

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI 4-HYDROXYDERRICIN VÀ XANTHOANGELOL TRONG THỰC PHẨM CHỨC NĂNG BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Văn Sỹ[✉], Lê Hồng Dũng

Viện Dinh dưỡng, Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thẩm định phương pháp xác định đồng thời 4-hydroxyderricin và xanthoangelol trong thực phẩm chức năng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector mảng diod.

Phương pháp: 4-hydroxyderricin và xanthoangelol được chiết ra khỏi nền mẫu bằng cách siêu âm trong hỗn hợp methanol/nước (8/2) trong 30 phút và được tách bằng cột sắc ký pha đảo C18, pha động gồm methanol và nước. Tốc độ dòng là 1mL/phút, bước sóng của detector được cài đặt 370 nm.

Kết quả: Khoảng tuyến tính của 4-hydroxyderricin từ 4,7 – 235 µg/ml và xanthoangelol từ 5,35 – 267,5 µg/ml với hệ số tương quan $R \geq 0,9996$. Giới hạn định lượng của 4-hydroxyderricin và xanthoangelol tương ứng là 0,24 mg/g và 0,35 mg/g. Phương pháp có độ thu hồi nằm trong khoảng từ 95,7 – 100,7%, với hệ số biến thiên (CV%) từ 2,9 – 4,6%.

Kết luận: Các thông số thẩm định của phương pháp đạt yêu cầu theo AOAC. Đây là phương pháp đơn giản, đáng tin cậy và có thể sử dụng để nghiên cứu và kiểm soát hàm lượng 4-hydroxyderricin và xanthoangelol trong thực phẩm chức năng.

Từ khóa: 4-hydroxyderricin và xanthoangelol, thực phẩm chức năng, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF 4-HYDROXYDERRICIN VÀ XANTHOANGELOL IN FUNCTION FOOD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Aims: To validate a method to determine of 4-hydroxyderricin và xanthoangelol concentration in functional food by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector.

Methods: 4-hydroxyderricin and xanthoangelol were extracted by sonication in methanol 80% in water for 30 min and separated by a reversed phase C18 column using a mobile phase including methanol and water. The flow rate was set to 1.0 ml.min⁻¹ and the PDA detector was performed at 370 nm. \

Results: The validated method proved to be linear in the range of 4.7 – 235 µg.ml⁻¹ for 4-hydroxyderricin and 5.35 – 267.5 µg.ml⁻¹ for xanthoangelol with R was 0.9999, respectively. The quantification limit of 4-hydroxyderricin and xanthoangelol were 0.24 mg/g and 0.35 mg/g, respectively. The recovery of 4-hydroxyderricin và xanthoangelol was within the range of 95.7 – 100.7%, with the coefficient of variation (CV%) of 2.9 - 4.6%.

✉ Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Sỹ
Email: nguyenvansy.ninvn@gmail.com
Doi: 10.56283/1859-0381/805.

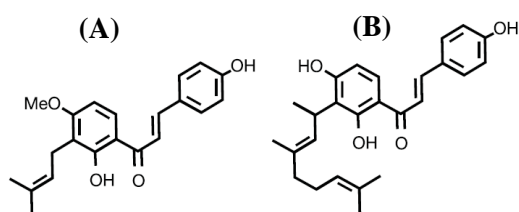
Nhận bài: 5/10/2024 Chỉnh sửa: 4/11/2024
Chấp nhận đăng: 5/11/2024
Công bố online: 6/11/2024

Conclusion: The validated parameters have met the requirement of Association of Official Analytical Collaboration (AOAC). This reliable method would be useful for the study and quality control of 4-hydroxyderricin và xanthoangelol in functional food.

