

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

VŨ THỊ TRANG

**NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP TÁCH, CHIẾT VÀ
ĐỊNH LƯỢNG CÁC CHẤT CHỐNG OXY HÓA
TRONG MỘT SỐ LOẠI RAU, CỦ, QUẢ**

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9440112.03

DỰ THẢO TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2019

Công trình được hoàn thành tại

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia – Bộ Y tế

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Lê Thị Hồng Hảo
PGS.TS. Nguyễn Xuân Trung

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ.....

Họp tại.....

vào hồi.....giờ, ngày.....tháng.....năm 2019.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm thông tin - thư viện Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết, mục tiêu và nội dung của luận án

“Stress oxy hóa” là hiện tượng xuất hiện trong cơ thể sinh vật khi có sự mất cân bằng giữa việc sản xuất các gốc tự do và hoạt động của các chất chống oxy hóa. Hiện tượng này là nguyên nhân của rất nhiều bệnh nguy hiểm, trong đó có ung thư, các bệnh tim mạch, các bệnh suy giảm hệ thần kinh (Alzheimer, Parkinson) và lão hóa sớm. Các nhà khoa học và toàn xã hội đều đang quan tâm đến tác hại của gốc tự do, xu hướng tìm kiếm của các chất chống oxy hóa góp phần trong quá trình giảm stress oxy hóa đang được tập trung nghiên cứu.

Các hợp chất polyphenol có mặt khắp nơi trong tự nhiên và thường được tìm thấy trong các cấu trúc phức tạp. Anthocyanin là một trong số rất nhiều các hợp chất thuộc nhóm polyphenol flavonoid và nổi bật với vai trò tạo ra màu sắc đỏ tươi, xanh lam và tím của thực vật. Một vai trò quan trọng được phát hiện gần đây của các hợp chất anthocyanin là khả năng chống oxy hóa của chúng. Các thử nghiệm *invivo*, *invitro* cho thấy tác dụng tích cực của anthocyanin trong việc phòng chống ung thư, các bệnh tim mạch và béo phì. Mức tiêu thụ hàng ngày của anthocyanin tại Mỹ trung bình là 12,5mg/người/ngày, trong khi ở Châu Âu là 20 mg/người/ngày và cao hơn tại một số nước như Phần Lan là 82 mg/người/ngày. Hàm lượng anthocyanin được sử dụng như một chỉ số đánh giá chất lượng của một số sản phẩm. Các lý do trên đã thúc đẩy sự phát triển của các kỹ thuật phân tích để nhận biết và định lượng anthocyanin trong các sản phẩm tự nhiên, cũng như nghiên cứu tác dụng của chúng đối với cơ thể.

Anthocyanin được tìm thấy trong tự nhiên ở dạng aglycon (anthocyanidin) liên kết với gốc đường (glycosid). Các nhà khoa học dự đoán có khoảng hơn 1000 loại anthocyanin nhưng hiện nay mới có khoảng 600 anthocyanin được phát hiện và nhận danh cấu trúc. Mặc dù số lượng anthocyanin lớn nhưng chúng được tạo thành bởi 23 loại anthocyanidin tự nhiên, trong đó sáu loại anthocyanidin phổ biến nhất bao gồm: cyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin và malvidin. Các aglycon và các glycosid có hoạt tính sinh học khác nhau, do đó, biết được thành phần anthocyanin của thực vật sẽ cung cấp thông tin về độ bền, hoạt tính sinh học và lợi ích của chúng đối với con người. Mỗi loài thực vật vẫn đang ẩn chứa các thông tin về những cấu trúc độc đáo của các anthocyanin và chúng vẫn tiếp tục được nghiên cứu, khám phá. Sự đa dạng và phức tạp trong cấu trúc của các anthocyanin là thách thức lớn trong việc nhận biết và định lượng chúng. Để có được thông tin chính xác, cần thiết phải có sự kết hợp của các kỹ thuật phân tích khác nhau. Sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector chuỗi diod (DAD) đang là công cụ được sử dụng phổ biến để xác định các anthocyanin và anthocyanidin. Bên cạnh đó, sự nhận biết các anthocyanin mới hoặc để khẳng định loại anthocyanin, kỹ thuật cao hơn như: detector khối

phổ (MS) được sử dụng với chế độ ion hóa phun điện tử (ESI), chế độ bẫy ion (IT) hay sử dụng khả năng phân giải cao của khối phổ thời gian bay (TOF). Tại Việt nam hiện nay, các quy trình phân tích đã công bố và áp dụng chủ yếu sử dụng phương pháp pH vi phân kết hợp với quang phổ UV-Vis chỉ xác định được lượng tổng anthocyanin quy theo cyanidin-3-glucoside.

Do sự hạn chế về nguồn chất chuẩn và để đơn giản hóa quá trình định lượng, các anthocyanin thường được thủy phân, cắt mạch để chuyển về 6 dạng anthocyanidin chính. Tuy nhiên, các điều kiện thủy phân đã được công bố rất khác nhau và đã có một số tác giả chỉ ra sự thủy phân không hoàn toàn dẫn đến sự tồn tại cả dạng anthocyanin và anthocyanidin trong dung dịch mẫu. Điều đó gây sai số lớn cho việc định lượng chất phân tích. Để có cơ sở dữ liệu đầy đủ về thành phần và hàm lượng các anthocyanin hay anthocyanidin trong thực vật, cần thiết phải nghiên cứu xây dựng phương pháp chiết, tách và xác định chất chống oxy hóa nhóm anthocyanin, làm cơ sở để lựa chọn nguồn nguyên liệu có hàm lượng và hoạt tính sinh học cao.

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu phương pháp tách, chiết và định lượng các chất chống oxy hóa trong một số loại rau, củ, quả”** với ba mục tiêu:

1. Nghiên cứu phát triển phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD (HPLC-DAD) để xác định đồng thời các anthocyanin và anthocyanidin.

2. Nghiên cứu xây dựng quy trình xử lý mẫu để tách, chiết các anthocyanin và anthocyanidin.

3. Áp dụng phương pháp để nhận biết và định lượng các anthocyanin và anthocyanidin trong một số loại rau, củ, quả Việt nam.

Với các mục tiêu trên, nội dung của luận án bao gồm:

- Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện HPLC-DAD xác định đồng thời anthocyanin và anthocyanidin kết hợp sử dụng UPLC-MS/MS để nhận biết chúng.

- Nghiên cứu sử dụng phương pháp quy hoạch hóa thực nghiệm bậc 2 để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình tách sắc ký và xử lý mẫu.

- Thẩm định phương pháp xác định đồng thời 6 anthocyanidin bằng HPLC-DAD.

- Áp dụng phương pháp nhận biết, định lượng và bước đầu thử hoạt tính chống oxy hóa của các anthocyanin và anthocyanidin trong một số mẫu rau, củ, quả.

2. Những đóng góp mới về mặt khoa học và thực tiễn của luận án

• Về mặt khoa học

- Đề tài đã sử dụng phương pháp quy hoạch hóa thực nghiệm bậc hai để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình tách sắc ký lỏng xác định đồng thời sáu anthocyanin và anthocyanidin. Kết quả tách các anthocyanin và anthocyanidin tối ưu hơn so với các công trình đã công bố sử dụng phương pháp đơn biến.

Việc xác định đồng thời cả anthocyanin và anthocyanidin cho phép nhận biết và định lượng cả hai dạng trong cùng một lần phân tích, giúp đánh giá hiệu suất quá trình thủy phân, đảm bảo kết quả định lượng chính xác chất phân tích.

