

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ FLAVONOID TRONG NƯỚC CAM VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

STUDY ON SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SOME FLAVONOIDS
IN VIETNAMESE ORANGE JUICE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyễn Đức Thanh^{1,4,*}, Nguyễn Thị Quyên², Nguyễn Thị Vân Anh²,
Lê Việt Ngân³, Lê Thị Hồng Hào³, Tạ Thị Thảo¹

DOI: <http://doi.org/10.57001/huih5804.2024.395>

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã phát triển phương pháp sắc ký lỏng với detector mảng photodiode để định lượng đồng thời 4 flavonoid trong nước cam bao gồm Naringin, Hesperidin, Neohesperidin và Quercetin. Mẫu được hòa tan trong methanol, lọc rồi bơm vào sắc ký với các điều kiện: cột Waters Bridge C18 (4,6mm x 150mm; 5µm), pha động gồm acid phosphoric 0,1% và ACN sử dụng chương trình gradient, bước sóng phát hiện 285nm. Đường chuẩn được xây dựng cho 4 chất trong khoảng 0,1 - 200mg/L với $0,9995 \leq R^2 \leq 1$. MDL và MQL của naringin, hesperidin, neohesperidin, quercetin lần lượt là 0,12mg/L và 0,40mg/L; 0,17mg/L và 0,57mg/L; 0,13mg/L và 0,44mg/L; 0,18mg/L và 0,61mg/L. Phương pháp đã được thẩm định đáp ứng các yêu cầu của AOAC và được áp dụng để xác định đồng thời naringin, hesperidin, neohesperidin và quercetin trong 45 mẫu nước cam của Việt Nam. Naringin, neohesperidin và quercetin không được phát hiện trong các mẫu cam của Việt Nam. Hàm lượng hesperidin thay đổi tùy theo giống cam và vùng, hàm lượng cao nhất được tìm thấy trong cam trồng ở Quảng Ninh.

Từ khóa: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), flavonoid, nước cam.

ABSTRACT

The capabilities of photodiode array detection techniques were investigated for the high performance liquid chromatographic determination of 4 flavonoids including Naringin, Hesperidin, Neohesperidin and Quercetin in orange juice. The sample was dissolved in methanol, filtered and then pumped into the LC: Waters Bridge C18 column (4.6mm x 150mm; 5µm), mobile phase including 0.1% phosphoric acid and ACN uses gradient program, 285nm wavelength detector. The linearity of four substances in the range of 0.1 - 200mg/L with $0.9995 \leq R^2 \leq 1$. MDL and MQL respectively of naringin, hesperidin, neohesperidin, quercetin were 0.12mg/L and 0.40mg/L; 0.17mg/L and 0.57mg/L; 0.13mg/L and 0.44mg/L; 0.18mg/L and 0.61mg/L. The validated method was applied to simultaneously determine naringin, hesperidin, neohesperidin, and quercetin in 45 Vietnamese orange juice samples. Naringin, neohesperidin, and quercetin were not detected in the Vietnamese orange samples. The content of hesperidin varied depending on the orange variety and region. The highest in oranges grown in Quang Ninh.

Keywords: High-performance liquid chromatography (HPLC), flavonoid, orange juice.

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

³Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia

⁴Học viện Quân y

*Email: nguyenducthanh@vmmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 24/6/2024

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 15/10/2024

Ngày chấp nhận đăng: 28/11/2024

1. MỞ ĐẦU

Cam là là một trong những loại cây ăn quả chủ lực trong ngành nông nghiệp Việt Nam. Các flavonoid là hợp chất ngoại sinh được hấp thụ thông qua ăn uống và được coi là chất chống oxy hóa không phải enzym [1]. Hesperidin đã được sử dụng làm thuốc điều trị từ lâu, có tác dụng giảm phù nề, chống viêm [2]. Naringin có tác dụng tốt trên người mỡ máu cao, béo phì, có tác dụng hạ đường huyết, chống viêm... [3]. Đối với neohesperidin, đây là một chất quen thuộc trong công nghiệp dược phẩm và thực phẩm với công dụng là một chất tạo ngọt, tăng hương vị, tá dược làm giảm vị đắng của thuốc. Quercetin được chứng minh là có tác dụng kháng virus [4].

Naringin, hesperidin, neohesperidin là các flavonoid đặc trưng của loài cam đã được tìm thấy nhiều trong nước cam. Ở một số nghiên cứu khác, quercetin cũng được xác định có mặt trong nước cam dưới dạng rutin mặc dù flavonoid này là hoạt chất đặc trưng cho loài bưởi [5].