Keywords: 4-hydroxyderricin và xanthoangelol, health supplement, high performance liquid chromatography.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

4-hydroxyderricin và xanthoangelol là hai hợp chất quan trọng nhất thuộc nhóm chalcone, một nhóm các hợp chất polyphenol đặc biệt được tìm thấy trong cây *Ashitaba* từ Nhật Bản. *Ashitaba* là tên gọi của một loại cây thảo, có tên khoa học là *Angelica keiskei*, thuộc họ Hoa tán (Umbelliferae) hay còn gọi là họ Cà rốt (Apiaceae). Tên gọi của cây được ghép từ chữ “*Ashita*” = ngày mai, và “*ba*” = lá, nghĩa là “lá của ngày mai”. Đây là một loại cây sống tự nhiên ở đảo Izu và bán đảo Izu, Bouso và Miura (nay thuộc phủ Tokyo) của Nhật Bản. Từ lâu, dân trên đảo đã dùng lá cây này làm thực phẩm ăn hàng ngày như một loại rau hay cho vào súp. Thân cây *Ashitaba* khi cắt ngang sẽ chảy ra một chất sáp màu vàng, chỉ tìm thấy duy nhất ở cây *Ashitaba* và không có trong các cây khác cùng họ. Trong sáp màu vàng này có rất nhiều hợp chất polyphenol và được gọi là chalcones, trong đó nhiều nhất là 4-hydroxyderricin và xanthoangelol [1].



Hình 1. Công thức cấu tạo của 4-hydroxyderricin (A) và xanthoangelol (B)

Theo nghiên cứu của Linsay K [2], có 22 loại polyphenol thuộc nhóm chalcone được phát hiện từ cây *Ashitaba* trong đó hàm lượng cao nhất thuộc về 2 chất 4-hydroxyderricin và xanthoangelol, vì vậy hai chất này được quan tâm nhiều hơn cả trong các nghiên cứu thực nghiệm về tác dụng đối với sức khỏe.

Nhiều nghiên cứu đã được công bố về tác dụng sinh lý có lợi của chalcone [2, 3], bao gồm khả năng kháng khuẩn, kháng khối u [4, 5], chống viêm dạ dày, hoạt tính chống huyết khối [6]. Gần đây, các nghiên cứu ở Nhật Bản và một số nước khác quan tâm hơn đến khả năng làm giảm mỡ nội tạng và tác dụng tốt đối với hội chứng rối loạn chuyển hóa lipid. Cơ chế hoạt động của chalcone được cho là tăng sản xuất adiponectin - một loại protein hormone vai trò thúc đẩy sự điều hòa glucose và oxy hóa acid béo, có khả năng làm giảm mỡ trong nội tạng [7].

Hiện nay, các nghiên cứu về hợp chất chalcone, 4-hydroxyderricin và xanthoangelol là khá mới, vì vậy chưa có nhiều nghiên cứu về phân tích được công bố. Phương pháp HPLC được ứng dụng trong một nghiên cứu để xác định chalcone từ các bộ phận của cây *Ashitaba*. Mẫu sau khi chiết được tách qua cột C18, sử dụng hỗn hợp methanol, nước và acid formic, sau đó được định lượng ở bước sóng 370 nm [8]. Phương pháp sắc ký phân bố ngược dòng tốc độ cao để tách 4-hydroxyderricin và xanthoangelol từ nguyên liệu cây

Angelica keiskei của Hàn Quốc, trong đó dùng 2 hệ dung môi gồm *n*-hexane–EtOAc–MeOH–H₂O (9:5:9:4) [9], đây là phương pháp khá phức tạp, sử dụng nhiều loại dung môi khác nhau. Một kỹ thuật nữa cũng đã được sử dụng để tách và định lượng chalcone là phương pháp sắc ký lỏng khối phổ [10] sử dụng phương pháp HPLC-ESI-MS/MS để tách và xác định 16 chất khác nhau từ các bộ phận của cây *Ashitaba*, dựa vào khối phổ và kỹ thuật cộng hưởng từ hạt nhân. Kỹ thuật này chủ yếu được dùng để nghiên cứu sâu về các thành phần trong cây *Angelica keiskei*.