- Quá trình tách, chiết các anthocyanidin trong nền mẫu rau, củ, quả được tối ưu hóa sử dụng phương pháp quy hoạch hóa thực nghiệm bậc hai. Kết quả nghiên cứu giải quyết được sự khác nhau về các điều kiện thủy phân của các công trình đã công bố khi sử dụng phương pháp đơn biến.

- ***Về mặt thực tiễn***

- Các thông số tối ưu của HPLC-DAD tách và xác định đồng thời anthocyanin và anthocyanidin được ứng dụng các phòng thí nghiệm để đánh giá hiệu suất quá trình chiết và thủy phân cho mỗi nền mẫu cụ thể, đặc biệt khi nguồn chất chuẩn anthocyanin không sẵn có.

- Kết quả phân tích 31 nền mẫu rau, củ, quả đã nhận biết và định lượng được thành phần anthocyanidin, đồng thời sơ bộ thử nghiệm hoạt tính của một số mẫu thực phẩm là cơ sở để lựa chọn nguồn nguyên liệu có hàm lượng và hoạt tính sinh học cao.

1. Bố cục của luận án

Luận án gồm năm phần chính là: mở đầu, chương 1: tổng quan, chương 2: nội dung và phương pháp nghiên cứu, chương 3: kết quả và thảo luận, kết luận. Trong mỗi phần có các hình ảnh và bảng biểu minh họa tương ứng, phù hợp. Ngoài ra luận án còn gồm đầy đủ các phần: mục lục, danh mục các ký hiệu và chữ cái viết tắt, danh mục bảng, danh mục hình, danh mục các công trình khoa học của tác giả liên quan đến luận án, tài liệu tham khảo tiếng Việt, tiếng Anh và các phụ lục liên quan.

Chương 1. TỔNG QUAN

Tổng quan về anthocyanin và anthocyanidin

Anthocyanin là những glycosid do gốc đường glucose, galactose, rutinose... kết hợp với gốc aglycon có màu. Các anthocyanin khi tách hết nhóm đường được gọi là anthocyanidin hay aglycon. Sự đa dạng về cấu trúc đã tạo ra một số lượng lớn các anthocyanin mà đến nay mới ghi nhận được khoảng 600 loại. Đến nay, có 23 anthocyanidin đã được tìm thấy, trong đó có 6 anthocyanidin phổ biến nhất là: cyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, malvidin và petunidin.

Trong thực vật, anthocyanin có tính kháng khuẩn, kháng nấm giúp thực vật tránh được một số bệnh nấm ở cây, do có màu sắc sặc sỡ thu hút động vật, chim và côn trùng nên thúc đẩy quá trình thụ phấn và phát tán phấn hoa. Trong lĩnh vực thực phẩm, với khả năng chống oxy hóa cao, anthocyanin được sử dụng để bảo quản thực phẩm, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa cho thực phẩm. Ngoài những vai trò sinh lý đối với thực vật, vai trò phụ gia trong sản xuất thực phẩm, các hợp chất anthocyanin còn được chứng minh là mang lại nhiều lợi ích đối với sức khỏe con người với các hoạt tính sinh học quý: chống oxy hóa, tác dụng tích cực trong phòng và điều trị các bệnh tim mạch, ung thư. Với những tác dụng quan trọng trên, anthocyanin đang ngày càng được quan tâm, nghiên cứu, khai thác và ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực của đời sống.

Các phương pháp xác định anthocyanin và anthocyanidin

Một số phương pháp như quang phổ, cộng hưởng từ hạt nhân, sắc ký khí, sắc ký lỏng, điện di mao quản và khối phổ đã được công bố để nhận biết và định lượng anthocyanin. Phương pháp sắc ký lỏng được sử dụng phổ biến để xác định anthocyanin, anthocyanidin với detector chuỗi diod (DAD) hoặc khối phổ MS. Hệ thiết bị sắc ký lỏng ghép nối tiếp detector DAD và detector MS (LC-DAD-MS) cũng được khai thác rộng rãi để phân tích các anthocyanin. Phương pháp này đặc biệt hiệu quả khi số lượng chất chuẩn anthocyanin không sẵn có, việc nhận biết các chất sẽ dựa trên thứ tự rửa giải, phổ UV-Vis và thông tin phổ khối. Detector quang diod vẫn được sử dụng rộng rãi trong phân tích thường quy, đặc biệt ứng dụng trong các phòng thí nghiệm kiểm soát chất lượng thực phẩm để xác định anthocyanin trong các nền mẫu khác nhau, hầu hết sử dụng bước sóng hấp thụ cực đại của anthocyanin trong khoảng 520nm.

Sự tồn tại của số lượng lớn các anthocyanin trong tự nhiên với các cấu trúc vô cùng phong phú và phức tạp khiến việc tách và định lượng chúng rất khó khăn do thiếu chất chuẩn và trùng thời gian lưu. Để đơn giản quá trình phân tích, cần tiến hành thủy phân để cắt toàn bộ gốc đường chuyển thành 6 anthocyanidin cơ bản. Quá trình thủy phân các anthocyanin bị ảnh hưởng chính bởi 3 yếu tố: nhiệt độ, nồng độ acid và thời gian. Điều kiện chiết và

thủy phân ảnh hưởng rất lớn đến dạng tồn tại của anthocyanin và anthocyanidin. Quá trình chiết được thực hiện trong môi trường acid, nếu môi trường acid quá mạnh sẽ thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin, quá trình thủy phân không hoàn toàn có thể sẽ không thủy phân hết anthocyanin thành anthocyanidin. Do đó, trong nền mẫu sau khi thủy phân, có thể tồn tại cả dạng anthocyanin và anthocyanidin. Để giải quyết các vấn đề này, cần thiết phải tìm điều kiện tối ưu để chiết và thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin với việc khảo sát ảnh hưởng đồng thời của các yếu tố và sự tác động tương hỗ giữa chúng, đồng thời để đánh giá hiệu suất chuyển hóa anthocyanin thành anthocyanidin sử dụng các chất chuẩn anthocyanin bổ sung vào nền mẫu để các chất chuẩn này được thủy phân như dạng tồn tại của chất phân tích trong mẫu.

Việc đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các anthocyanin và các nền mẫu chứa anthocyanin được thực hiện theo nhiều phương pháp khác nhau, trong đó, phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử sử dụng phản ứng khử gốc tự do DPPH được sử dụng phổ biến nhất do phương pháp nhanh, đơn giản và có độ chính xác cao.

CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng mẫu phân tích là các loại rau, củ, quả được mua trên địa bàn Hà Nội, Đà Lạt, Bắc Giang, Quảng Ninh (bắp cải tím, đỗ đen, đậu bắp tím, ngô tím, búp giấm, khoai lang tím, hành tây tím, rau chua, nho tím, nho đen, thanh mai, táo đỏ, mận, thanh long, dâu tây, củ dền...)

Đối tượng chất phân tích là 6 anthocyanidin phổ biến nhất, bao gồm: cyanidin, delphinidin, pelargonidin, petunidin, peonidin, malvidin và dạng mono-3-glucoside của chúng, bao gồm: cyanidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-glucoside.

Phương pháp nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm theo mô hình bậc hai tâm xoay để tìm điều kiện tối ưu cho quá trình tách sắc ký và xử lý mẫu; phương pháp HPLC-DAD và UPLC-MS/MS để nhận biết và định lượng các chất phân tích; phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis dựa trên phản ứng khử gốc tự do DPPH để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các chất phân tích và mẫu nghiên cứu.

