

Nghiên cứu

DOI: 10.59715/pntjimp.3.3.16

Xây dựng quy trình định lượng delphinidin chlorid từ cao khô *Vaccinium angustifolium*

Ngô Lê Thảo Dung¹, Nguyễn Dân Phúc², Nguyễn Mạnh Huy³

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh

²Bộ môn Dược lý - Dược lâm sàng, Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh

³Bộ môn Bào chế - Sinh dược học, Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Đặt vấn đề: *Vaccinium angustifolium* (việt quất bụi thấp), thuộc họ Đỗ quyên (Ericaceae) là loại quả mọng có nguồn gốc từ Bắc Mỹ, có thành phần chính là anthocyanin - một loại flavonoid có nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hóa, chống ung thư và kháng viêm. Delphinidin là hoạt chất thuộc nhóm anthocyanin có nhiều trong các loại quả mọng như dâu, việt quất, nho... Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát và xây dựng quy trình định lượng delphinidin chlorid trong *V. angustifolium* bằng phương pháp HPLC-PDA.

Đối tượng - phương pháp: Chuẩn delphinidin chlorid $\geq 98,0\%$ HPLC (Xian Plant Bio - Engineering Co., Ltd), cao khô *Vaccinium angustifolium* (Changsha Vigorous-tech Co., Ltd). Các điều kiện sắc ký được khảo sát bao gồm hệ pha động (5% acid formic trong nước - acetonitrile chế độ gradient), thể tích tiêm ở 10 μ L, tốc độ dòng ở 1,0 mL/phút và nhiệt độ cột 25°C. Các điều kiện chiết được khảo sát bao gồm tỉ lệ dung môi chiết (methanol:HCl) với 4 tỉ lệ là 6:4, 7:3, 8:2, 9:1; thời gian thủy phân ở 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút và 150 phút; tốc độ ly tâm 6.000 vòng/phút, 10.000 vòng/phút và 12.000 vòng/phút.

Kết quả: Điều kiện chiết xuất tối ưu với tỉ lệ dung môi methanol:HCl là 9:1, thời gian thủy phân là 150 phút và tốc độ ly tâm 6.000 vòng/phút. Quy trình phân tích được thẩm định và đạt theo quy định của AOAC.

Kết luận: Quy trình chiết và định lượng delphinidin chlorid trong cao khô *V. angustifolium* bằng HPLC-PDA đã được xây dựng thành công.

Từ khóa: Anthocyanin, cao khô, delphinidin chlorid, HPLC-PDA, *Vaccinium angustifolium*.

Abstract

Developing a method of quantifying delphinidin chloride in dry extract from *Vaccinium angustifolium*

Introduction: *Vaccinium angustifolium* (Ericaceae) is a low-growing shrub native to North America, and its main ingredient is anthocyanin. Anthocyanin is a polyphenolic compound belonging to the flavonoid class. It has many health-related benefits, such as antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory effects. Delphinidin is a polyphenolic compound that belongs to the anthocyanin class. It occurs in a variety of berries, including blueberries, strawberries, and grapes. This study surveyed and developed a method for quantifying delphinidin chloride in dry extract from *V. angustifolium* via HPLC-PDA.

Ngày nhận bài:

20/5/2024

Ngày phân biện:

20/6/2024

Ngày đăng bài:

20/7/2024

Tác giả liên hệ:

Ngô Lê Thảo Dung

Email: 1952010005@

pnt.edu.vn

ĐT: 0932656884

Materials and methods: Delphinidin chloride standard ($\geq 98,0\%$ HPLC, Xian Plant Bio - Engineering Co., Ltd) and *V. angustifolium* dry extract (Changsha Vigorous-tech Co., Ltd.) were used. Chromatographic conditions were a mobile phase (5% aqueous formic acid - acetonitrile gradient), an injection volume of 10 μL with a flow rate of 1.0 mL/min, and a column temperature of 25°C. The extraction conditions were four extraction solvent ratios (methanol:HCl): 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1; hydrolysis times of 30, 60, 90, 120, and 150 minutes; and centrifugal speeds of 6,000, 10,000, and 12,000 rpm.

Results: The optimum conditions for extracting delphinidin chloride were a solvent ratio of 9:1 (methanol:HCl), a hydrolysis time of 150 minutes, and a centrifugal speed of 6,000 rpm. The analytical process was found valid according to AOAC criteria.

Conclusion: The procedure for extracting and quantifying delphinidin chloride in *V. angustifolium* dry extract using HPLC-PDA was successfully developed.

Keywords: Anthocyanin, delphinidin chlorid, dry extract, HPLC-PDA, *Vaccinium angustifolium*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vaccinium angustifolium (việt quất bụi thấp) là loại quả mọng có nguồn gốc từ Bắc Mỹ [1], có thành phần chính là anthocyanin - một loại flavonoid có nhiều tác dụng sinh học trong việc bảo vệ sức khỏe con người. Delphinidin là hoạt chất thuộc nhóm anthocyanin có nhiều trong

các loại quả mọng như dâu, việt quất, nho [2], đặc biệt có nhiều trong cây *V. angustifolium*. Delphinidin có khả năng chống oxy hóa, chống ung thư và kháng viêm [3]. Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát và xây dựng quy trình định lượng delphinidin chlorid trong cao khô *V. angustifolium* bằng phương pháp HPLC.

II. ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thiết bị chính dùng trong nghiên cứu

Máy móc, trang thiết bị		
Loại thiết bị	Model	Nhà sản xuất
Máy đo thể tích chân chuột	Plethysmometer/37140	Ugo Basile - Ý
Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA detector	Alliance e2695XE	Waters - Mỹ

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Chuẩn delphinidin chlorid $\geq 98,0\%$ HPLC (Xian Plant Bio - Engineering Co., Ltd). Cao khô *V. angustifolium* (Changsha Vigorous-tech Co., Ltd).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký

2.3.1.1. Khảo sát hệ pha động

Các pha động được khảo sát được trình bày trong Bảng 1 [4, 5].

Bảng 1. Danh mục các pha động được khảo sát

Hệ	Thành phần pha động (%)		Chế độ
	A	B	
1	5% acid formic trong nước	ACN	Gradient
2	2% TCA, 1% amoniacetat, 2% THF (pH 2,5)	MeOH	
3		ACN	

Dung dịch pha động 2% TCA, 1% amoniacetat, 2% THF (pH 2,5): Cân chính xác 2,5 g muối amoniacetat; 5 g TCA hòa tan vào khoảng 400 mL nước cất 2 lần; thêm nước vừa đủ 2,5 L và điều chỉnh đến pH 2,5 bằng dung dịch TCA 4%; thêm 50 mL THF; lọc qua màng lọc 0,45 μ m [5].

2.3.1.2. *Khảo sát thể tích tiêm*

Thể tích tiêm được khảo sát ở 10 μ L, 20 μ L và 50 μ L.

2.3.1.3. *Khảo sát nhiệt độ cột*

Nhiệt độ cột được khảo sát ở 25 $^{\circ}$ C và 40 $^{\circ}$ C.

2.3.2. *Khảo sát các điều kiện chiết*

2.3.2.1. *Khảo sát tỉ lệ dung môi chiết*

Hỗn hợp dung môi MeOH và HCl 2N được khảo sát ở các tỷ lệ sau: 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic có thời gian lưu tương tự với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Pic delphinidin chlorid trên sắc ký đồ mẫu thử có diện tích pic lớn nhất với các thông số sắc ký đạt trong khoảng yêu cầu.

2.3.2.2. *Khảo sát thời gian thủy phân*

Tiến hành khảo sát thời gian thủy phân ở 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic có thời gian lưu tương tự với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Pic delphinidin chlorid trên sắc ký đồ mẫu thử có diện tích pic lớn nhất với các thông số sắc ký đạt trong khoảng yêu cầu.

2.3.2.3. *Khảo sát tốc độ ly tâm*

Tiến hành khảo sát tốc độ ly tâm ở 6.000 vòng/phút, 10.000 vòng/phút, 12.000 vòng/phút. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic có thời gian lưu tương tự với thời gian lưu của pic chính trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Pic delphinidin chlorid trên sắc ký đồ mẫu thử có

diện tích pic lớn nhất với các thông số sắc ký đạt trong khoảng yêu cầu.

2.3.3. *Thẩm định quy trình phân tích*

Các tiêu chí được thẩm định bao gồm: tính tuyến tính, LOD, LOQ, tính đặc hiệu, trong thích hệ thống, độ đúng, độ lặp lại theo AOAC [6].

III. KẾT QUẢ

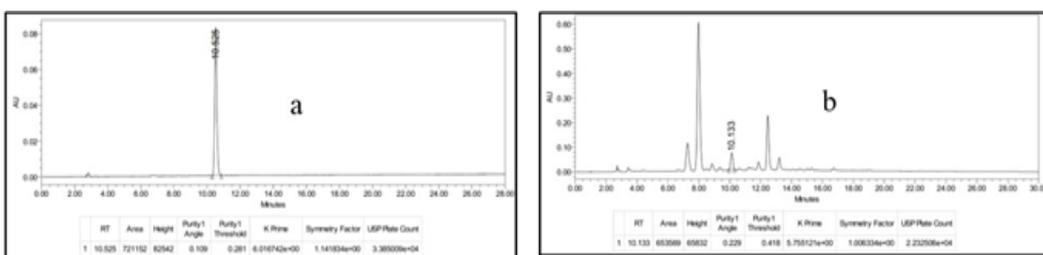
3.1. *Lựa chọn các điều kiện sắc ký*

3.1.1. *Khảo sát hệ pha động*

Đối với hệ pha động 1 là (A) 5% acid formic trong nước và (B) ACN với chương trình gradient được trình bày ở Bảng 2, delphinidin chlorid trong dung dịch chuẩn có thời gian lưu ở phút thứ 10. Khảo sát hệ pha động 1 bằng mẫu thử cho thấy pic delphinidin chlorid hoàn toàn tách khỏi các pic khác có trong mẫu thử với các thông số sắc ký nằm trong khoảng yêu cầu. Hệ 1 phù hợp để tách và rửa giải các anthocyanin. SKĐ của mẫu chuẩn và mẫu thử khảo sát hệ pha động 1 được thể hiện ở Hình 1.