Từ các nghiên cứu đã công bố cho thấy, phương pháp phân tích phù hợp để định lượng 4-hydroxyderricin và xanthoangelol trong nguyên liệu và sản phẩm chức năng là dùng sắc ký lỏng với detector PDA. Với detector PDA, khoảng bước sóng xác định là rất rộng, từ 200 nm đến 1100 nm, vì vậy có khả năng xác định nhiều hợp chất có hấp thụ tử ngoại, khả kiến. Ngoài ra, detector PDA còn có chức năng quét phổ hấp thụ để khẳng định độ tinh khiết pic sắc ký, đối chiếu với chất chuẩn và khẳng định sự có mặt của hoạt chất trong mẫu. Bột *Ashitaba* chalcone

được sử dụng làm nguyên liệu chính để sản xuất các sản phẩm bổ sung dinh dưỡng, thực phẩm chức năng. Hiện nay trên thị trường có các loại sản phẩm như dạng bột uống, dạng chè (*Ashitaba* tea), dạng viên các loại chứa bột chalcone một mình hoặc kết hợp với các nguyên liệu khác. Trung tâm Y tế Makise Nhật Bản là đơn vị hàng đầu nghiên cứu về các sản phẩm từ cây *Ashitaba* và có sản phẩm *Ashitaba* Chalcone Japonica. Hiện trung tâm này đang hợp tác với Viện Dinh dưỡng, chuyển giao nguyên liệu *Ashitaba* chalcone và Viện Dinh dưỡng đã nghiên cứu sản xuất sản phẩm NINFOOD Chalcone hỗ trợ chuyển hóa lipid. Ngoài các sản phẩm từ Nhật Bản, sản phẩm từ chalcone còn có của các nước khác như Mỹ, Phillippines. Do vậy việc phát triển kỹ thuật xác định 4-hydroxyderricin và xanthoangelol trong các loại thực phẩm chức năng là rất cần thiết, không những hỗ trợ doanh nghiệp trong việc nghiên cứu và công bố chất lượng của sản phẩm mà còn là công cụ giúp cho các nhà quản lý kiểm soát tốt chất lượng của các sản phẩm này nhằm bảo vệ quyền lợi và sức khỏe của người tiêu dùng.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu và thực phẩm chức năng có nguồn gốc *Ashitaba*. Mẫu placebo là mẫu không chứa chất phân tích, gồm các

thành phần vitamin C, vitamin E, *b*-caroten, vitamin D, lactose khan, magie stearate, talc.

2.2. Hóa chất và thiết bị

2.2.1. Hóa chất

Chất chuẩn: Chuẩn 4-hydroxyderricin hàm lượng 97,54% và xanthoangelol hàm lượng 98,50% được cung cấp bởi Japan Bio Science Laboratory Co., Ltd.

Các hóa chất methanol, nước sử dụng loại tinh khiết phân tích.

Pha dung dịch chuẩn và bảo quản ở -20°C đến khi dùng. Dung dịch chuẩn gốc: Với mỗi chất 4-hydroxyderricin và

xanthoangelol, tiến hành cân chính xác khoảng 20,0 mg chất chuẩn vào từng bình đựng mức 20 ml, hòa tan và định mức vừa đủ bằng MeOH/H₂O (8/2). Dung dịch chuẩn làm việc: từ dung dịch chuẩn gốc, pha dãy chuẩn hỗn hợp có nồng độ các chất từ khoảng 2 đến 250 (µg/ml) bằng hỗn hợp MeOH/H₂O (8/2).

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ

Máy HPLC Alliance 2960 với detector PDA của hãng Waters, Mỹ. Cân phân tích ME 204T/00 của hãng Mettler Toledo, máy siêu âm S120H của hãng Elma, máy lắc vortex VM-10 của hãng

Daihan, máy siêu âm 3R của hãng Hettich. Các loại dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm như: bình định mức, bình tam giác, pipet tự động, ống ly tâm 50ml...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Quy trình xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu được tham khảo theo quy trình của Yali và cs [11] như sau: Mẫu được đông nhất kỹ trước khi phân tích. Cân chính xác khoảng 0,1 – 0,2 g mẫu vào bình tam giác 50 ml. Sau đó thêm khoảng 20 ml hỗn hợp MeOH/H₂O

(8/2), tiến hành lắc đều, siêu âm 30 phút. Lọc qua giấy lọc vào bình định mức 25 ml và định mức tới vạch bằng hỗn hợp MeOH/H₂O (8/2). Dịch chiết được lắc đều và lọc qua màng 0,45 μm vào lọ đựng mẫu rồi bơm vào hệ thống HPLC.