Phương pháp đặt mục tiêu theo mô hình bậc hai tâm xoay tìm điều kiện HPLC tối ưu xác định đồng thời sáu anthocyanin và sáu anthocyanidin

Cần tìm điều kiện HPLC mà các pic tách khỏi nhau hoàn toàn, có nghĩa là độ phân giải của chúng phải đủ lớn (thường là ≥ 2). Để tìm điều kiện tối ưu này, mô hình bậc hai tâm xoay được sử dụng với 3 yếu tố độc lập bao gồm: nồng độ acid formic trong pha động (X_1), tỉ lệ ban đầu của ACN trong chương trình gradient (X_2) và tốc độ dòng (X_3). Các hàm mục tiêu được lựa chọn là

các độ phân giải của các cặp pic khó tách nhất, bao gồm: độ phân giải của pelar-3G với Del (Y_1), độ phân giải của Del với Peo-3G (Y_2), độ phân giải của Peo-3G với Mal-3G (Y_3) và độ phân giải của Peo với Mal (Y_4).

Phương pháp LC-MS/MS xác định đồng thời 6 anthocyanin và 6 anthocyanidin

Khảo sát điều kiện MS: mảnh mẹ, mảnh con, năng lượng bắn. Khảo sát điều kiện LC: tốc độ dòng, chương trình gradient, nồng độ acid

Phương pháp mặt mục tiêu theo mô hình bậc hai tâm xoay tìm điều kiện tối ưu chiết, tách các anthocyanin và thủy phân thành anthocyanidin

Tối ưu hóa điều kiện chiết các anthocyanin từ nền mẫu rau, củ, quả

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng chiết là dung môi chiết, thời gian chiết, khối lượng mẫu chiết, nhiệt độ chiết.

Khảo sát điều kiện thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng thủy phân là nồng độ HCl, nhiệt độ thủy phân, thời gian thủy phân

Tối ưu quy trình chiết và thủy phân anthocyanidin trực tiếp từ nền mẫu bằng phương pháp mặt mục tiêu sử dụng mô hình bậc hai tâm xoay

Các điều kiện tối ưu đã được công bố rất khác nhau nhưng có ba yếu tố ảnh hưởng chính là nhiệt độ, thời gian và nồng độ acid HCl trong dung môi MeOH. Khảo sát ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố: nhiệt độ, thời gian và nồng độ acid HCl dung môi MeOH đến hàm mục tiêu là hàm lượng tổng anthocyanidin (Y_1). Sử dụng phương pháp qui hoạch thực nghiệm theo mô hình bậc 2 tâm xoay.

Phương pháp đánh giá hiệu suất thủy phân

Thêm trực tiếp hỗn hợp các chất chuẩn 3-glucoside của 6 anthocyanidin (bao gồm cyanidin - 3 - O - glucoside, pelargonidin - 3 - O - glucoside, malvidin - 3 - O - glucoside, petunidin - 3 - O - glucoside, Peonidin - 3 - O - glucoside, delphinidin - 3 - O - glucoside) vào dịch chiết anthocyanin và tiến hành thủy phân theo điều kiện tối ưu.

Phương pháp xử lý số liệu mô hình thực nghiệm

Thiết kế thí nghiệm và phân tích dữ liệu được thực hiện sử dụng phần mềm Design-Expert phiên bản 10.0.7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Đánh giá tính có nghĩa của các yếu tố theo phân tích phương sai (ANOVA)

Đánh giá phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp với các thông số: đường chuẩn, LOD, LOQ, độ lặp lại, độ thu hồi

Thiết bị và hóa chất

Hệ thống thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (LC 20AD) của hãng Shimadzu trang bị detector chuỗi diod DAD. Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng detector khối phổ (UPLC-MS/MS) bao gồm: hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng UPLC và hệ thống khối phổ Xevo TQD của hãng Waters. Các chất chuẩn từ Sigma và Chromadex.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện HPLC xác định đồng thời anthocyanin và anthocyanidin

Khảo sát sơ bộ một số điều kiện HPLC xác định đồng thời anthocyanin và anthocyanidin

Khả năng tách, xác định các anthocyanin và anthocyanidin bằng HPLC phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: bước sóng phát hiện, loại cột tách, thành phần pha động, chương trình gradient, tốc độ dòng...

Khảo sát bước sóng phát hiện

Các anthocyanin và anthocyanidin là các hợp chất mang màu, hấp thụ ánh sáng trong vùng UV-Vis. Do đó, lựa chọn detector DAD để phát hiện và định lượng các chất. Để lựa chọn được bước sóng thích hợp, tiến hành quét phổ đối với chất chuẩn của 6 anthocyanidin và 6 anthocyanin trong dải phổ từ 190 – 800 nm. Bước sóng cực đại hấp thụ chung được lựa chọn là 520nm

Khảo sát thành phần pha động

Hệ dung môi khảo sát đầu tiên có thành phần kênh B là ACN, kênh A là acid TFA 0,1%. Với hệ dung môi này, nhiều chương trình gradient đã được khảo sát để tách các anthocyanin và anthocyanidin. Tuy nhiên, TFA với lực ion lớn tỏ ra hiệu quả trong việc tách các anthocyanidin khi chúng được rửa giải chậm và khó khăn để tách các anthocyanin khi chúng được rửa giải sớm. Các anthocyanin được rửa giải trước 15 phút với các pic Peo – 3G, Mal – 3G và Del không thể tách nhau hoàn toàn. Các anthocyanidin được rửa giải trong khoảng 15 – 40 phút với Del được rửa giải tại 15 phút và các chất còn lại được rửa giải sau 25 phút.

Hệ dung môi khảo sát thứ hai có thành phần kênh B là ACN, kênh A là acid FA 0,1% cho thấy: tuy các pic anthocyanin không nhọn, nhưng khả năng tách rất cao, tất cả các anthocyanin đã tách nhau hoàn toàn.

Do số lượng chất phân tích lớn, thuộc hai nhóm chất có độ phân cực khác nhau nên việc tách chúng bằng HPLC nếu sử dụng phương pháp đơn biến sẽ dẫn đến số lượng thực nghiệm lớn và có thể không tìm được điều kiện tối ưu. Để giải quyết vấn đề này, mô hình mặt mục tiêu được lựa chọn để tìm điều kiện tối ưu tách các anthocyanin và anthocyanidin.

Tối ưu hóa điều kiện HPLC xác định đồng thời anthocyanin và anthocyanidin theo phương pháp mặt mục tiêu RSM

Bảng 3.1: Mức cơ sở và khoảng biến thiên các yếu tố theo mô hình bậc hai tâm xoay tối ưu điều kiện tách HPLC

| Yếu tố | Mã hóa | Các mức | | | Khoảng biến thiên |
|--------------------|--------|---------|-----|----|-------------------|
| | | -1 | 0 | +1 | |
| Nồng độ FA (% v/v) | X1 | 5 | 10 | 15 | 5 |
| Tỉ lệ của ACN | X2 | 1 | 6,5 | 12 | 5,5 |

| | | | | | |
|-------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| (%) | | | | | |
| Tốc độ dòng (mL/min) | X3 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,2 |