Bảng 2. Chương trình gradient hệ pha động 1

Thời gian (phút)	Tỷ lệ pha động (%)	
	5% acid formic trong nước	ACN
0,1	90	10
2	90	10
10	80	20
15	75	25
20	70	30
25	65	35
27	90	10

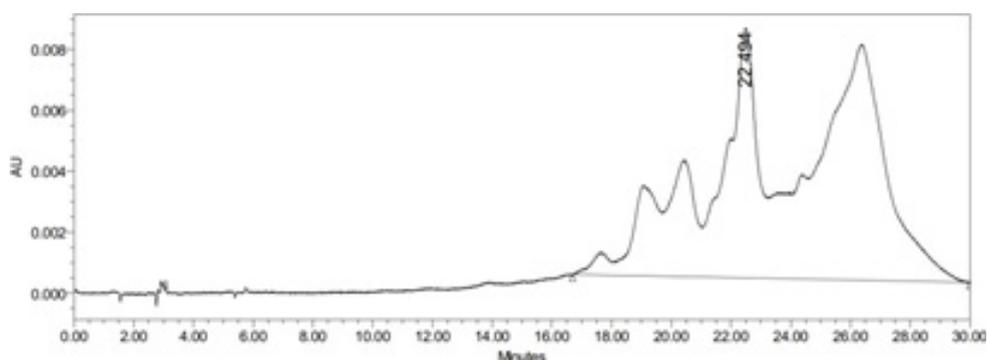


Hình 1. SKĐ của: (a) mẫu chuẩn và (b) mẫu thử được khảo sát bởi hệ pha động 1 với thể tích tiêm 10 μ L

Đối với hệ pha động 2 là (A) đệm amoniactat pH 2,5 và (B) MeOH với chương trình gradient được trình bày ở Bảng 3, phân tích trên mẫu thử cho thấy hệ 2 pha động này không tách được các anthocyanin (Hình 2).

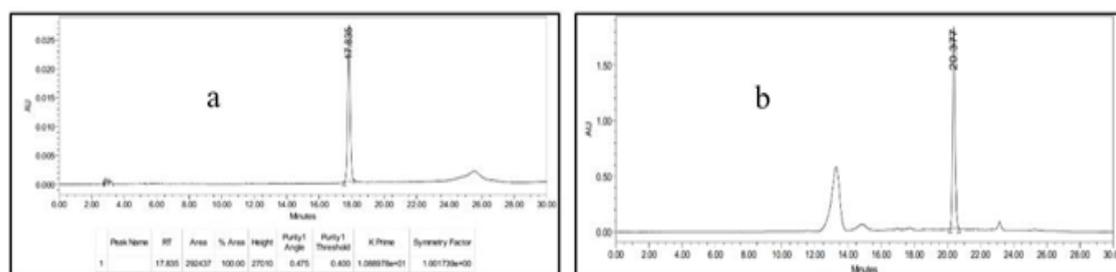
Bảng 3. Chương trình gradient hệ pha động 2 và 3

Thời gian (phút)	Tỷ lệ pha động (%)	
	2% TCA, 1% Amoniactat, 2% THF (pH 2,5)	ACN (hoặc MeOH)
0,1	90	10
2	90	10
22	70	30
23	70	30
26	90	10



Hình 2. SKĐ mẫu thử hệ pha động 2

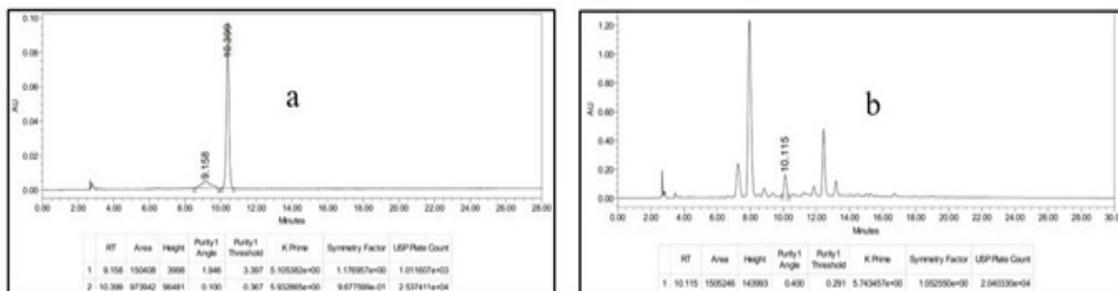
Đối với hệ pha động 3 là (A) đệm amoniactat pH 2,5 và (B) ACN với chương trình gradient được trình bày ở Bảng 3, phân tích trên mẫu chuẩn cho thấy pic delphinidin chlorid có thời gian lưu ở phút thứ 18 nhưng có hệ số tinh khiết chưa đạt yêu cầu. Khi phân tích trên mẫu thử không thấy có pic xuất hiện ở thời gian lưu ở phút thứ 18. Hệ 3 chưa rửa giải hoàn toàn các anthocyanin trong mẫu thử. SKĐ của mẫu chuẩn và mẫu thử khảo sát hệ pha động 3 được thể hiện ở Hình 3.



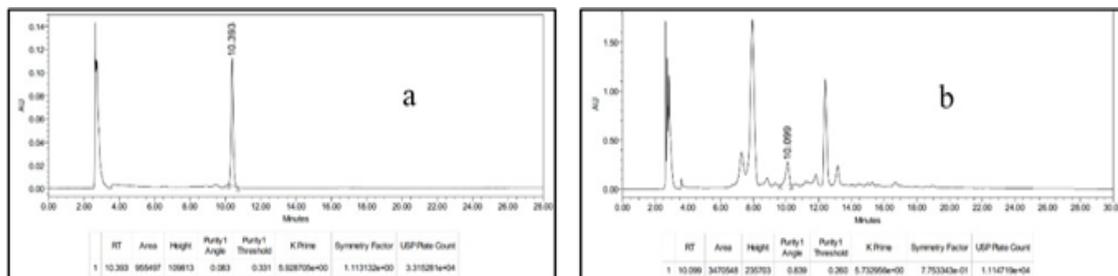
Hình 3. SKĐ của: (a) mẫu chuẩn và (b) mẫu thử được khảo sát bởi hệ pha động 3

3.1.2. Khảo sát thể tích tiêm

Ở 10 μ L, cả mẫu chuẩn và mẫu thử đều cho SKĐ phù hợp, pic đối xứng với các hệ số sắc ký nằm trong khoảng yêu cầu (Hình 1). Ở 20 μ L, pic chính của mẫu chuẩn bị doãng đầu với hệ SKĐ không phù hợp, SKĐ của mẫu thử phù hợp với pic đối xứng nhưng không đạt về hệ số tinh khiết (Hình 4). Ở 50 μ L, SKĐ của mẫu chuẩn không phù hợp, pic chính của mẫu thử bị kéo đuôi (Hình 5).