Trên thế giới, đã có nhiều công bố về xác định các chất thuộc nhóm flavonoid trong cam bằng phương pháp HPLC. Belajova E và cộng sự đã xác định các phenolic trong nước ép cam bằng HPLC-DAD với cột C6-phenyl (150 x 3mm; 5 μ m). Mẫu được lọc qua giấy lọc rồi được tiêm vào hệ thống, các flavonoid được tách bằng chương trình gradien pha động với tốc độ dòng 0,8 mL/phút. LOD và LOQ của naringin, hesperidin, neohesperidin, quercetin lần lượt là 1,25 và 2,5mg/L; 1,00 và 2,5mg/L; 1,00 và 2,5mg/L; 2,5mg và 5,0mg/L. Hệ số xác định (R^2) của cả bốn chất đều nằm trong khoảng $0,99 \leq R^2 \leq 1$ [6]. Silva và cộng sự đã tiến hành phân tích flavonoid trong nước cam Brazil: lấy 400g nước cam trộn với 300mL ethyl acetat và chiết lỏng - lỏng 40 phút rồi cô chân không ở 40°C. Hòa lẫn với 10mL methanol, lọc rồi tiêm vào hệ HPLC-DAD: cột C18 (55 x 4mm, 3 μ m), gradien pha động với tổng thời gian 50 phút và tốc độ dòng 0,3mL/phút [7].

Tại Việt Nam, Lưu Minh Châu và cộng sự đã thực hiện xác định flavonoid tổng số trong vỏ và dịch quả Cam sành bằng UV-Vis [8]. Chưa có công bố nào nghiên cứu xác định đồng thời hàm lượng các flavonoid trong nước Cam Việt Nam. Hơn nữa, các flavonoid có thể là các chất chỉ dấu trong việc nhận diện vùng trồng Cam, vì vậy, nghiên cứu này đã phát triển phương pháp HPLC-PDA để ứng dụng định lượng đồng thời 4 flavonoid gồm naringin, hesperidin, neohesperidin và quercetin trong nước cam ép từ một số giống cam được trồng phổ biến tại Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

Các chất chuẩn Naringin, Hesperidin, Neohesperidin và Quercetin độ tinh khiết $\geq 95\%$, các dung môi methanol, acid phosphoric, acetonitril đều có xuất xứ từ Merck (Đức). Nước cất hai lần được chuẩn bị bằng hệ thống Milli-Q tại Viện kiểm nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia.

Dung dịch chuẩn gốc từng chất nồng độ 1000ppm được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng 25mg chất chuẩn (có tính đến độ tinh khiết) trên cân phân tích có độ chính xác 0,1mg, hòa tan và định mức đến thể tích 25,00ml bằng methanol.

Dung dịch hỗn hợp chuẩn trung gian có nồng độ 100ppm được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc với dung môi methanol. Các dung dịch hỗn hợp chuẩn làm việc nồng độ từ 0,1 đến 100ppm mỗi chất được pha loãng từ dung dịch hỗn hợp chuẩn trung gian bằng dung môi methanol.

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC của hãng Waters (Mỹ) được trang bị detector PDA; cột sắc ký và tiền cột tương ứng, thể tích tiêm mẫu 10 μ L. Thiết bị được đặt tại Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát lựa chọn các điều kiện phân tích HPLC

Để tối ưu hóa quá trình tách 4 flavonoid cũng như điều kiện thực tế tại phòng thí nghiệm, dựa vào khả năng tách, thời gian lưu và hình dáng peak để chọn điều kiện phù hợp. Tiến hành khảo sát các điều kiện sau:

Lựa chọn bước sóng phát hiện bằng quét phổ UV-Vis của naringin, hesperidin, neohesperidin; quercetin trong khoảng 200 - 800nm, chọn cực đại hấp thụ cho mỗi chất.

Với pha tĩnh tiến hành khảo sát trên 3 loại cột khác nhau: (a) Symmetry® C18 (4,6x150mm, 5 μ m); (b) SunFire® C18 (4,6x150mm, 5 μ m); (c) XBridge® C18 (4,6x150mm, 5 μ m).

Khảo sát pha động với hệ dung môi Kênh A là acid phosphoric 0,1% và Kênh B là ACN với 3 chương trình đẳng dòng: (a) 100%B; (b) A/B = 70/30; (c) A/B = 50/50 và với 2 chương trình gradient như bảng 1.

Khảo sát tốc độ dòng 0,8; 1,0; 1,2mL/phút. Để chọn tốc độ dòng thích hợp, đánh giá ảnh hưởng của tốc độ dòng đến tín hiệu nhiễu nền (S/N), hệ số đối xứng (Symmetry Factor), độ rộng chân peak (Width 50%).