Bảng 3.3: Kết quả thực nghiệm theo mô hình bậc hai tâm xoay

| STT | Thứ tự thí nghiệm | Các biến | | | Các hàm | | | |
|-----|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ | Y ₂ | Y ₃ | Y ₄ |
| 19 | 1 | 10 | 6,5 | 0,8 | 2,641 | 3,483 | 2,344 | 2,696 |
| 3 | 2 | 5,0 | 12 | 0,6 | 5,044 | 0,468 | 4,525 | 2,394 |
| 15 | 3 | 10 | 6,5 | 0,8 | 2,637 | 3,609 | 2,381 | 2,717 |
| 4 | 4 | 15 | 12 | 0,6 | 1,838 | 1,566 | 3,206 | 3,415 |
| 9 | 5 | 1,6 | 6,5 | 0,8 | 1,589 | 0,729 | 3,227 | 1,601 |
| 1 | 6 | 5,0 | 1,0 | 0,6 | 1,229 | 0,000 | 0,548 | 0,140 |
| 8 | 7 | 15 | 12 | 1,0 | 2,271 | 2,272 | 2,988 | 3,122 |
| 10 | 8 | 18,4 | 6,5 | 0,8 | 0,685 | 3,040 | 3,345 | 3,549 |
| 7 | 9 | 5,0 | 12 | 1,0 | 4,479 | 0,611 | 3,522 | 2,579 |
| 20 | 10 | 10 | 6,5 | 0,8 | 2,641 | 3,483 | 2,344 | 2,696 |
| 6 | 11 | 15 | 1,0 | 1,0 | 1,527 | 3,010 | 2,593 | 3,438 |
| 11 | 12 | 10 | 0,0 | 0,8 | 1,250 | 0,832 | 0,717 | 2,495 |
| 14 | 13 | 10 | 6,5 | 1,1 | 2,663 | 3,500 | 2,143 | 2,405 |
| 12 | 14 | 10 | 15,7 | 0,8 | 4,560 | 0,000 | 3,878 | 3,639 |
| 13 | 15 | 10 | 6,5 | 0,5 | 2,669 | 1,271 | 1,817 | 0,943 |
| 5 | 16 | 5,0 | 1,0 | 1,0 | 0,000 | 1,673 | 0,997 | 1,932 |
| 16 | 17 | 10 | 6,5 | 0,8 | 2,630 | 3,438 | 2,325 | 2,717 |
| 18 | 18 | 10 | 6,5 | 0,8 | 2,639 | 3,430 | 2,326 | 2,695 |
| 2 | 19 | 15 | 1,0 | 0,6 | 1,436 | 0,877 | 1,382 | 2,427 |
| 17 | 20 | 10 | 6,5 | 0,8 | 2,625 | 3,462 | 2,338 | 2,713 |

Y1: Các yếu tố X₃, X₂X₃, X₂², X₃² có giá trị P > 0,05 cho thấy độ phân giải của Pelar-3G và Del không bị ảnh hưởng bởi: yếu tố bậc nhất, bậc hai của tốc độ dòng (X₃, X₃²); tương tác của tốc độ dòng và tỉ lệ ACN (X₂X₃) và yếu tố bậc hai của tỉ lệ ACN (X₂²)

Y2: Yếu tố X₁X₂ có giá trị P > 0,05 cho thấy độ phân giải của Del và Peo-3G không bị ảnh hưởng bởi sự tương tác tương hỗ giữa nồng độ FA và tỉ lệ ACN và bị ảnh hưởng bởi tất cả các yếu tố còn lại

Y3: Các yếu tố X₁, X₂² có giá trị P > 0,05 cho thấy độ phân giải của Peo-3G và Mal-3G không bị ảnh hưởng bởi: yếu tố bậc nhất của nồng độ FA (X₁); yếu tố bậc hai của tỉ lệ ACN (X₂²).

Y4: Yếu tố X₁² có giá trị P > 0,05 cho thấy độ phân giải của Peo và Mal không bị ảnh hưởng bởi yếu tố bậc hai của tốc độ dòng và bị ảnh hưởng bởi tất cả các yếu tố còn lại

Phương trình hồi quy mô tả ảnh hưởng của các yếu tố và sự tác động tương hỗ giữa chúng đến hàm mục tiêu và sự phù hợp của phương trình được thể hiện trong bảng 3.12

Bảng 3.12: Phương trình hồi quy và độ chính xác của mô hình

| Hàm | Phương trình hồi quy ^a | C.V. (%) ^b | R ² hiệu chỉnh | R ² dự đoán | Độ chính xác phù hợp (Adeq precision) |
|-----------------------------|--|-----------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Y ₁ ^c | $Y_1 = 2.72 - 0.38X_1 + 1.10X_2 - 0.094X_3 - 0.89X_1X_2 + 0.29X_1X_3 - 0.54X_1^2$ | 9,22 | 0,9707 | 0,9286 | 37,040 |
| Y ₂ | $Y_2 = 3.49 + 0.65X_1 - 0.15X_2 + 0.62X_3 + 0.13X_1X_3 - 0.37X_2X_3 - 0.59X_1^2 - 1.11X_2^2 - 0.42X_3^2$ | 7,35 | 0,9878 | 0,9628 | 34,651 |
| Y ₃ ^c | $Y_3 = 2.32 + 0.057X_1 + 1.03X_2 + 0.072X_3 - 0.54 X_1X_2 + 0.19X_1X_3 - 0.36X_2X_3 + 0.32X_1^2 - 0.14X_3^2$ | 4,12 | 0,9904 | 0,9705 | 57,652 |
| Y ₄ | $Y_4 = 2.67 + 0.63X_1 + 0.40X_2 + 0.38X_3 - 0.28 X_1X_2 - 0.16X_1X_3 - 0.36X_2X_3 + 0.13X_2^2 - 0.36X_3^2$ | 4,44 | 0,9830 | 0,9433 | 46,720 |

Trong nghiên cứu này, việc kiểm tra tính đầy đủ của mô hình được thực hiện bằng cách sử dụng công cụ thống kê độ chính xác phù hợp (Adequate Precision). Độ chính xác phù hợp đo tỉ lệ tín hiệu/nhiều (signal to noise ratios). Các giá trị độ chính xác phù hợp của các phương trình lần lượt là 37,040, 34,651, 57,652 và 46,720 (đều > 4) cho thấy các tín hiệu là đầy đủ và mô hình là phù hợp. Bên cạnh đó, sự tương thích của mô hình còn được đánh giá thông qua hệ số R². Các giá trị R² dự đoán và R² hiệu chỉnh đều > 0,92 (đảm bảo yêu cầu giới hạn ≥ 0,80) cho thấy các dữ liệu là phù hợp với phương trình bậc hai. Các giá trị hệ số biến thiên trong khoảng 4,12 – 9,22% (đảm bảo yêu cầu <10%) cho thấy mô hình có độ tái lập tốt.