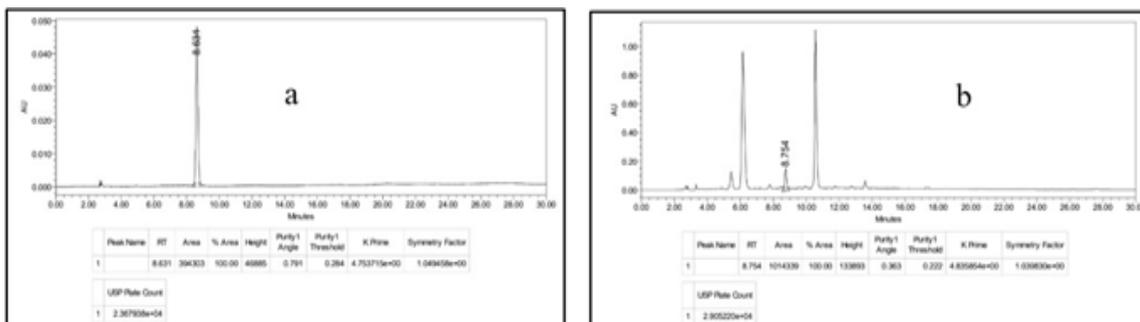
Hình 4. SKĐ của (a) mẫu chuẩn và (b) mẫu thử, thể tích tiêm 20 µL



Hình 5. SKĐ của (a) mẫu chuẩn và (b) mẫu thử, thể tích tiêm 50 µL

3.1.3. Khảo sát nhiệt độ cột

Ở 25°C, SKĐ của mẫu chuẩn và mẫu thử đều phù hợp với hệ số tinh khiết đạt yêu cầu (Hình 1). Ở 40°C, mẫu chuẩn và mẫu thử đều có hệ số tinh khiết không đạt trong khoảng cho phép (Hình 6).



Hình 6. SKĐ (a) mẫu chuẩn và (b) mẫu thử ở 40°C

3.1.4. Các điều kiện sắc ký tối ưu

Các điều kiện sắc ký sau khi được khảo sát được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Các điều kiện sắc ký sau khi được khảo sát

Thông số	
Pha tĩnh	Cột Phenomenex Gemini® 5 µm C18 110 Å (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Pha động	5% acid formic trong nước - ACN gradient
Tốc độ dòng	1,0 mL/phút
Thể tích tiêm mẫu	10 µL
Bước sóng	200 - 800 nm
Bước sóng phát hiện	520 nm
Nhiệt độ cột	25°C

3.2. Lựa chọn các điều kiện chiết

3.2.1. Khảo sát tỷ lệ dung môi chiết

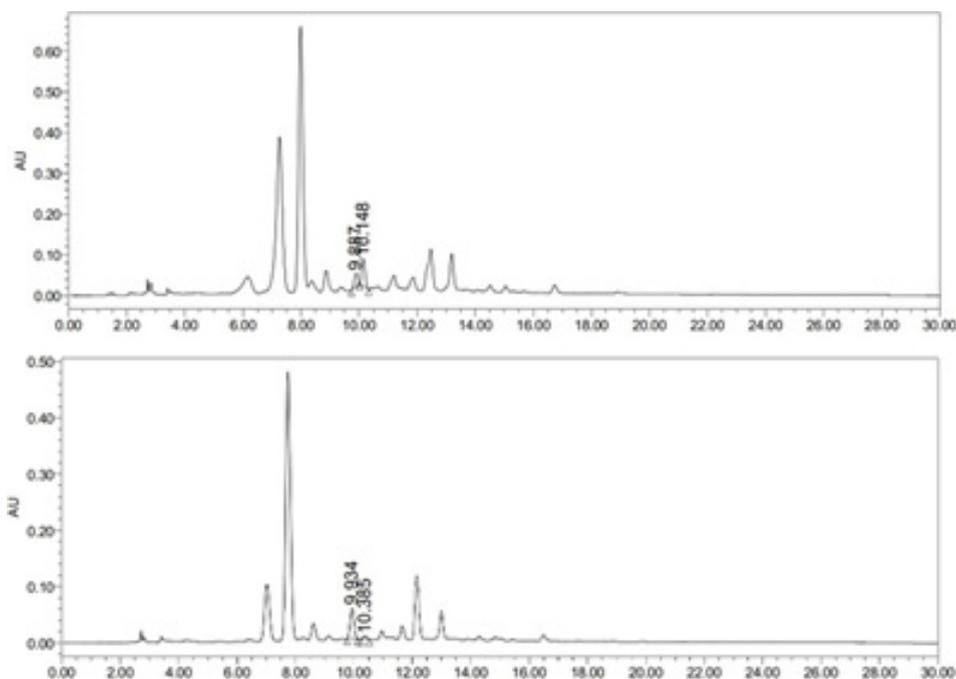
Kết quả hàm lượng delphinidin thu được trên cùng mẫu cao khô *V. angustifolium* khi chiết bằng các hỗn hợp dung môi tỷ lệ khác nhau được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả hàm lượng delphinidin thu được khi chiết cao khô *V. angustifolium* bằng hỗn hợp dung môi MeOH:HCl 2N ở các tỷ lệ khác nhau