2.3.2. Điều kiện sắc ký

Cột HC C18 (4,6 x 100 mm, 5 μm) và tiền cột. Nhiệt độ buồng cột: 35⁰C. Pha động: Methanol 80 % trong nước.

Detector: PDA ở bước sóng 370 nm. Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Thể tích tiêm: 10 μl.

2.4. Thẩm định phương pháp

Các thông số thẩm định thực hiện theo hướng dẫn của AOAC 2016 [12], gồm:

Độ đặc hiệu: Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng detector PDA do vậy độ đặc hiệu được xác định bằng cách so sánh phổ và thời gian lưu của dung dịch chuẩn với mẫu placebo và mẫu thử có chứa 4-hydroxyderricin và xanthoangelol.

Khoảng tuyến tính: Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn xanthoangelol và 4-hydroxyderricin có nồng độ tăng dần. Tiến hành bơm vào hệ thống HPLC để xác định tín hiệu đo của chất phân tích. Xây dựng mối quan hệ phụ thuộc giữa tín hiệu đo và nồng độ của chất phân tích.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Pha một dãy chuẩn xanthoangelol và 4-hydroxyderricin

trong khoảng làm việc của phương pháp (chẳng hạn từ 10 ng/ml đến 1000 ng/ml). Tiến hành xác định dãy chuẩn trên HPLC và xác định diện tích peak chuẩn. Xác định đường hồi quy tương quan giữa nồng độ và diện tích peak ($y = bx + a$), sau đó xác định LOD và LOQ theo công thức sau: $LOD = 3,3 * SD/b$; $LOQ = 10 * SD/b$

Trong đó a và b là intercept và hệ số góc của đường chuẩn, SD là độ lệch chuẩn trung bình của SD y/x - độ lệch chuẩn của diện tích peak lý thuyết theo đường chuẩn (y_i) so với thực tế (y_i'), và Sa là độ lệch chuẩn của hệ số intercept (a) lý thuyết theo đường chuẩn so với thực tế; xi là nồng độ tính được theo đường chuẩn và xtb là nồng độ trung bình; n là số điểm chuẩn.

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{và}$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Độ chụm: Thể hiện qua việc đánh giá độ lặp lại thực hiện ở 3 mức nồng độ (mỗi mức thực hiện lặp lại 7 lần). Tính độ lặp

lại RSD% của phép đo với các khoảng nồng độ trên.

Độ đúng: Thể hiện qua việc đánh giá độ thu hồi và được thực hiện ở 3 mức hàm lượng thường có trong mẫu thử, tương ứng với mức LOQ; 1,5xLOQ; 2xLOQ (mỗi mức thực hiện

2.5. Xử lý và đánh giá số liệu

Sử dụng phần mềm đi kèm theo thiết bị HPLC để thu được các sắc ký đồ, diện tích pic, thời gian lưu. Sử dụng phần mềm Excel để xây dựng khoảng tuyến tính,

lặp lại 7 lần). Xác định % giữa hàm lượng 4-hydroxyderricin và xanthoangelol trong mẫu thêm chuẩn theo thực nghiệm và nồng độ chuẩn thêm vào theo lý thuyết.