Bảng 3.15: So sánh kết quả thực nghiệm và mô hình

| Độ phân giải | R1 | R2 | R3 | R4 |
|--|-------|-------|-------|-------|
| Mô hình | 3,438 | 2,934 | 2,978 | 3,010 |
| Thực nghiệm 1 (FA 10%, ACN: 10 %, TF: 0,80 mL/phút) | 3,859 | 2,871 | 2,768 | 2,774 |

Các kết quả trên cho thấy, tại các điều kiện tối ưu được đưa ra, tất cả 12 chất đều tách khỏi nhau rõ ràng (độ phân giải của tất cả các cặp pic đều lớn hơn 2). Sự sai khác về độ phân giải giữa mô hình và thực nghiệm là không đáng kể. Như vậy, điều kiện sắc ký tối ưu để tách đồng thời 12 anthocyanin và anthocyanidin thu được như sau:

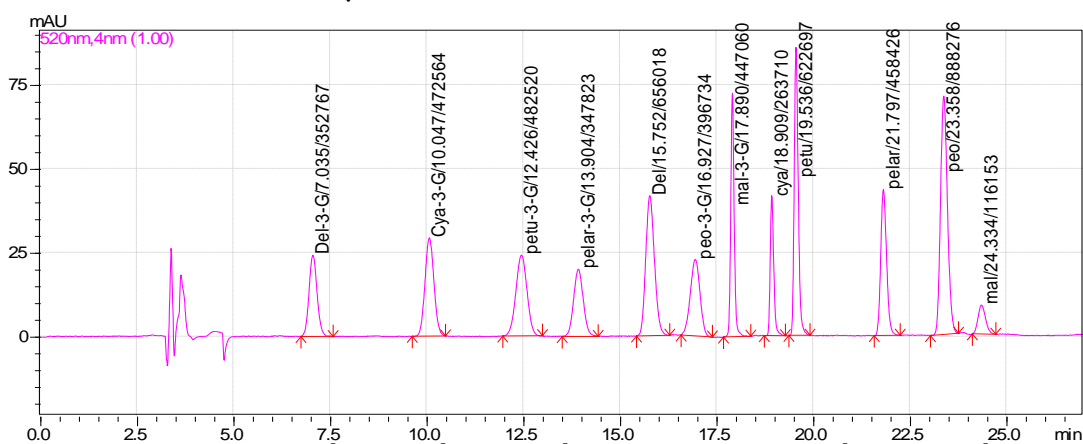
- Detector PDA quét phổ trong khoảng 190 – 800 nm, định lượng tại 520 nm.

- Cột sắc ký: cột Sun Fire hãng Waters C₁₈ (250 mm × 4,6 mm × 5 μm) và tiền cột tương ứng.
- Pha động: A (acid formic 10%), B (ACN) theo chương trình gradient như trong bảng 3.15.

Bảng 3.2: Chương trình gradient tách đồng thời anthocyanin và anthocyanidin

| Thời gian (phút) | 0,01 | 10,00 | 10,01 | 20,00 | 20,01 | 25,00 |
|------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| %ACN | 10 | 12 | 19 | 19 | 10 | 10 |

- Tốc độ dòng (X₃): 0,8 mL/phút.
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μL.



Hình 3.1: Sắc ký đồ 12 chất phân tích tại điều kiện tối ưu (FA 10%, ACN: 10%, TF: 0,8 mL/phút)

Tối ưu hóa điều kiện LC-MS/MS để xác định đồng thời 6 anthocyanin và 6 anthocyanidin

Tối ưu các điều kiện của detector khối phổ (MS)

- Thế mao quản (Capillary Voltages): 0,83 kV
- Thế đầu phun (Cone Voltages): 65V
- Nhiệt độ loại dung môi (Desolvation temp): 500⁰C
- Tốc độ khí loại dung môi (Desolvation- gas flow): 1000L/hr.

| STT | Ion mẹ | Ion con | Cone Vol (eV) | CE (eV) |
|-----|-----------------|---------|---------------|---------|
| 1 | Del-3G 465 | 303 | 34 | 20 |
| | | 290 | 34 | 44 |
| 2 | Pelar-3G 595 | 433 | 44 | 18 |
| | | 127 | 44 | 46 |
| 3 | Cya-3G 449 | 287 | 34 | 18 |
| | | 184 | 34 | 54 |
| 4 | Petu-3G 479 | 317 | 35 | 18 |
| | | 270 | 35 | 50 |
| 5 | Peo- 3G | 301 | 34 | 20 |

| | | | | |
|----|------------|------------|----|----|
| | 463 | 286 | 34 | 42 |
| 6 | Mal – 3G | 331 | 36 | 22 |
| | 493 | 315 | 36 | 52 |
| 7 | Del | 127 | 60 | 50 |
| | 303 | 76 | 60 | 64 |
| 8 | Cya | 137 | 72 | 34 |
| | 287 | 109 | 72 | 42 |
| 9 | Mal | 315 | 56 | 30 |
| | 331 | 287 | 56 | 28 |
| 10 | Pelar | 121 | 60 | 38 |
| | 271 | 93 | 60 | 42 |
| 11 | Peo | 286 | 58 | 24 |
| | 301 | 258 | 58 | 30 |
| 12 | Petu | 302 | 58 | 26 |
| | 317 | 203 | 58 | 38 |

Tối ưu hoá điều kiện sắc ký lỏng

Khảo sát chương trình rửa giải

Qua việc khảo sát 4 tỷ lệ pha động ở chế độ isocratic, nhận thấy việc tách và xác định các anthocyanin và anthocyanidin có cấu trúc gần giống nhau bằng chế độ đẳng dòng (Isocratic) là không phù hợp

Bảng 3.3: Chương trình rửa giải gradient tách anthocyanin và anthocyanidin bằng LC-MS/MS

| | | | | |
|-------------|----|----|-------|----|
| T (phút) | 0 | 10 | 10,10 | 13 |
| % ACN | 20 | 30 | 20 | 20 |

Khảo sát tốc độ pha động

Khi tăng tốc độ dòng của pha động, các pic sắc ký có xu hướng nhọn và rõ nét. Tại tốc độ dòng 0,45 ml/phút, các pic rất sắc và nhọn. Tuy nhiên, tại tốc độ này, nồng độ các chất được rửa giải giảm nhẹ ; đồng thời áp suất của hệ cao (p= 206 bar đối với chất chuẩn, thậm chí có thể lên đến 450 bar khi chạy trên nền mẫu thực do ảnh hưởng của nền mẫu). Áp suất của hệ lên cao có ảnh hưởng rất lớn đến áp suất đầu vào và làm giảm tuổi thọ của cột. Do đó, lựa chọn tốc độ dòng 0,4ml/phút

Khảo sát nồng độ acid formic trong pha động

Nếu pha động không chứa acid formic thì không thể rửa giải được các anthocyanidin. Khi tăng nồng độ acid formic từ 0,05% – 0,2%, diện tích pic của các anthocyanidin giảm, nhưng mức độ giảm của các anthocyanidin là khác nhau tùy thuộc vào giá trị pH của dung dịch.

Khi nồng độ acid formic cao, số lượng ion đi vào buồng ion của detector MS tăng, gây cạnh tranh với các ion của chất phân tích, làm giảm tín hiệu. Tất cả các anthocyanidin đều cho tín hiệu cao nhất tại nồng độ acid formic 0,05%. Do đó, chọn nồng độ acid formic 0,05%, nồng độ này cũng phù hợp với các hệ

LC/MS/MS.

Tóm lại: Các thông số tối ưu cho quá trình tách sắc ký là:

- Cột C18 (100mm x 4,6mm x 2,5µm)
- Pha động kênh A (acid formic 0,05%); kênh B (acetonitril) theo chương trình gradient trong bảng 3.19.

Bảng 3.19. Chương trình gradient tách các anthocyanin và anthocyanidin bằng LC-MS/MS

| | | | | |
|------------------|----|----|-------|----|
| Thời gian (phút) | 0 | 10 | 10,10 | 13 |
| % ACN | 20 | 30 | 20 | 20 |

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút.
- Thể tích bơm mẫu: 5 µL.
- Nhiệt độ cột: 30°C.

Tối ưu hóa điều kiện chiết các anthocyanin và anthocyanidin từ nền mẫu rau, củ, quả

Khảo sát điều kiện chiết các anthocyanin

Khảo sát dung môi chiết

Khi chiết mẫu vỏ đỗ đen sử dụng MeOH và nước cho hàm lượng anthocyanin khác nhau không đáng kể. Tuy nhiên, dung môi thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin là MeOH được acid hóa nên lựa chọn MeOH là dung môi chiết anthocyanin.