Bảng 1. Chương trình gradient

| Thời gian (phút) | Chương trình Gradient 1 | | | Chương trình Gradient 2 | | |
|------------------|-------------------------|----------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------|
| | Tốc độ dòng (mL/phút) | Kênh A (% v/v) | Kênh B (% v/v) | Tốc độ dòng (mL/phút) | Kênh A (% v/v) | Kênh B (% v/v) |
| 0,00 | 1,00 | 90 | 10 | 1,00 | 90 | 10 |
| 7,00 | 1,00 | 80 | 20 | 1,00 | 80 | 20 |
| 16,00 | 1,00 | 80 | 20 | 1,00 | 65 | 35 |
| 18,00 | 1,00 | 0 | 100 | 1,00 | 0 | 100 |
| 22,00 | 1,00 | 0 | 100 | 1,00 | 0 | 100 |
| 22,10 | 1,00 | 90 | 10 | 1,00 | 90 | 10 |
| 26,00 | 1,00 | 90 | 10 | 1,00 | 90 | 10 |

2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu như sau: Cam được gọt vỏ, ép lấy nước, đồng nhất mẫu, hút chính xác 5mL mẫu vào bình định mức 25mL, định mức bằng dung môi hòa tan (methanol/ethyl acetat/acetonitril), lắc (lắc tay/lắc ngang/lắc vortex/ rung siêu âm) trong thời gian 5/10/20 phút. Dung dịch được lọc qua màng lọc 0,45µm rồi tiêm vào hệ thống HPLC.

2.2.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích được xác nhận giá trị sử dụng thông qua việc đánh giá các thông số sau [9]:

Độ ổn định của hệ thống sắc ký được đánh giá qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) không quá 2% với việc tiêm lặp lại 6 lần dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ 200ppm vào hệ thống sắc ký.

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích mẫu trắng (dung môi pha động; dung môi chiết mẫu), mẫu chuẩn và mẫu thực thêm chuẩn.

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

Độ lặp lại được thực hiện trên mẫu thực và tiến hành làm thí nghiệm 6 lần lặp lại. Với chất không có trong nền mẫu thực, thêm 0,6mg/L chất chuẩn vào mẫu thực để đánh giá độ thu hồi, yêu cầu độ lệch chuẩn tương đối không vượt quá 11%.

Độ thu hồi xác định bằng cách thêm vào mẫu thực 3 mức nồng độ 0,6µg/mL, 6µg/mL, 60µg/mL đối với

naringin, neohesperidin, quercetin; 35µg/mL, 140µg/mL, 280µg/mL đối với hesperidin. Mỗi mức nồng độ làm lặp lại 3 lần. Theo AOAC với yêu cầu độ thu hồi tại mức hàm lượng 100ppb - 10ppm phải đạt từ 80 - 110 %.

Xử lý số liệu bằng phần mềm Empower 3 và Microsoft Excel 2020.

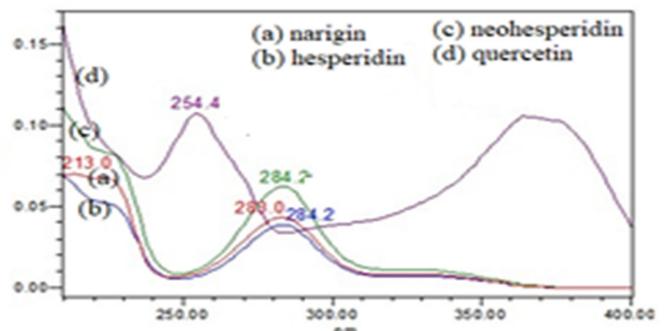
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện phân tích flavonoid bằng HPLC

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Hình 1 thể hiện phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của naringin, hesperidin, neohesperidin có cực đại hấp thụ lần lượt ở 283,0nm; 284,2nm; 284,2nm và quercetin có 2 cực đại tại 254,4nm và 364,2nm.

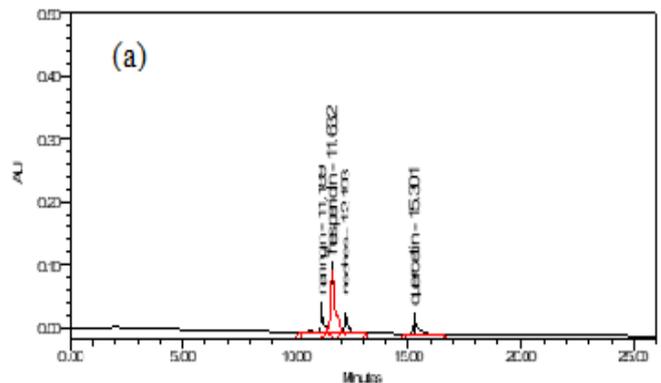
Để đảm bảo độ nhạy trong phân tích và hạn chế ảnh hưởng của nền mẫu và dung môi trong nghiên cứu này bước sóng 285nm được sử dụng để xác định naringin, hesperidin, neohesperidin, sử dụng bước sóng 254nm để xác định quercetin.