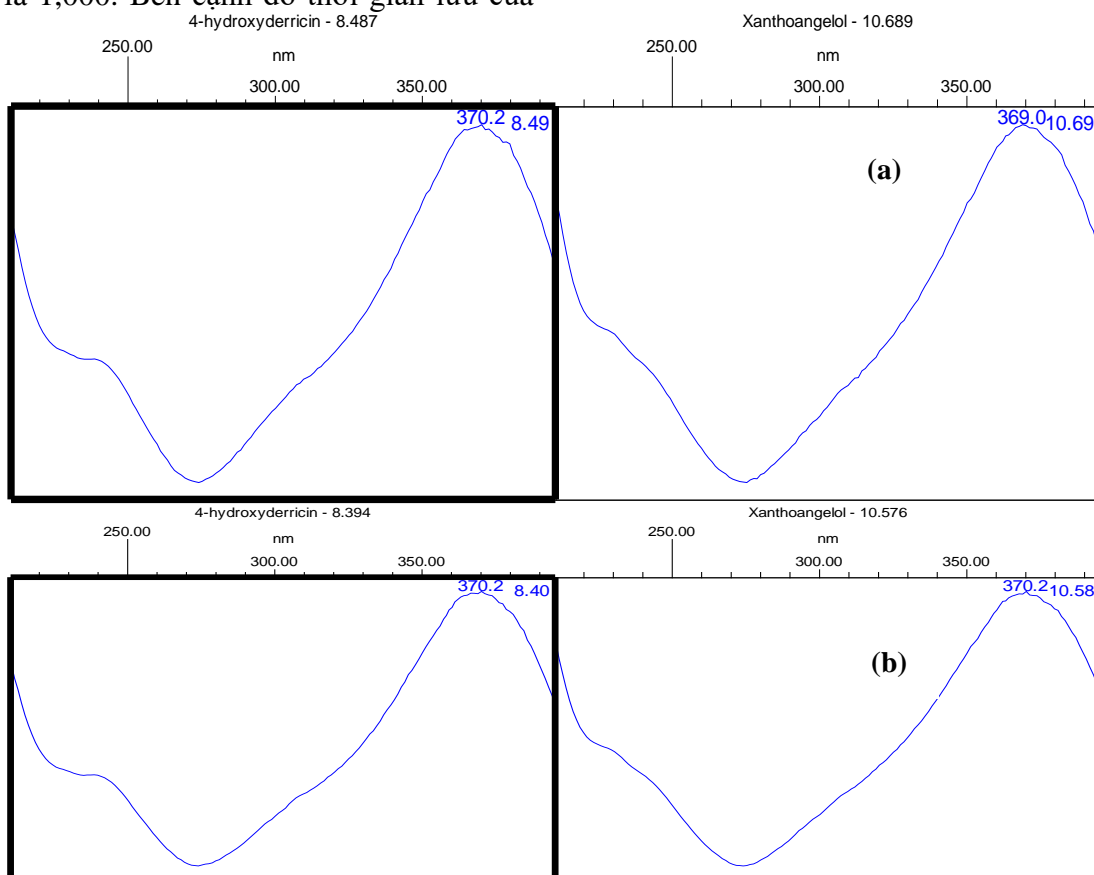
tính tỉ lệ thu hồi, độ lệch chuẩn. Kết quả các thông số thẩm định phương pháp được đánh giá dựa theo tiêu chuẩn AOAC 2016 [12].