Tỷ lệ	Khối lượng (g)	Diện tích ($\mu V \cdot sec$)	C ($\mu g/mL$)	C (mg/g)	C trung bình (mg/g)
6:4	0,1976	430.377	6,77	0,34	0,34
	0,1981	428.505	6,74	0,34	
	0,1958	407.233	6,41	0,33	
7:3	0,1976	346.742	5,45	0,28	0,35
	0,1989	489.945	7,71	0,39	
	0,1976	478.479	7,53	0,38	
8:2	0,1977	607.032	9,55	0,48	0,43
	0,1967	489.767	7,70	0,39	
	0,1968	518.937	8,16	0,41	
9:1	0,1967	729.068	11,47	0,58	0,57
	0,1976	788.441	12,40	0,63	
	0,1950	628.381	9,89	0,51	

3.2.2. Khảo sát thời gian thủy phân

Ở thời gian thủy phân là 30 phút delphinidin chưa hoàn toàn chuyển thành dạng chlorid (Hình 7). Kết quả hàm lượng delphinidin thu được trên cùng mẫu cao khô *V. angustifolium* với các thời gian thủy phân khác nhau được trình bày trong Bảng 6.



Hình 7. SKĐ mẫu thử với thời gian thủy phân 30 phút

Bảng 6. Kết quả hàm lượng delphinidin thu được ở các thời gian thủy phân khác nhau

Thời gian (phút)	Khối lượng (g)	Diện tích ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	C (mg/g)	C trung bình (mg/g)
60	0,1977	607.032	9,55	0,48	0,43
	0,1967	489.767	7,70	0,39	
	0,1968	518.937	8,16	0,41	
90	0,1981	488.684	7,69	0,39	0,36
	0,1977	395.032	6,21	0,31	
	0,1980	464.896	7,31	0,37	
120	0,1973	574.538	9,03	0,46	0,43
	0,1970	545.533	8,58	0,44	
	0,1965	502.725	7,91	0,40	
150	0,1972	832.875	13,10	0,66	0,70
	0,1968	824.759	12,97	0,66	
	0,1977	990.851	15,59	0,79	

3.2.3. Khảo sát tốc độ ly tâm

Kết quả hàm lượng delphinidin thu được trên cùng mẫu cao khô *V. angustifolium* với các tốc độ ly tâm khác nhau được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả hàm lượng delphinidin thu được ở các tốc độ ly tâm khác nhau

Tốc độ (vòng/phút)	Khối lượng (g)	Diện tích ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	C (mg/g)	C trung bình (mg/g)
6.000	0,1971	841.197	13,23	0,67	0,69
	0,1981	898.702	14,14	0,72	
	0,1974	870.275	13,69	0,69	
10.000	0,1977	607.032	9,55	0,48	0,43
	0,1967	489.767	7,70	0,39	
	0,1968	518.937	8,16	0,41	
12.000	0,1980	819.173	12,89	0,65	0,58
	0,1971	657.829	10,35	0,53	
	0,1973	716.400	11,27	0,57	

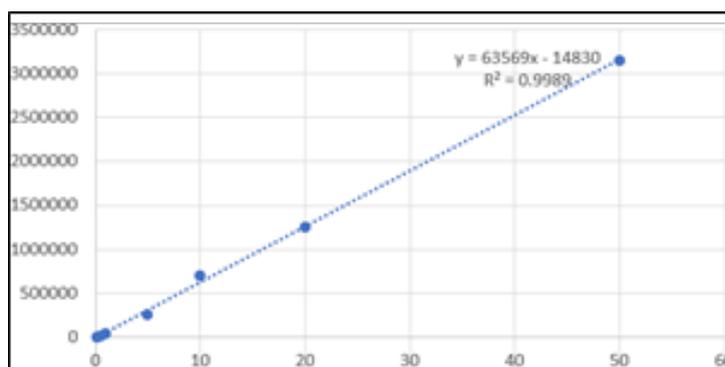
3.2.4. Quy trình chiết mẫu thử hoàn chỉnh

- Cân cao khô *V. angustifolium* vào ống eppendorf 2 mL.
- Thêm khoảng 2 mL hỗn hợp dung môi MeOH:HCl 2N (9:1) vào ống, lắc vortex khoảng 30 giây.
- Lắc siêu âm 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Thủy phân ở nhiệt độ 80°C trong 150 phút.
- Ly tâm 5 phút, tốc độ 6.000 vòng/phút.
- Gạn lấy phần dịch, định mức 10 mL bằng dung môi MeOH:HCl 2N (9:1) và lọc qua syringe 0,45 μm , tiêm vào hệ thống HPLC.

3.3. Thẩm định quy trình định lượng

3.3.1. Tính tuyến tính

Khoảng tuyến tính được xây dựng từ 8 điểm nồng độ: 0,1, 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20 và 50 $\mu\text{g/mL}$ được trình bày ở Hình 8.