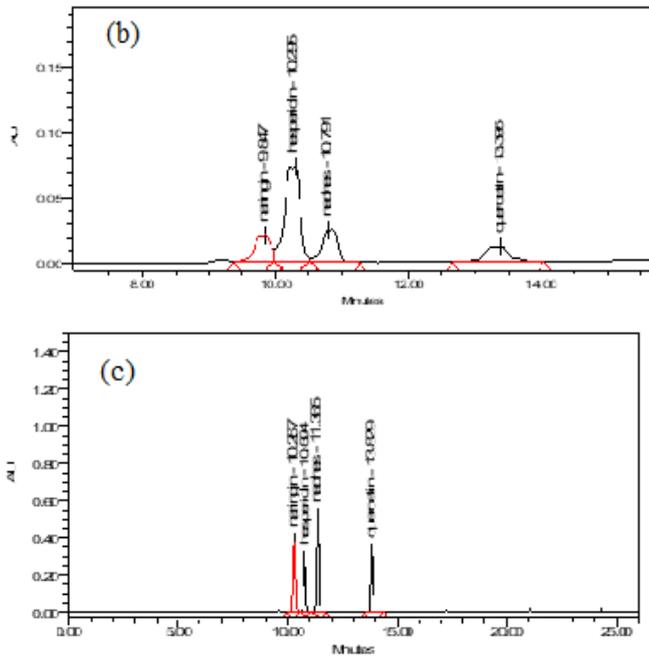


Hình 1. Phổ UV-Vis của (a) naringin, (b) hesperidin, (c) neohesperidin, (d) quercetin

3.1.2. Lựa chọn cột tách C18

Kết quả khảo sát với 3 loại cột C18 gồm: (a) Symmetry® C18 (4,6x150mm, 5µm); (b) SunFire® C18 (4,6x150mm, 5µm); (c) XBridge® C18 (4,6x150mm, 5µm) được thể hiện trên hình 2.



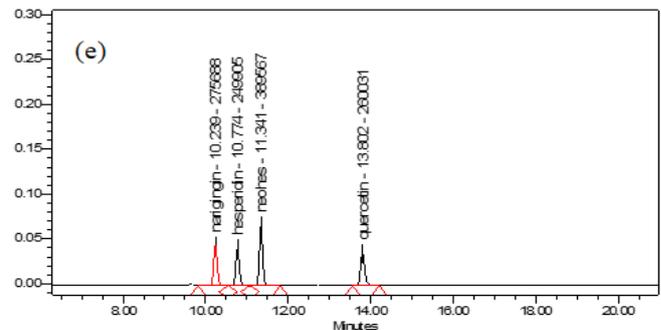
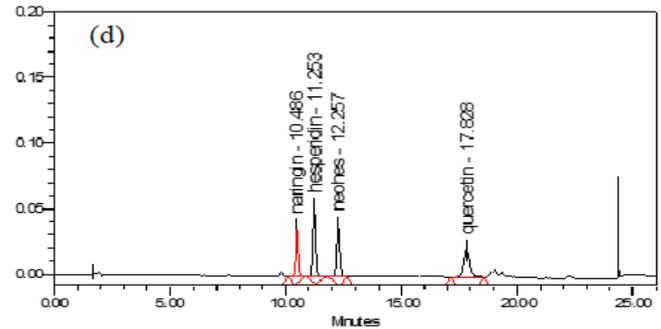
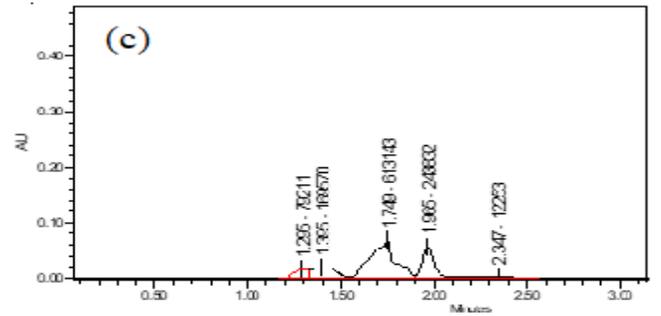
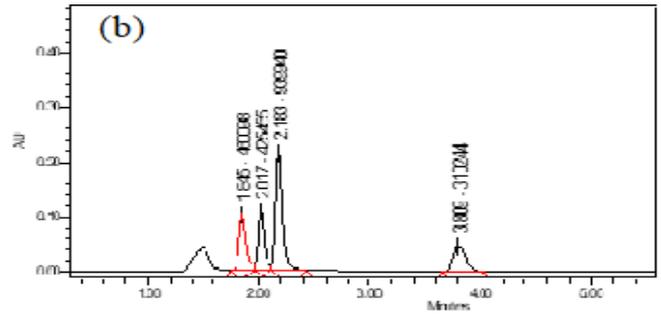
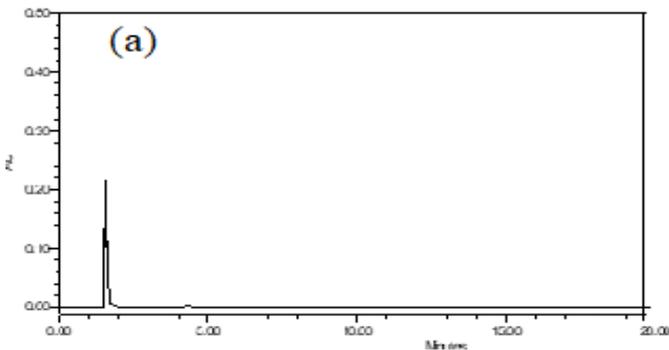