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

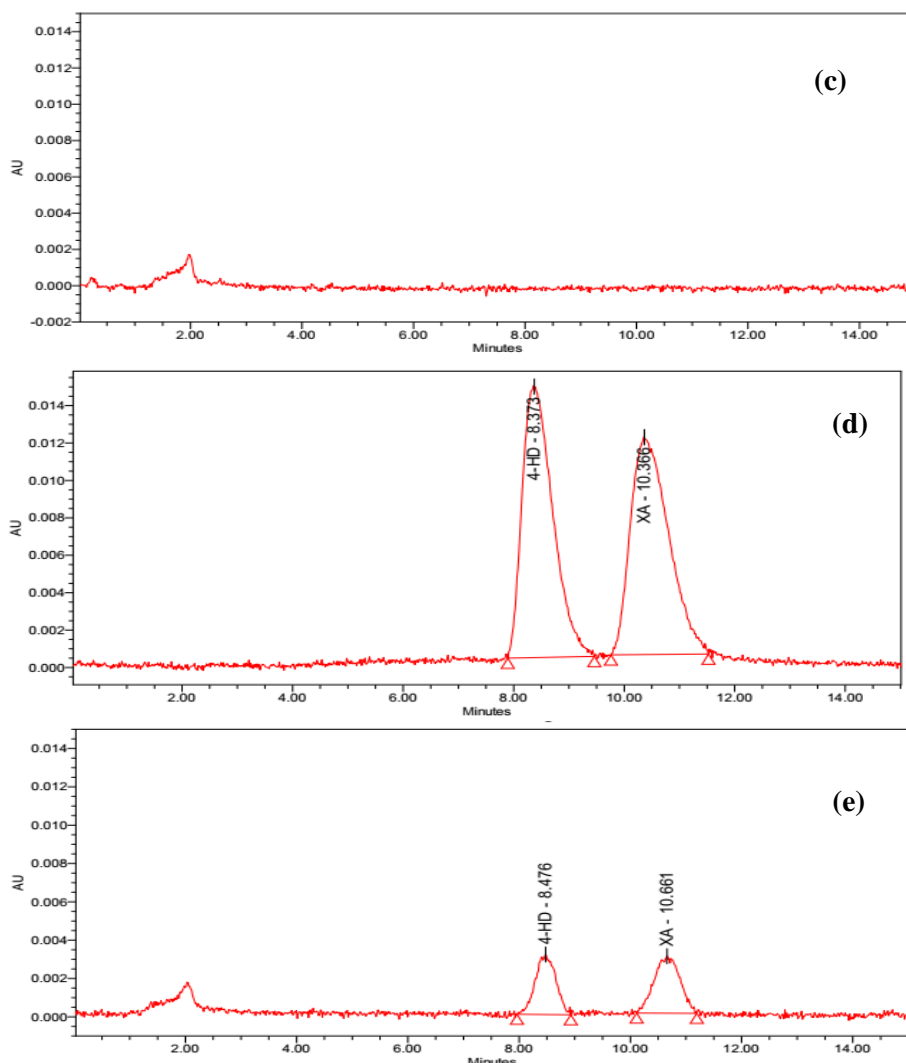
3.1. Độ đặc hiệu

Kết quả phân tích cho thấy dung dịch chuẩn 4-hydroxyderricin và xanthoangelol và mẫu thêm chuẩn đều có đỉnh 370 nm (hình 2), hệ số tinh khiết của pic trong dung dịch chuẩn và mẫu thử đều là 1,000. Bên cạnh đó thời gian lưu của

chất phân tích trong mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tương tự nhau, với giá trị RSD <1% (hình 3), và mẫu placebo không xuất hiện pic chất phân tích do vậy phương pháp có độ đặc hiệu tốt.



Hình 2. Phổ PDA của dung dịch chuẩn 4-hydroxyderricin và xanthoangelol (a) và mẫu thêm chuẩn (b)

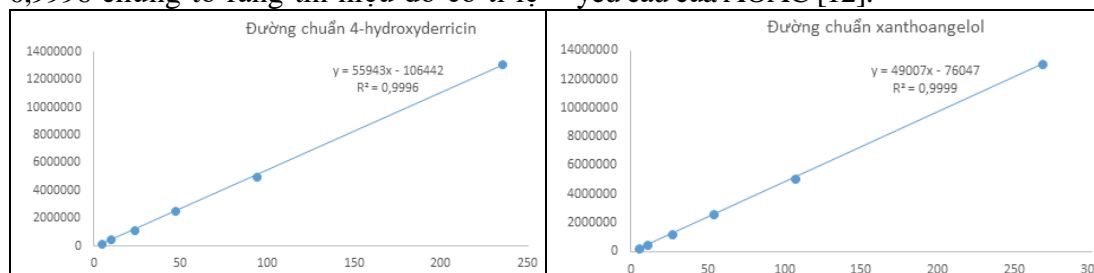


Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu placebo (c), dung dịch chuẩn 4-hydroxyderricin và xanthoangelol (d) và mẫu thêm chuẩn 4-hydroxyderricin và xanthoangelol (e)