Khảo thời gian chiết

Tại 15 phút, hàm lượng anthocyanin thu được thấp. Hàm lượng anthocyanin cao nhất ở 30 phút sau đó giảm dần ở các thời gian 45 phút và 60 phút có thể do sự phân hủy ở nhiệt độ cao. Vì vậy, chọn 30 phút là thời gian tối ưu để chiết anthocyanin.

Khảo sát tỉ lệ dung môi và khối lượng mẫu

Tại khối lượng ≤ 0,3g, hàm lượng anthocyanin thu được là cao nhất. Với các khối lượng > 0,3g hàm lượng giảm dần do lượng dung môi không đủ để chiết toàn bộ lượng anthocyanin trong mẫu. Vì vậy, chọn tỉ lệ dung môi : khối lượng là 100 : 1 (v/w) là tỉ lệ chiết tối ưu.

Khảo sát nhiệt độ chiết

Hàm lượng anthocyanin chiết được tăng dần từ 60°C đến 100°C rồi giảm ở 120°C. Như vậy, hiệu suất chiết anthocyanin sẽ tăng dần theo nhiệt độ đến 100°C, nhưng nếu vượt qua 100°C sẽ bị phân hủy một phần. Tại 100°C, hàm lượng anthocyanin chiết được là cao nhất nên đây là nhiệt độ tối ưu.

Như vậy, các điều kiện tối ưu để chiết anthocyanin là:

- Dung môi chiết: MeOH
- Thời gian chiết: 30 phút
- Nhiệt độ chiết: 100°C
- Tỉ lệ dung môi : mẫu = 100 : 1 (v/w)

Khảo sát điều kiện tối ưu để thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin

Khảo sát nồng độ HCl

Tổng hàm lượng anthocyanidin tăng dần từ nồng độ HCl 0,9 M đến 2,4 M rồi giảm xuống ở 3 M. Vì vậy, nồng độ 2,4 M là tối ưu để thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin.

Khảo sát nhiệt độ

Hàm lượng anthocyanidin tăng khi thủy phân ở 60°C đến 90 °C và giảm ở 100°C. Như vậy, ở nhiệt độ thấp, hiệu suất thủy phân tăng dần theo nhiệt độ đến 90°C rồi giảm dần do bị phân hủy một phần. Vì vậy, 90°C là nhiệt độ tối ưu để thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin.

Khảo sát thời gian thủy phân

Hàm lượng anthocyanidin tăng dần từ 15 phút đến 60 phút rồi giảm dần do phân hủy một phần. Vì vậy, 60 phút là thời gian tối ưu để thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin.

Như vậy, điều kiện tối ưu để thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin là:

- Nồng độ HCl trong MeOH: 2,4M
- Thời gian thủy phân: 60 phút
- Nhiệt độ thủy phân: 90 °C

Tối ưu hóa điều kiện xử lý mẫu xác định các anthocyanidin theo phương pháp mặt mục tiêu RSM

Khảo sát ảnh hưởng khối lượng mẫu

Khi cân lượng mẫu quá ít khoảng 0,1g những chất có hàm lượng thấp như Pelargonidin, Peonidin và Malvin không phát hiện được nên tổng hàm lượng chất bị giảm. Khối lượng mẫu cân khoảng 0,5g hoặc 1g sẽ cho hàm lượng tổng anthocyanidin là cao nhất và tương đương, tất cả các chất phân tích có trong mẫu đều được định lượng. Khi tăng khối lượng cân khoảng 2g có thể do lượng dung môi chiết không đủ để chiết hoàn toàn chất có hàm lượng cao là Cyanidin và Delphinidin. Mặc dù, Peonidin và Malvidin được định lượng nhưng tổng hàm lượng anthocyanidin bị giảm dần. Do đó, để tăng tính đồng nhất và đại diện cho các anthocyanidin thì khối lượng mẫu cân khoảng 1g được sử dụng để khảo sát mô hình hóa thực nghiệm.

Khảo sát ảnh hưởng đồng thời của các yếu tố đến quá trình chiết anthocyanidin theo phương pháp RSM

Bảng 3.21: Mức cơ sở và khoảng biến thiên các yếu tố theo mô hình bậc hai tâm xoay tối ưu hóa quá trình chiết anthocyanidin

| Yếu tố | Mã hóa | Các mức | | | Khoảng biến thiên (λ) |
|------------------|----------------|----------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| | | Mức dưới (- 1) | Mức gốc (0) | Mức trên (+ 1) | |
| Thời gian (phút) | x ₁ | 60 | 90 | 120 | 30 |

| | | | | | |
|-----------------|----------------|----|----|-----|----|
| Nhiệt độ (°C) | x ₂ | 50 | 75 | 100 | 25 |
| Nồng độ HCl (M) | x ₃ | 1 | 2 | 3 | 1 |

Bảng 3.22: Tổng hàm lượng anthocyanidin theo mô hình bậc hai tâm xoay

| STT | Thứ tự thực nghiệm | Thời gian (phút) | Nhiệt độ (°C) | Nồng độ HCl (M) | HL Antho mg/100g Y |
|-----|--------------------|------------------|---------------|-----------------|--------------------|
| 13 | 1 | 90 | 75 | 0.32 | 47,01 |
| 19 | 2 | 90 | 75 | 2 | 83,79 |
| 4 | 3 | 120 | 100 | 1 | 72,54 |
| 8 | 4 | 120 | 100 | 3 | 80,05 |
| 2 | 5 | 120 | 50 | 1 | 31,87 |
| 6 | 6 | 120 | 50 | 3 | 39,89 |
| 11 | 7 | 90 | 32,9552 | 2 | 18,12 |
| 16 | 8 | 90 | 75 | 2 | 89,04 |
| 20 | 9 | 90 | 75 | 2 | 81,83 |
| 10 | 10 | 140,454 | 75 | 2 | 79,53 |
| 3 | 11 | 60 | 100 | 1 | 70,87 |
| 7 | 12 | 60 | 100 | 3 | 69,16 |
| 9 | 13 | 39,5462 | 75 | 2 | 67 |
| 12 | 14 | 90 | 117,045 | 2 | 72,42 |
| 18 | 15 | 90 | 75 | 2 | 92,03 |
| 14 | 16 | 90 | 75 | 3.68179 | 65,69 |
| 17 | 17 | 90 | 75 | 2 | 83,72 |
| 1 | 18 | 60 | 50 | 1 | 26,02 |
| 5 | 19 | 60 | 50 | 3 | 35,04 |
| 15 | 20 | 90 | 75 | 2 | 81,83 |

Khi so sánh các yếu tố độc lập với nhau, nhận thấy nhiệt độ và nồng độ acid trong methanol ảnh hưởng nhiều hơn thời gian thủy phân. Quá trình thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin là quá trình cắt mạch liên kết của các aglycon (anthocyanidin) với các gốc đường. Do đó, cần phải có tác nhân H⁺, nồng độ acid HCl có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất thủy phân. Ngược lại, ảnh hưởng tương hỗ của thời gian và nhiệt độ (X₁.X₂), thời gian và nồng độ acid (X₁.X₃), nhiệt độ và nồng độ acid (X₂.X₃) là không đáng kể (trị số P > 0,05), nên có thể bỏ qua trong quá trình tính toán