Hình 2. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn của 3 cột khảo sát

Trên cột (a) naringin, hesperidin, neohesperidin chưa tách hoàn toàn ra khỏi nhau, trên cột (b) các chất đã tách ra khỏi nhau tốt hơn nhưng peak của naringin không cân xứng và peak của quercetin có 2 đỉnh (chê peak). Cột (c) cho khả năng tách tốt, các chất tách nhau hoàn toàn, peak nhọn, đối xứng. Do đó, cột XBridge® C18 (4,6x150mm, 5µm) được lựa chọn cho nghiên cứu này.

3.1.3. Lựa chọn pha động

Hiệu quả tách sắc ký phụ thuộc phần lớn vào pha động. Pha động có thể ảnh hưởng đến: độ chọn lọc của hệ pha, thời gian lưu giữ của chất phân tích, độ rộng chân peak sắc ký... Kết quả ở hình 3 cho thấy, chương trình gradient tách tốt hơn nhiều so với chương trình đẳng dòng. Chương trình đẳng dòng cho khả năng tách các peak phân tích rất kém, thời gian lưu ngắn từ 1,8 - 3,8 phút khó tách khỏi các tạp chất khi phân tích mẫu thực. Chương trình gradient thu được các peak cân đối, nhọn, tín hiệu đường nền thấp, các chất tách tốt ra khỏi nhau.



Hình 3. Sắc ký đồ với các pha động (a) ACN; (b) acid phosphoric 0,1%: ACN= 70:30 (c) acid phosphoric 0,1%: ACN= 50:30; (d) gradient 1; (e) gradient 2

Với 2 chương trình gradient, gradient 2 có nền ổn định hơn, độ rộng chân peak nhỏ hơn, tổng thời gian phân tích ngắn hơn. Do vậy, chương trình gradient 2 được lựa chọn cho nghiên cứu này.

3.1.4. Khảo sát lựa chọn tốc độ dòng pha động

Khi thay đổi tốc độ dòng pha động từ 0,8; 1,0 và 1,2mL/phút, các sắc ký đồ thu được đều cho khả năng tách tốt. Với tốc độ dòng 1mL/phút cho tỉ lệ S/N lớn nhất

ở cả bốn chất, hệ số đối xứng gần 1 nhất và độ rộng chân peak nhỏ nhất. Do vậy, để thu được sắc ký đồ với các peak gọn, tách tốt, thời gian phân tích vừa phải, tốc độ 1mL/phút được lựa chọn.

3.1.5. Xây dựng đường chuẩn

Tiến hành đo dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi từ 0,1 - 200mg/L với cả bốn chất. Đường chuẩn của các chất được thể hiện trong Bảng 2. Tất cả các đường chuẩn đều có hệ số tương quan $R^2 > 0,9997$, đạt yêu cầu của AOAC.