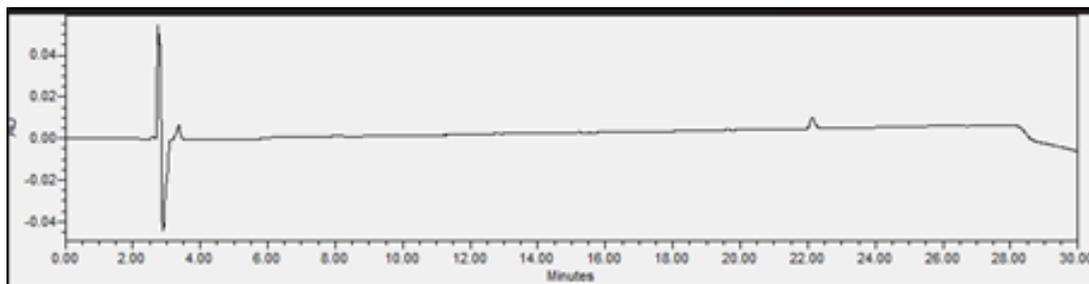


Hình 8. Phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số R^2

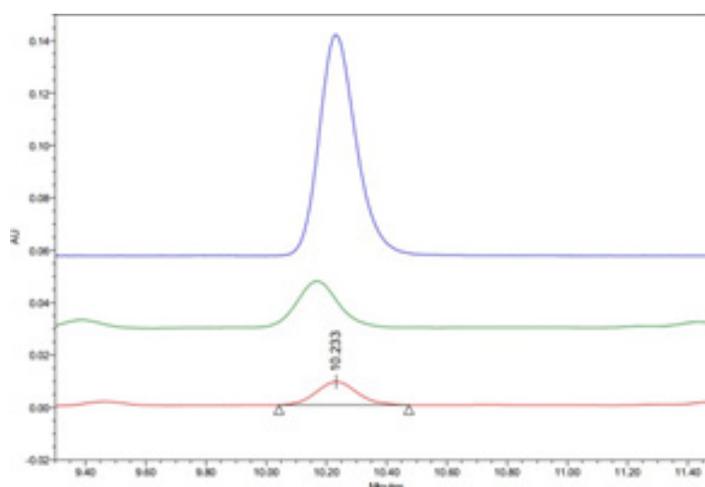
3.3.2. LOD, LOQ

Pha loãng dung dịch chuẩn delphinidin chlorid nhiều lần cho đến khi thu được tỷ số S/N của LOD = 2 - 3 và tỷ số S/N của LOQ = 10. Ở mỗi mức nồng độ tiến hành phân tích 2 lần. Ở nồng độ 0,1 $\mu\text{g/mL}$, tỷ số S/N = 2,49 và 2,62. Ở nồng độ 0,4 $\mu\text{g/mL}$, tỷ số S/N = 9,1 và 10,43. Vậy trong nghiên cứu định lượng delphinidin chlorid có LOD là 0,1 $\mu\text{g/mL}$ và LOQ là 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

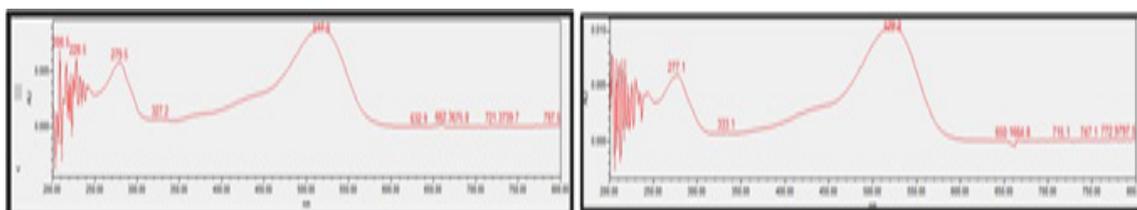
3.3.3. Tính đặc hiệu



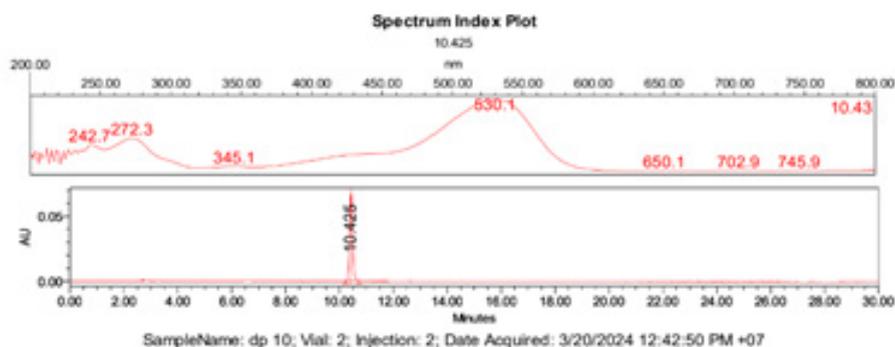
Hình 9. SKĐ mẫu trắng



Hình 10. Pic chính delphinidin chlorid của (A): mẫu chuẩn, (B): mẫu thử thêm chuẩn, (C): mẫu thử



Hình 11. Phổ UV của mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn



Hình 12. Phổ UV của mẫu chuẩn

3.3.4. Tương thích hệ thống

Bảng 8 và 9 thể hiện thời gian lưu và diện tích pic thu được của mẫu chuẩn và mẫu thử.