Bằng phương pháp qui hoạch hóa thực nghiệm mô hình bậc hai tâm xoay đã tìm được phương trình mô tả mối quan hệ hàm lượng anthocyanidin phụ thuộc vào các yếu tố như sau:

$$Y = -210,7 + 1,111.X_1 + 4,314.X_2 + 47,95.X_3 - 0,00557X_1^2 - 0,02386.X_2^2 - 10,99.X_3^2 \quad (2)$$

Bảng 3.25: Sự phù hợp của phương trình hồi quy

| C.V. (%) | R ² hiệu chỉnh | R ² dự đoán | Độ chính xác phù hợp (Adeq precision) |
|----------|---------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| 6,67 | 0,9645 | 0,9258 | 28,797 |

Giá trị độ chính xác phù hợp của các phương trình là 28,797 (> 4) cho thấy các tín hiệu là đầy đủ và mô hình là phù hợp. Bên cạnh đó, sự tương thích của mô hình còn được đánh giá thông qua hệ số R². Các giá trị R² dự đoán và R² hiệu chỉnh đều > 0,92 (đảm bảo yêu cầu giới hạn ≥ 0,80) cho thấy các dữ liệu là phù hợp với phương trình bậc hai. Giá trị hệ số biến thiên là 6,67% (đảm bảo yêu cầu <10%) cho thấy mô hình có độ tái lập tốt.

Tất cả các yếu tố được cài đặt trong khoảng khảo sát với mục tiêu cho hàm Y là thu được hàm lượng anthocyanidin lớn nhất. Kết quả từ phần mềm thu được một giải pháp duy nhất:

- Thời gian thủy phân (x₁): 99 phút
- Nhiệt độ thủy phân (x₂): 90⁰C
- Nồng độ acid HCl trong MeOH (x₃): 2,17M

Hiệu suất thủy phân

Với điều kiện tìm được hiệu suất thủy phân từ cyanidin – 3 – O – glucoside thành cyanidin đạt 91,5 – 99,2%, từ pelargonidin – 3 – O – glucoside thành pelargonidin đạt 97,3-101,2%, từ malvidin – 3 – O – glucoside thành malvidin đạt 97,2-100,5%, từ peonidin – 3 – O – glucoside thành peonidin đạt 94,5-97,5%, từ petunidin – 3 – O – glucoside thành petunidin đạt 89,5-93,0%, từ delphinidin – 3 – O – glucoside thành delphinidin đạt 94,5-98,5%. Tại điều kiện tối ưu tìm được theo phương pháp mặt mục tiêu có hiệu suất thủy phân cao có thể áp dụng để phân tích các mẫu rau, củ, quả.

Thẩm định phương pháp xác định các anthocyanin và anthocyanidin bằng HPLC

Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Bảng 3.29: Phương trình hồi quy của các anthocyanin và anthocyanidin

| Chất phân tích | Phương trình hồi quy | Hệ số tương quan |
|--------------------------|-----------------------|------------------|
| Cyanidin-3-glucoside | $y = 82524x - 1155,6$ | 0,9972 |
| Pelargonidin-3-glucoside | $y = 60107x - 2443,7$ | 0,9976 |
| Petunidin-3-glucoside | $y = 72132x - 3243,5$ | 0,9987 |
| Delphinidin-3-glucoside | $y = 57845x - 3651,6$ | 0,9990 |
| Peonidin-3-glucoside | $y = 69821x - 4500,3$ | 0,9955 |
| Malvidin-3- | $y = 78625x -$ | 0,9978 |

| | | |
|--------------|------------------------|--------|
| glucoside | 3545,8 | |
| Delphinidin | $y = 110881x - 3249,2$ | 0,9996 |
| Cyanidin | $y = 43952x - 127,66$ | 1,0000 |
| Petunidin | $y = 106479x - 316,54$ | 1,0000 |
| Pelargonidin | $y = 78235x - 224,28$ | 1,0000 |
| Peonidin | $y = 152603x - 804,09$ | 1,0000 |
| Malvidin | $y = 34717x - 42,016$ | 1,0000 |

Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là 0,05 – 0,10µg/g (anthocyanidin) và 0,1 µg/g (anthocyanin), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp trong khoảng 0,165 – 0,33 µg/g (anthocyanidin) và 0,33 µg/g (anthocyanin). Phương pháp sắc kí lỏng HPLC – PDA có độ nhạy và độ chọn lọc cao, thời gian phân tích nhanh, cho phép định lượng đồng thời 6 anthocyanidin và 6 anthocyanin trong mẫu.

Đánh giá độ chụm (độ lặp lại)

RSD nằm trong khoảng 5,26% đến 6,45%. Trong khoảng nồng độ từ 1ppm đến 10ppm, RSD cho phép của AOAC là 11% đến 7,3%. Như vậy, độ lặp của các anthocyanin nằm trong giới hạn cho phép của AOAC, cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt.

Độ lệch chuẩn lặp lại RSD(%) của cyanidin dao động từ 2,63 – 5,38%, độ lệch chuẩn lặp lại RSD(%) của peonidin từ 3,26 – 5,80%. Delphinidin, pelargonidin, malvidin và petunidin có RSD (%) lần lượt là 2,99%, 1,91% và 5,18% và 5,68%. Hàm lượng của malvidin và petunidin trong khoảng từ 2mg/100g đến dưới 4mg/100g thì RSD(%) cho phép tối đa từ 5,3% đến 7,3%. Do đó, phương pháp có độ lặp lại phù hợp với yêu cầu AOAC khi phân tích anthocyanidin trên mẫu rau, củ, quả.

Đánh giá độ thu hồi

Độ thu hồi trung bình của các anthocyanidin dao động trong khoảng từ 85,4% đến 106,5%. Trong đó độ thu hồi đạt được cao nhất là malvidin trong nền mẫu khoai, nhỏ nhất là với cyanidin trong nền mẫu mận. Theo qui định của AOAC, tại khoảng nồng độ 0,2ppm đến 4ppm, độ thu hồi của AOAC cho phép từ 80,0% đến 110,0%. Như vậy, độ thu hồi của các anthocyanidin nằm trong khoảng cho phép của AOAC, cho thấy phương pháp có độ đúng cao.

Ứng dụng phân tích mẫu thực tế

Qua phân tích 31 loại mẫu lấy ngẫu nhiên trên thị trường cho thấy: hàm lượng tổng các anthocyanidin trong rau, củ, quả trong khoảng 3-268 mg/100g. Tổng hàm lượng anthocyanidin trong dâu tây là 13,58mg/100g cao hơn kết quả nghiên cứu của Gisele A.B [17] đã công bố là 7,33mg/100g. Trong mẫu cà

chua đen, vỏ nho đen phát hiện petunidin với hàm lượng cao nhất trong vỏ nho đen 22,21mg/100g. Peonidin được phát hiện trong quả nho tím, vỏ nho đen. Malvidin có hàm lượng cao trong vỏ nho đen lên tới 191,22mg/100g. Trong vỏ nho đen tìm thấy 5 anthocyanidin phổ biến là: delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin và malvinidin. Tổng hàm lượng anthocyanidin trong vỏ nho đen khoảng 268,59mg/100g. Hai mẫu rau cải sẫm và cà chua đỏ không phát hiện anthocyanidin.