Bảng 2. Đường chuẩn xác định 4 flavonoid

| Chất phân tích | Đường chuẩn* | R^2 |
|----------------|-----------------------|--------|
| Naringin | $y = 16581x - 266,93$ | 0,9999 |
| Hesperidin | $y = 12741x + 1318,9$ | 1 |
| Neohesperidin | $y = 21239x - 622,24$ | 0,9998 |
| Quercetin | $y = 16311x - 902,92$ | 0,9998 |

(* y là diện tích peak, x là nồng độ chất phân tích (mg/L))

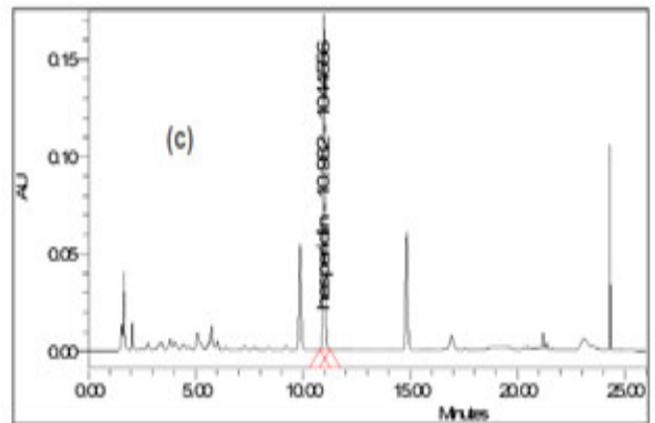
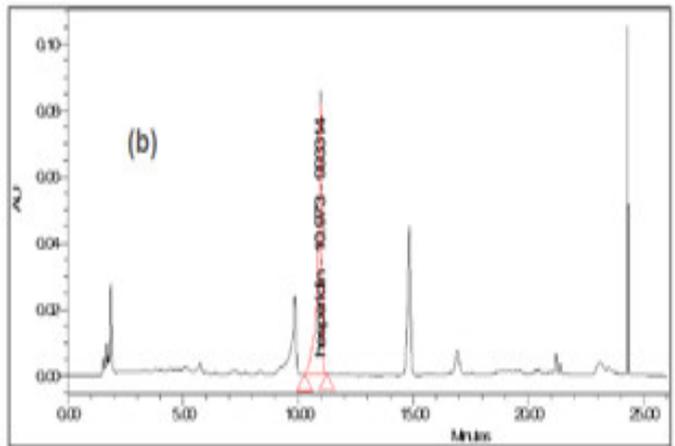
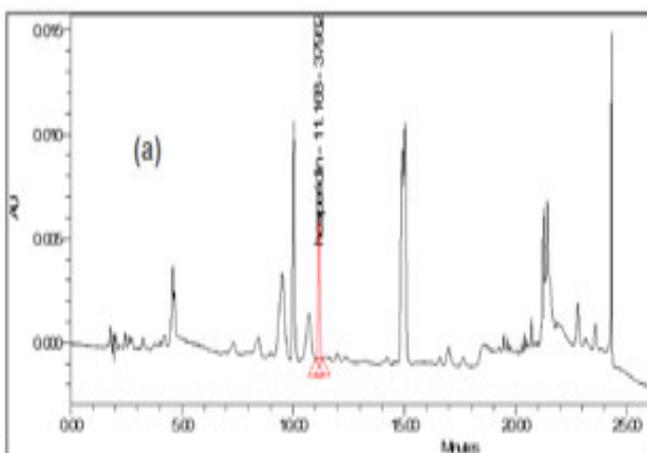
3.2. Nghiên cứu lựa chọn phương pháp xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi hòa tan

Cả bốn chất đều khó tan trong nước, tan tốt trong dung môi hữu cơ. Vì vậy, tiến hành khảo sát 3 dung môi hòa tan: methanol, ethyl acetat, ACN.

Kết quả sắc ký đồ trên hình 4 cho thấy, trên mẫu thực chỉ phát hiện thấy hesperidin, khi hòa tan bằng ethyl acetat không loại bỏ được hết tạp chất nên peak lẫn rất nhiều tạp, hàm lượng hesperidin thấp hơn rất nhiều so với 2 dung môi còn lại. Với dung môi methanol cho peak sắc ký đối xứng và độ rộng chân peak nhỏ hơn, hàm lượng hesperidin cao hơn so với ACN.

Vì vậy, nghiên cứu đã lựa chọn methanol là dung môi hòa tan cho các mẫu nước cam.



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu nước cam được hòa tan trong 3 dung môi: (a) ethyl acetat, (b) ACN, (c) methanol

3.2.2. Khảo sát kỹ thuật hòa tan

Kỹ thuật hòa tan mẫu ảnh hưởng nhiều đến khả năng phân tán và tách hoạt chất cần phân tích ra khỏi nền mẫu. Dựa vào điều kiện phòng thí nghiệm, tiến hành khảo sát 4 cách hòa tan: lắc tay, lắc ngang, lắc vortex và rung siêu âm.