Bảng 8. Thời gian lưu và diện tích pic thu được của 6 lần tiêm lặp lại mẫu chuẩn

Lần phân tích	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V \cdot sec$)
1	10,133	2.492.345
2	10,223	2.569.660
3	10,110	2.455.966
4	10,178	2.548.455
5	10,167	2.541.692
6	10,163	2.449.417
Trung bình	10,16	2.517.922,40
SD	0,038851855	50.878,57
RSD (%)	0,38	1,69

Bảng 9. Thời gian lưu và diện tích pic thu được của 6 lần tiêm lặp lại mẫu thử

Lần phân tích	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V \cdot sec$)
1	10,108	425.416
2	10,111	440.750
3	10,138	435.192
4	10,160	430.991
5	10,139	435.901
6	10,117	444.203

Lần phân tích	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V \cdot sec$)
Trung bình	10,13	435.408,91
SD	0,020252572	6.716,08
RSD (%)	0,2	1,54

Độ lặp lại của thời gian lưu và diện tích pic thu được đều có giá trị RSD (%) $\leq 2\%$.

3.3.5. Độ lặp lại

Kết quả độ lặp lại của phương pháp định lượng được trình bày ở Bảng 10.

Bảng 10. Độ lặp lại của phương pháp định lượng

Mẫu	Khối lượng (g)	Diện tích pic ($\mu V \cdot sec$)	C ($\mu g/mL$)	C (mg/g)
1	0,1505	482.590	7,59	0,50
2	0,1500	460.527	7,24	0,48
3	0,1501	504.121	7,93	0,53
4	0,1501	472.927	7,44	0,50
5	0,1500	485.096	7,63	0,51
6	0,1504	484.679	7,62	0,51
Trung bình hàm lượng (mg/g)				0,50
SD				0,02
RSD (%)				2,99

Giá trị RSD của độ lặp lại nằm trong giới hạn cho phép. Như vậy phương pháp có độ lặp đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích delphinidin chlorid trong mẫu cao khô *V. angustifolium*.

3.3.6. Độ đúng

Hàm lượng delphinidin trung bình có trong mẫu thử và kết quả độ đúng được trình bày trong Bảng 11 và 12.

Bảng 11. Kết quả giá trị trung bình hàm lượng delphinidin chlorid có trong mẫu thử

Mẫu	Diện tích pic	Thể tích định mức (mL)	Hàm lượng delphinidin chlorid (μg)	Trung bình (μg)
1	71.031	10	11,17	12
2	78.338		12,32	
3	79.145		12,45	
RSD (%)	5,87			

Bảng 12. Kết quả độ đúng của phương pháp định lượng

Lượng chuẩn thêm vào (%)	Mẫu	Lượng chuẩn delphinidin thêm vào (μg)	Diện tích pic ($\mu V \cdot sec$)	Lượng chuẩn delphinidin thu hồi (μg)	Độ đúng (%)
80	1	9,6	125.212	10,10	105,2
	2		125.393	10,13	105,5
	3		115.785	8,61	89,7
RSD (%)			4,5		

Lượng chuẩn thêm vào (%)	Mẫu	Lượng chuẩn delphinidin thêm vào (μg)	Diện tích pic ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Lượng chuẩn delphinidin thu hồi (μg)	Độ đúng (%)
100	1	12	152.307	11,96	99,7
	2		151.638	11,85	98,8
	3		155.276	12,43	103,6
RSD (%)			1,26		
120	1	14,4	169.895	12,33	85,6
	2		183.854	14,52	100,8
	3		183.990	14,54	101,0
RSD (%)			4,52		

Độ thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng 85,6 - 105,5% và giá trị RSD diện tích pic $\leq 7,3\%$. Phương pháp định lượng có độ đúng đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích delphinidin chlorid trong mẫu cao khô *V. angustifolium*.

3.4. Định lượng delphinidin chlorid trong cao khô *Vaccinium angustifolium*

Kết quả hàm lượng delphinidin chlorid trong cao khô *V. angustifolium* được trình bày trong Bảng 13.

Bảng 13. Hàm lượng delphinidin chlorid trong cao khô *V. angustifolium*

Mẫu	Khối lượng (g)	Diện tích pic ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	C ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	C (mg/g)
1	0,0200	71.031	1,12	0,56
2	0,0201	79.329	1,25	0,62
3	0,0203	79.158	1,25	0,61
4	0,0202	77.489	1,22	0,60
5	0,0203	74.707	1,18	0,58
6	0,0202	73.247	1,15	0,57
7	0,0202	78.058	1,23	0,61
8	0,0202	79.557	1,25	0,62
Trung bình hàm lượng (mg/g)				0,60
SD				0,02
RSD (%)				3,90

IV. BÀN LUẬN

4.1. Lựa chọn phương pháp

Anthocyanin có cấu trúc vòng chứa nhiều nối đôi, có khả năng hấp thụ bước sóng trong vùng tử ngoại khả kiến [5], đây là cơ sở để thực hiện định lượng bằng phương pháp HPLC-PDA. Anthocyanin có nhiều nhóm - OH tự do nên có tính phân cực mạnh, thích hợp cho việc tiến hành sắc ký trên cột sắc ký pha đảo.

Trong cao khô *V. angustifolium* có nhiều hợp chất thuộc nhóm anthocyanin cả khả năng hấp thụ tại bước sóng 520 nm. Nếu chỉ sử dụng đầu dò UV-Vis và thời gian lưu để khẳng định chất đó là delphinidin chlorid thì có thể bị nhầm lẫn. Ưu điểm của đầu dò PDA là có khả năng quét được 1 dải bước sóng và xem được hình dạng phổ của chất cần phân tích. Việc kết hợp xem xét thời gian lưu

và hình dạng phổ có thể khẳng định chính xác chất cần phân tích. Vì vậy nghiên cứu sử dụng hệ thống HPLC với đầu dò PDA để định lượng delphinidin chlorid có trong cao khô *V. angustifolium*.