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của anthocyanin, anthocyanidin và một số mẫu rau, củ, quả

Khảo sát điều kiện tối ưu của phản ứng giữa anthocyanin/anthocyanidin và DPPH

Khi tăng nồng độ DPPH lên 400 μ M và nồng độ cyanidin-3-glucoside dưới 10 μ M thì có sự phụ thuộc tuyến tính của % ức chế DPPH vào nồng độ cyanidin-3-glucoside, khi nồng độ cyanidin-3-glucoside tăng thì % ức chế tăng, phù hợp với nguyên lý của phương pháp.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng trong khoảng 10 - 60 phút cho thấy: từ 10 – 25 phút, độ hấp thụ quang có sự giảm nhanh, đây là khoảng thời gian phản ứng đang xảy ra, còn từ 25 – 35 phút độ hấp thụ quang có sự thay đổi không đáng kể, sau 35 phút, độ hấp thụ quang giảm theo thời gian. Do đó, thời gian phản ứng được chọn từ 25 – 35 phút.

Xác định hoạt tính chống oxy hóa của một số anthocyanin và anthocyanidin

Trong số 2 aglycon được thử, delphinidin có hoạt tính cao hơn cyanidin. Monoglucoside của cyanidin (cyanidin-3-glucoside) có hoạt tính tương tự như aglycon của nó (cyanidin). Điều đó cho thấy gốc đường không ảnh hưởng đến hoạt tính của cyanidin và cyanidin-3-glucoside. Cyanidin-3-glucoside có hoạt tính cao hơn pelargonidin-3,5-glucoside. So với vitamin C, delphinidin, cyanidin và cyanidin-3-glucoside có hoạt tính cao hơn một chút. Pelargonidin-3,5-diglucoside có hoạt tính thấp hơn vitamin C

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của một số mẫu thực phẩm

Do sắc tố nằm chủ yếu ở phần vỏ nên các mẫu vỏ quả (vỏ nho đen, vỏ măng cụt) có hàm lượng các anthocyanidin tương đối cao và hoạt tính cũng mạnh nhất. Các mẫu nguyên quả, cây (mận, thanh mai, bắp cải tím) chứa hàm lượng anthocyanidin thấp hơn và hoạt tính cũng thấp hơn. Điều này có thể do các mẫu này chứa một lượng nước tương đối lớn. Vỏ nho đen chứa đầy đủ cả sáu thành phần anthocyanidin chính. Đáng chú ý là vỏ măng cụt thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao mặc dù chỉ chứa thành phần chính là cyanidin. Loại quả này khá phổ biến ở miền Nam Việt nam. Đây là cơ sở để khai thác, phát triển nguồn nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm chức năng chống lão hóa.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở các kết quả thực nghiệm nghiên cứu phương pháp tách, chiết và xác định các chất chống oxy hóa trong một số loại rau, củ, quả bằng phương pháp sắc ký, chúng tôi thu được những kết quả sau:

1) Tối ưu hóa được điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD (HPLC-DAD) và sắc ký lỏng siêu hiệu năng với detector khối phổ (UPLC-

MS/MS) để tách, nhận biết và định lượng đồng thời các anthocyanin và anthocyanidin:

- Điều kiện HPLC-DAD được tối ưu hóa bằng phương pháp mặt mục tiêu sử dụng mô hình bậc hai tâm xoay bao gồm: detector DAD bước sóng phát hiện tại 520 nm, cột tách C₁₈ (250mm × 4,6mm × 5μm) và tiền cột tương ứng, pha động kênh B là acetonitril và kênh A là acid formic 10% theo chương trình gradient bắt đầu với 10% ACN, tốc độ dòng 0,8 ml/phút.

- Điều kiện UPLC-MS/MS bao gồm: Cột C₁₈ (100 mm x 4,6 mm; 2,5 μm) và tiền cột tương ứng. Pha động kênh A là acid formic 0,05%, kênh B là ACN với chương trình rửa giải gradient. Tốc độ dòng: 0,4 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu: 5 μL

2) Tối ưu hóa được quy trình xử lý mẫu để tách, chiết các anthocyanin và anthocyanidin trong nền mẫu rau, củ, quả

- Điều kiện chiết các anthocyanin: dung môi MeOH, nhiệt độ 100 °C, thời gian: 30 phút, tỉ lệ dung môi : mẫu (100:1, v/w)

- Điều kiện thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin trong dịch chiết anthocyanin: dung môi thủy phân HCl 2,4M trong MeOH, nhiệt độ 90 °C, thời gian 60 phút.

- Quy trình chiết và thủy phân anthocyanidin trực tiếp từ nền mẫu bằng phương pháp mặt mục tiêu sử dụng mô hình bậc hai tâm xoay. Điều kiện tối ưu bao gồm: nhiệt độ 90⁰C, thời gian 99 phút, nồng độ acid HCl 2,17M trong MeOH. Hiệu suất thủy phân trung bình 91,5 – 106,7%.

3) **Đánh giá kết quả phương pháp phân tích** thông qua: khoảng tuyến tính từ 0,1 – 10μg/mL, giới hạn phát hiện (MDL) (0,05 – 0,10μg/g), giới hạn định lượng (MQL) (0,17 – 0,33μg/g), độ lệch chuẩn tương đối (1,91 – 5,80%), hiệu suất thu hồi từ 85,4% – 106,5%.

4) **Áp dụng quy trình phân tích định lượng 6 anthocyanidin phổ biến** trong 31 đối tượng mẫu thực thu được hàm lượng từ 2,90 – 268,59mg/100g.

5) **Bước đầu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của một số anthocyanin và anthocyanidin** theo phương pháp khử gốc tự do DPPH đã thu được trật tự về hoạt tính của các chất như sau: delphinidin > cyandin, cyanidin-3-glucoside > pelargonidin-3,5-diglucoside. Cyanidin, cyanidin-3-glucoside và delphinidin có hoạt tính cao hơn một chút so với chất đối chứng dương vitamin C.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- [1]. Lê Việt Ngân, Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Xuân Trung, Lê Đình Chi (2016), Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 3 anthocyanidin trong một số loại rau, củ, quả bằng kỹ thuật HPLC, *Tạp chí Dược học*, số 484, trang 26-30.
- [2]. Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Xuân Trung, Tăng Thị Phương (2016), Xác định đồng thời 5 anthocyanidin trong một số loại rau, củ, quả bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS, *Tạp chí Khoa học Đại học quốc gia hà nội*, tập 32, số 4, trang 305-309.
- [3]. Vũ Thị Trang, Chu Thị Thanh, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Xuân Trung (2018), Tối ưu hóa điều kiện thủy phân anthocyanin trong đỗ đen Việt nam sử dụng phương pháp mặt mục tiêu, *Tạp chí phân tích Hóa lý và sinh học*, T23, số 2, trang 42-48.
- [4]. Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Đức Hảo, Nguyễn Hoài Thu, Lê Hoàng Đức, Nguyễn Xuân Trung (2018), Xác định tính chống oxy hóa của một số anthocyanin và anthocyanidin bằng phương pháp đo quang sử dụng phản ứng với 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), *Tạp chí phân tích hóa, lý và sinh học*, tập 23, số 5, trang 33-38.
- [5]. Chu Thị Thanh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Hoàng Lan, Vũ Thị Trang, Lê Thị Thúy (2018), Nghiên cứu quá trình chiết rung siêu âm chất màu thực phẩm anthocyanin từ đỗ đen, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, tháng 12/2018, trang 83-88.
- [6]. Vu Thi Trang, Le Hoang Duc, Nguyen Thi Hoai Thu, Le Thi Hong Hao, Nguyen Xuan Trung, Multiseparation of anthocyanins and anthocyanidins by high performance liquid chromatography combined with response surface methodology, *Health risk analysis*, xác nhận đăng bài số 03/19 ngày 17/7/2019.