Với cả bốn kỹ thuật, hiệu suất thu được khác nhau không đáng kể. Tuy nhiên, lắc tay cho năng suất làm việc kém, vortex mỗi lần chỉ được tối đa 2 mẫu. Do vậy, để thuận tiện và phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm nghiên cứu lựa chọn kỹ thuật lắc ngang để tối ưu khả năng xử lý mẫu, tăng năng suất làm việc, ít tốn kém.

3.2.3. Khảo sát thời gian hòa tan mẫu

Trên cùng một nền mẫu nước cam tự nhiên, tiến hành lắc ngang bằng methanol ở các mức thời gian khác nhau: 5phút, 10 phút, 20 phút. Hiệu suất khi lắc 5 phút thấp hơn nhiều so với 2 mức còn lại. Ở mức thời gian 10 phút và 20 phút hiệu suất tương đương nhau. Vì vậy để tiết kiệm thời gian xử lý mẫu, nghiên cứu đã lựa chọn thời gian lắc là 10 phút.

3.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

3.3.1. Độ ổn định hệ thống

Thực hiện tiêm lặp lại 6 lần vào nền mẫu hỗn hợp chuẩn có nồng độ 200ppm.

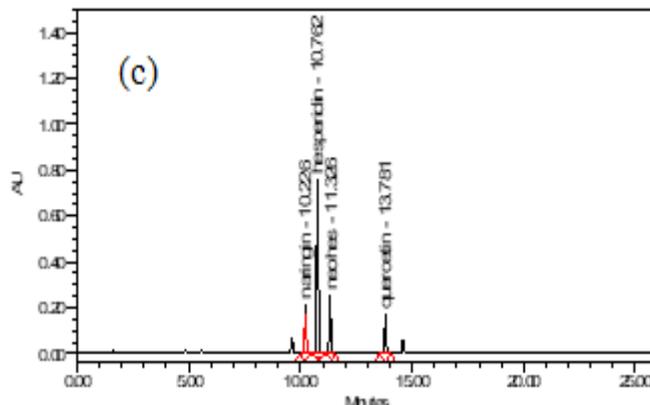
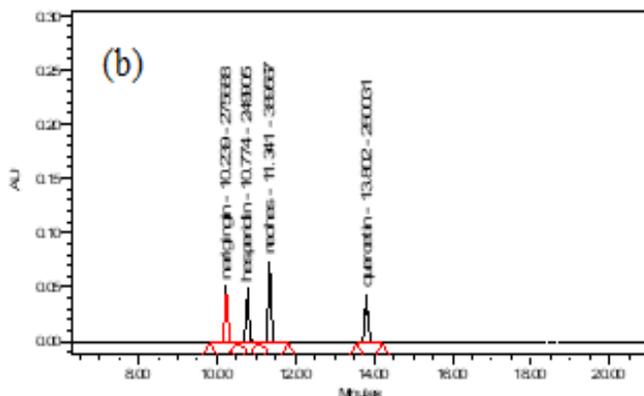
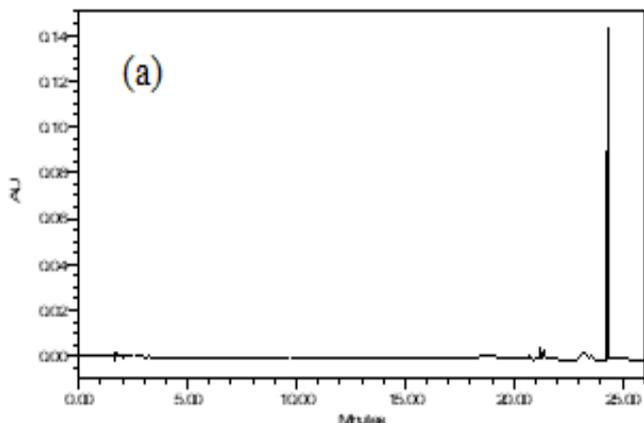
Bảng 3. Kết quả độ ổn định hệ thống

| Chất phân tích | RSD _{tr} (%) | RSD _{Speak} (%) |
|----------------|-----------------------|--------------------------|
| Naringin | 0,09 | 0,49 |
| Hesperidin | 0,09 | 0,94 |
| Neohesperidin | 0,07 | 0,44 |
| Quercetin | 0,07 | 0,53 |

Kết quả ở bảng 3 cho thấy giá trị RSD theo thời gian lưu và theo diện tích peak của cả bốn chất đều nhỏ hơn 2%, đáp ứng theo yêu cầu của AOAC.