3.2. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính của 4-hydroxyderricin từ 4,7–235 $\mu\text{g/ml}$ và xanthoangelol từ 5,35 – 267,5 $\mu\text{g/ml}$ với hệ số tương quan $R \geq 0,9996$ chứng tỏ rằng tín hiệu đo có tỉ lệ

tốt với nồng độ của chất phân tích (hình 4). Bên cạnh đó độ chệch tại các điểm nồng độ của đường chuẩn đều nhỏ hơn 15%, đạt yêu cầu của AOAC [12].



Hình 4. Đồ thị khoảng tuyến tính của 4-hydroxyderricin và xanthoangelol

3.3. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp phân tích xanthoangelol và 4-hydroxyderricin được xác định theo phương pháp đã mô tả ở Mục 2.4, trong đó dựa vào các số liệu của đường chuẩn hồi quy giữa diện tích pic và

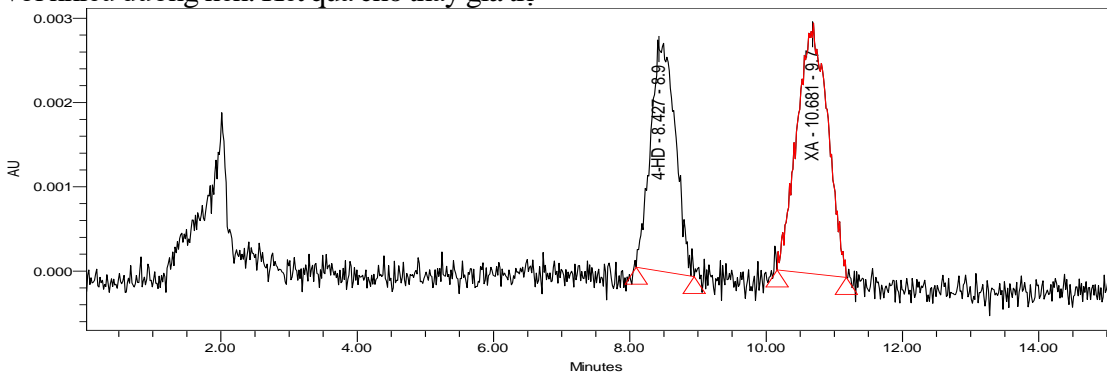
nồng độ chất phân tích. Kết quả giới hạn phát hiện trên thiết bị đối với xanthoangelol và 4-hydroxyderricin tương ứng là 0,65 µg/ml và 0,93 µg/ml. Từ quy trình phân tích và tính toán độ pha loãng, xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp như sau:

Bảng 1. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện (mg/g)	Giới hạn định lượng (mg/g)
4-hydroxyderricin	0,08	0,24
xanthoangelol	0,12	0,35

Sau khi xác định được giá trị LOQ lý thuyết của hai chất, tiến hành thêm chuẩn mức tương đương LOQ của hỗn hợp hai chất vào nền mẫu placebo và đánh giá tín hiệu so với nhiễu đường nền. Kết quả cho thấy giá trị

S/N của cả 2 chất phân tích nằm trong khoảng từ 8-10 (Hình 5). Vì vậy các kết quả xác định LOQ của hai chất theo phương pháp đã khảo sát là phù hợp.



Hình 5. Sắc ký đồ chuẩn xanthoangelol và 4-hydroxyderricin thêm chuẩn mức LOQ

3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Để xác định độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp, tiến hành thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ tương ứng với mức giới hạn định lượng LOQ, 1,5 LOQ và 2 lần LOQ vào 0,2 g nền mẫu placebo đã xác định không chứa xanthoangelol và 4-hydroxyderricin.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, độ lặp lại của phương pháp xác định 4-hydroxyderricin và xanthoangelol ở 3 mức nồng độ có giá trị CV nằm trong khoảng từ 2,9 đến 4,6 %, và độ thu hồi từ 95,7 đến 100,7%. Đối chiếu với quy định của AOAC thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong giới hạn cho phép [12].

