S/N (S là tín hiệu của chất phân tích, N là tín hiệu nhiễu đường nền). LOD và LOQ lần lượt được chấp nhận ở nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 2 – 3 lần và 10 – 20 lần nhiễu đường nền. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định LOD và LOQ của phương pháp

Chất phân tích	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Acid carnosic	0,3 (S/N = 3,1)	1 (S/N = 10,8)
Carnosol	0,25 (S/N = 3,0)	0,75 (S/N = 10,7)

3.3.4. Đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng với nồng độ thay đổi từ 2,5 $\mu\text{g/mL}$ đến 200 $\mu\text{g/mL}$ đối với cả 2 chất bằng cách khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu diện tích pic vào nồng độ. Kết quả xây dựng đường chuẩn qua Bảng 2 cho thấy hệ số tương quan đạt yêu cầu $0,995 \leq R$ độ chệch của các điểm trên đường chuẩn sau khi xây dựng đường chuẩn thấp hơn $\pm 15\%$. Do đó, phương pháp có độ tuyến tính đạt yêu cầu khi xây dựng đường chuẩn.

Bảng 2. Kết quả xây dựng đường chuẩn

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan (R)	Độ chệch (%)
Acid carnosic	$y = 14128.x - 15715$	1,0000	-3,8 – 11,2
Carnosol	$y = 14813.x - 15179$	0,9999	-5,1 – 11,1

3.3.5. Độ lặp lại và độ chụm trung gian

Thẩm định độ chụm của phương pháp gồm độ lặp lại và độ chụm trung gian. Độ lặp lại được đánh giá thông qua việc phân tích sắc ký 6 mẫu thử chuẩn bị độc lập theo quy trình phân tích đã xây dựng. Độ chụm trung gian được đánh giá tương tự nhưng phân tích sắc ký 6 mẫu thử được thực hiện bởi kiểm nghiệm viên khác trong một ngày khác so với khi làm 6 mẫu thử thẩm định độ lặp lại. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chụm trung gian được thể hiện trong Bảng 3 đạt yêu cầu của AOAC. Do đó, phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chụm trung gian.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ chụm và độ đúng

Chất phân tích	Độ lặp lại (RSD%)	Độ chụm trung gian (RSD%)	Độ thu hồi (R%)	Độ không đảm bảo đo (U%)
Acid carnosic	1,4	2,8	98,8 – 100,6	5,71
Carnosol	1,1	2,1	97,5 – 102,2	6,86

3.3.6. Độ đúng

Độ đúng được đánh giá thông qua việc phân tích các mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ là 50%, 100%, 150% so với nồng độ mẫu thử đã chuẩn bị theo quy trình xây dựng. Kết quả đánh giá độ đúng (độ thu hồi) được thể hiện trong Bảng 3 đạt yêu cầu theo AOAC, cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

3.4. Phân tích đồng thời acid carnosic và carnosol trên một số mẫu thực tế

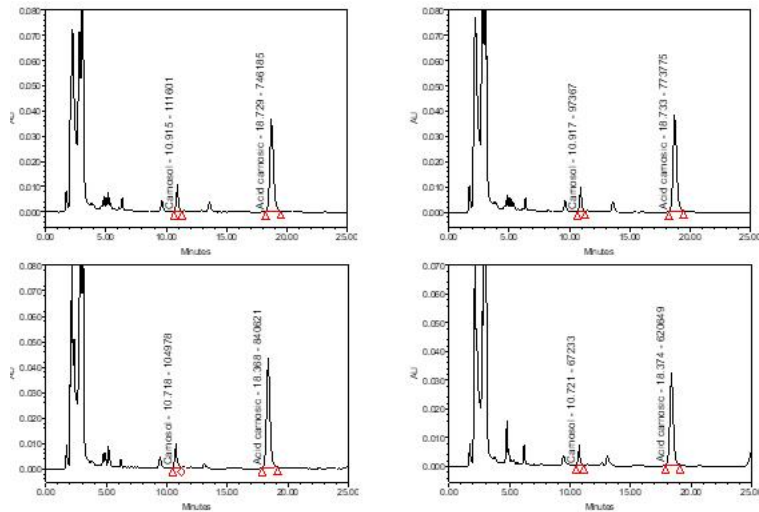
Áp dụng phương pháp đã xây dựng để xác định hàm lượng CA, CAR và tổng hàm lượng 2 chất trong 20 mẫu thực phẩm thu thập trên thị trường, mỗi mẫu tiến hành phân tích lặp lại 2 lần độc lập và tính giá trị hàm lượng trung bình. Kết quả thu được như ở Bảng 4 và Hình 9.

Qua kết quả phân tích 20 mẫu thực phẩm thu thập trên thị trường, hàm lượng CA dao động trong khoảng 2,070 – 3,933% với bột lá hương thảo, 1,788 – 2,452% với lá hương thảo khô và 1,788 – 2,452% với trà thảo mộc hương thảo. Hàm lượng CAR cũng có sự khác biệt trong khoảng 0,299 – 0,579% với bột lá hương thảo, 0,221 – 0,330% với lá hương thảo khô và 0,293 – 0,310% với trà thảo mộc hương thảo. Tổng hàm lượng CA và CAR cao nhất trong mẫu bột lá hương thảo M8 và thấp nhất trong mẫu bột gia vị ướp thịt hương thảo.