4.2. Lựa chọn hệ pha động

Trong sắc ký pha đảo, các dung môi được lựa chọn phổ biến là nước, ACN và MeOH. Tuy nhiên do delphinidin là 1 hợp chất có cấu trúc phức tạp nên các nghiên cứu sơ bộ cho thấy ở bất cứ tỉ lệ nào của nước với ACN hoặc MeOH đều không rửa giải được delphinidin nói riêng và các anthocyanin nói chung [7]. Ngoài ra do cấu trúc của delphinidin có nhiều nhóm - OH nên pha động phải có độ phân cực cao. Do đó pha động được lựa chọn để khảo sát là 5% acid formic trong nước hoặc hệ đệm kết hợp với MeOH hoặc ACN. Tuy nhiên kết quả cho thấy hệ đệm kết hợp với MeOH và ACN không tách được hoặc không rửa giải được tất cả các anthocyanin ra khỏi cột nên nghiên cứu lựa chọn hệ pha động là 5% acid formic trong nước và ACN.

4.3. Lựa chọn chương trình rửa giải

Các anthocyanin có cấu trúc phức tạp nên các nghiên cứu sơ bộ cho thấy chế độ đẳng dòng chưa hoàn toàn rửa giải được các anthocyanin ra khỏi cột hoặc rửa giải được nhưng chưa tách hoàn toàn [7]. Do vậy chế độ gradient được lựa chọn để định lượng delphinidin chlorid.

4.4. Lựa chọn thể tích tiêm

Lượng mẫu bơm vào cột quá lớn sẽ dẫn đến hiện tượng pic bị doãng và các pic bị chồng lên nhau [7], dẫn đến SKĐ của mẫu thử không phù hợp và các thông số sắc ký không nằm trong khoảng yêu cầu. Vì vậy thể tích tiêm mẫu 10 µL là phù hợp trong nghiên cứu này.

4.5. Lựa chọn nhiệt độ cột

Trong các nghiên cứu định lượng anthocyanin, hầu hết các tác giả đều cố định nhiệt độ cột ở 35°C hoặc 40°C [4, 5, 7], nhưng hạn chế là nhiệt độ cột cao có thể làm giảm hiệu năng và ảnh hưởng đến khả năng tách của cột. Nghiên cứu đã khảo sát trên cả mẫu thử và mẫu chuẩn ở nhiệt độ cột là 25°C và 40°C. Ở 40°C, khả năng tách của cột giảm nên nghiên cứu cố định nhiệt độ cột ở 25°C.

4.6. Lưu ý khi xử lý và bảo quản mẫu

Delphinidin là chất thuộc nhóm anthocyanin, kém bền và dễ bị chuyển dạng bởi ánh sáng nên trong quá trình xử lý mẫu luôn đảm bảo trong điều kiện tránh ánh sáng. Ngoài ra, anthocyanin không ổn định khi thay đổi nhiệt độ nên các mẫu luôn được bảo quản ở điều kiện 25°C và luôn được sử dụng trong ngày.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc khảo sát và xây dựng quy trình định lượng delphinidin chlorid trong cao khô *V. angustifolium*. Các tiêu chí thẩm định đều đạt giá trị yêu cầu theo AOAC.

DANH MỤC VIẾT TẮT

Từ	Tiếng Anh	Tiếng Việt
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
PDA	Photodiode Array Detector	Đầu dò chuỗi diod quang
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	
TCA	Acid trichloroacetic	
THF	Tetrahydrofuran	
MeOH	Methanol	
ACN	Acetonitrile	
SKĐ		Sắc ký đồ
LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of Quantification	Giới hạn định lượng
S/N	Signal - to - Noise	Tỷ số tín hiệu/nhiều
UV-Vis	Ultra Violet - Visible	Quang phổ tử ngoại khả kiến

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chu Wing - kwan, Cheung Sabrina CM, Lau Roxanna AW, et al. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. second ed. 2011. Accessed October 2, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/>
2. Husain A, Chanana H, Khan S. A, et al. Chemistry and Pharmacological Actions of Delphinidin, a Dietary Purple Pigment in Anthocyanidin and Anthocyanin Forms. *Front Nutr.* 2022; 9(746881). doi:10.3389/fnut.2022.746881
3. Martau GA, Bernadette-Emoke T, Odocheanu R, et al. *Vaccinium* Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants. *Molecules.* 2023; 28(4): 1533. doi:10.3390/molecules28041533
4. Shim You - Shin, Kim Seunghee, Seo Dongwon, et al. Rapid method for determination of anthocyanin glucosides and free delphinidin in grapes using u-HPLC. *J Chromatogr Sci.* 2014; 52(7): 629-35. doi:10.1093/chromsci/bmt091
5. Đinh Thị Thúy Hương. XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ANTHOCYANIN TRONG THỰC PHẨM CHỨC NĂNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VÀ HPTLC. Luận văn Thạc sĩ Dược học. Trường Đại học Dược Hà Nội; 2014. Accessed November 24, 2023.
6. Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà. Thẩm định phương pháp phân tích hóa học. In: Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, ed. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP TRONG PHÂN TÍCH HÓA HỌC VÀ VI SINH VẬT. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật; 44-45, 57- 58.
7. Vũ Thị Hương Quỳnh. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ANTHOCYANIN TRONG MỘT SỐ LOẠI RAU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ. ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI, TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN; 2015. Accessed April 29, 2024.