Bảng 2. Độ lặp lại và độ đúng của 4-hydroxyderricin và xanthoangelol

Mức nồng độ	xanthoangelol		4-hydroxyderricin	
	Độ lặp lại, CV (%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại, CV (%)	Độ đúng (%)
Tại mức nồng độ LOQ	4,6	100,4	2,9	100,7
Tại mức nồng độ 1,5 x LOQ	3,8	96,8	3,3	95,7
Tại mức nồng độ 2 x LOQ	4,1	99,5	3,4	99,8

IV. KẾT LUẬN

Phương pháp xác định 4-hydroxyderricin và xanthoangelol trong thực phẩm chức năng bằng sắc ký lỏng cao áp với detector PDA đã được thẩm định đầy đủ các thông số gồm độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định

lượng, độ lặp lại, độ thu hồi. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt và đạt yêu cầu theo quy định của AOAC. Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện có thể triển khai rộng rãi tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam có thiết bị HPLC.

Tài liệu tham khảo

1. Yasuda M, Kawabata K, Miyashita M, et al. Inhibitory effects of 4-hydroxyderricin and xanthoangelol on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264 macrophages. *J Agric Food Chem*. 2014;62(2):462-467.
2. Lindsay K Caesar, Nadja B Cech. A Review of the Medicinal Uses and Pharmacology of Ashitaba. *Planta Medica*.2016;82(14).
3. Zsuzsanna Rozmer, Pa'1 Perje'si. Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemical Review*.2016;15(1):87–120.
4. Shanmei Xu, Minxiao Chen, Wenbo Chen, Junguo Hui, Jiansong Ji, Shuping Hu, Jianmin Zhou, Yi Wang and Guang Liang. Chemopreventive effect of chalcone derivative, L2H17, in colon cancer development. *BioMed Central Cancer*.2015;15:870.
5. Ewelina Szliszka, Dagmara Jaworska, Małgorzata Klósek, Zenon P. Czuba and Wojciech Kró. Targeting Death Receptor TRAIL-R2 by Chalcones for TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*.2012; 13:15343-15359.
6. Hee Ryun Chang, Hwa Jin Lee, and Jae-Ha Ryu. Chalcones from *Angelica keiskei* attenuate the Inflammatory Responses by Suppressing Nuclear Translocation of NF- κ B. *Journal of Medicinal Food*.2014;17(12): 1306–1313.
7. Nagata J, Morino T, Saito M. Effects of dietary *Angelica keiskei* on serum and liver lipid profiles, and body fat accumulations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*.2017; 53(2):133-7.
8. Li Yali, Luo Yulan, Liu Jianhua, et al. Determination of 4-Hydroxyderricin and Xanthoangelol in Different Parts of *Angelica keiskei* by HPLC-PDA. *Journal of Food Science*.2016;37(6):142-145.
9. Kil YS, Nam JW, Lee J, Seo EK. Separation of two major chalcones from *Angelica keiskei* by high-speed counter-current chromatography. *Archives of Pharmacal Research*.2015;38(8):1506-11.
10. Dae Wook Kim, Marcus J. Curtis-Long, Heung Joo Yuk, Yan Wang, Yeong Hun Song, Seong Hun Jeong, Ki Hun Park. Quantitative analysis of phenolic metabolites from different parts of *Angelica keiskei* by HPLC–ESI MS/MS and their xanthine oxidase inhibition. *Food Chemistry*. 2014;153:20–27.
11. Li Yali, Luo Yulan, Liu Jianhua, et al. Determination of 4-Hydroxyderricin and Xanthoangelol in Different Parts of *Angelica keiskei* by HPLC-PDA. *Journal of Food Science*.2016;37(6):142-145.
12. AOAC Official Method Analysis. Appendix F. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016, Appendix F, p.2.