Từ các kết quả trên cho thấy, hàm lượng CA và CAR có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác nhau như yếu tố di truyền của từng giống cây hương thảo, yếu tố môi trường (khí hậu, nước, độ mặn, ánh sáng...), độ tuổi của cây khi thu hoạch. Bên cạnh đó, các yếu tố liên quan đến điều kiện sấy khô, bảo quản cũng có thể ảnh hưởng đến hàm lượng chất chống oxy hóa CA và CAR trong lá hương thảo. Một phương pháp định lượng nhanh chóng, tiết kiệm và đáng tin cậy là cần thiết trong quá tối ưu hóa quy trình trồng trọt và thu hoạch, góp phần nâng cao chất lượng của cây hương thảo. Điều này có ý nghĩa quan trọng đối với các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm, nơi các hợp chất chống oxy hóa này có thể được sử dụng rộng rãi trong tương lai. Kết quả phân tích một số mẫu thực tế được đưa ra tại Bảng 4 và một số sắc đồ minh họa phân tích mẫu thực tế được đưa ra tại Hình 9.

Bảng 4. Kết quả phân tích một số mẫu thực tế

STT	Loại mẫu	Mã mẫu	Hàm lượng acid carnosic (% <i>, w/w</i>)	Hàm lượng carnosol (% <i>, w/w</i>)	Tổng hàm lượng acid carnosic và carnosol (% <i>, w/w</i>)
1	Bột lá hương thảo	M1	2,083	0,334	2,417
2		M2	2,208	0,299	2,507
3		M3	2,309	0,325	2,635
4		M4	2,322	0,318	2,640
5		M5	2,310	0,322	2,632
6		M6	2,095	0,339	2,435
7		M7	2,244	0,308	2,552
8		M8	3,933	0,597	4,530
9		M9	2,070	0,315	2,385
10	Lá hương thảo khô	L1	1,788	0,221	2,009
11		L2	2,403	0,324	2,727
12		L3	2,241	0,307	2,548
13		L4	2,452	0,328	2,780
14		L5	2,408	0,330	2,738
15		L6	2,140	0,308	2,448
16	Trà thảo mộc hương thảo	T1	2,267	0,303	2,570
17		T2	2,118	0,293	2,411
18		T3	2,287	0,308	2,595
19		T4	2,214	0,310	2,524
20	Bột gia vị ướp thịt hương thảo	G1	0,321	0,134	0,455



Hình 9. Một số sắc đồ phân tích mẫu thực

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp xác định đồng thời hàm lượng acid carnosic và carnosol trong thực phẩm chứa lá hương thảo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector chuỗi diod quang (HPLC-PDA). Ưu điểm của phương pháp là quy trình xử lý mẫu nhanh chóng, đơn giản, tiết kiệm. 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 20 mẫu thực phẩm thu thập trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. G. Nieto, R. Gaspar, and C. Julián, "Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review," *Medicines (Basel)*, vol. 5, no. 3, pp. 98, 2018.
- [2]. O. I. Aruoma, B. Halliwell, et al., "Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid," *Xenobiotica*, vol. 22, no.2, pp. 257-268, 1992.
- [3]. M. Loussouarn, et al., "Carnosic acid and carnosol, two major antioxidants of rosemary, act through different mechanisms," *Plant physiology*, vol. 175, no.3, pp. 1381-1394, 2017.
- [4]. S. Birtić, et al., "Carnosic acid," *Phytochemistry*, vol. 11, pp 9-19, 2015.
- [5]. M. J. Jordán, et al., "Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, no.38, pp. 9603-9608, 2012.
- [6]. C. Mantzourani, P. A. Tarantilis, and M. G. Kokotou, "Carnosic Acid and Carnosol: Analytical Methods for Their Determination in Plants, Foods and Biological Samples," *Separations*, vol. 10 no. 9, pp 481, 2023.

- [7]. S. Habtemariam, "Anti-inflammatory therapeutic mechanisms of natural products: Insight from rosemary diterpenes, carnosic acid and carnosol," *Biomedicines*, vol. 11, no. 2, pp. 545, 2023.
- [8]. S. M. Petiwala, J. J. Johnson, "Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity," *Cancer letters*, vol. 367, no. 2, pp. 93-102, 2015.
- [9]. W. Yeddes, et al., "Optimizing ethanol extraction of rosemary leaves and their biological evaluations," *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 85-94, 2022.
- [10]. X. Zhong, et al., "Chemical characterization of the polar antibacterial fraction of the ethanol extract from *Rosmarinus officinalis*," *Food Chemistry*, vol. 344, pp. 128674, 2021.
- [11]. N. Okamura, et al., "High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*," *Journal of Chromatography A*, vol. 679, no. 2, pp. 381-386, 1994.
- [12]. S-H. Choi, et al., "Development and validation of an analytical method for carnosol, carnosic acid and rosmarinic acid in food matrices and evaluation of the antioxidant activity of rosemary extract as a food additive," *Antioxidants*, vol. 8, no. 3, pp. 76, 2019.
- [13]. P. Li, et al., "Development and validation of an analytical method based on HPLC-ELSD for the simultaneous determination of rosmarinic acid, carnosol, carnosic acid, oleanolic acid and ursolic acid in rosemary," *Molecules*, vol. 24, no. 2, pp. 323, 2019.
- [14]. C. Paloukopoulou, and K. Anastasia, "A Validated Method for the Determination of Carnosic Acid and Carnosol in the Fresh Foliage of *Salvia rosmarinus* and *Salvia officinalis* from Greece," *Plants*, vol. 11, no. 22, pp. 3106, 2022.