3.3.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

Trên sắc ký đồ ở hình 5 của mẫu chuẩn xuất hiện peak tại thời điểm 10,2 phút của naringin, 10,7 phút của hesperidin, 11,3 phút của neohesperidin và 13,8 phút của quercetin. Mẫu thêm chuẩn cho tín hiệu chất phân tích tại cùng thời gian lưu của mẫu chuẩn và sai lệch thời gian lưu không quá 1%. Mẫu trắng không cho tín hiệu của chất phân tích. Như vậy, phương pháp đã xây dựng có độ đặc hiệu cao.



Hình 5. Sắc ký đồ (a) mẫu trắng, (b) mẫu chuẩn và (c) mẫu thử thêm chuẩn

3.3.3. Giới hạn phát hiện (MDL), giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

Sau khi phân tích lặp lại 10 lần mẫu thực có nồng độ thấp (trong khoảng 5 - 7 lần MDL ước lượng), giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của naringin, hesperidin, neohesperidin, quercetin được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp

| Chất phân tích | MDL (mg/L) | MQL (mg/L) | R |
|----------------|------------|------------|------|
| Naringin | 0,12 | 0,40 | 8,07 |
| Hesperidin | 0,17 | 0,57 | 6,87 |
| Neohesperidin | 0,13 | 0,44 | 6,48 |
| Quercetin | 0,18 | 0,61 | 4,18 |

Các giá trị của hệ số R đều nằm trong giới hạn yêu cầu $4 \leq R \leq 10$ của AOAC.

3.3.4. Độ lặp lại

Kết quả ở bảng 5 cho thấy phương pháp có độ lặp lại nằm trong khoảng giới hạn cho phép với RSD đạt từ 1,35 - 2,48% (n = 6) nhỏ hơn 11%, đáp ứng yêu cầu của AOAC khi phân tích đồng thời naringin, hesperidin, neohesperidin và quercetin trên nền mẫu nước cam.

Bảng 5. Độ lặp lại của phương pháp

| Chất phân tích | SD | RSD(%) |
|----------------|------|--------|
| Naringin | 0,07 | 2,07 |
| Hesperidin | 7,61 | 2,02 |
| Neohesperidin | 0,08 | 2,48 |
| Quercetin | 0,05 | 1,35 |

3.3.5. Độ thu hồi

Kết quả thẩm định cho thấy ở các mức nồng độ thấp, trung bình và cao, phương pháp có độ đúng từ 99,23 - 105,26% với naringin, 98,22 - 104,20% với hesperidin, 92,34 - 104,32% với neohesperidin, 86,96 - 100,62% với

quercetin. Giá trị RSD của các chất từ 0,09 - 3,01%. Kết quả phù hợp với yêu cầu thẩm định phương pháp theo AOAC.

Bảng 6. Độ thu hồi của phương pháp

| Chất phân tích | Lượng thêm chuẩn (mg/L) | Độ thu hồi (R%) | RSD (%) |
|----------------|-------------------------|-----------------|---------|
| Naringin | 0,6 | 105,26 | 2,17 |
| | 6,0 | 99,23 | 0,37 |
| | 60,0 | 101,33 | 0,14 |
| Hesperidin | 35 | 98,22 | 0,34 |
| | 140 | 104,20 | 0,09 |
| | 280 | 92,70 | 0,20 |
| Neohesperidin | 0,6 | 104,32 | 2,42 |
| | 6,0 | 96,34 | 0,60 |
| | 60,0 | 92,34 | 0,17 |
| Quercetin | 0,6 | 100,62 | 0,70 |
| | 6 | 86,96 | 3,01 |
| | 60 | 87,07 | 1,58 |

3.4. Xác định hàm lượng flavonoid trong một số giống cam trồng tại Việt Nam

Áp dụng quy trình đã xây dựng và xác nhận giá trị sử dụng để phân tích hàm lượng flavonoid có trong nước cam được lấy theo giống và địa phương khác nhau tại Việt Nam gồm 9 nhóm mẫu. Các mẫu đều được lấy mẫu, mã hóa và lưu theo đúng quy trình của Viện Kiểm nghiệm Vệ sinh an toàn thực phẩm Quốc gia. Kết quả phân tích flavonoid trong 45 mẫu cam của các giống cam khác nhau gồm cam Vinh (V), cam Sành (S), cam Xã Đoài (XD), trồng tại các vùng địa lý khác nhau gồm Lục Nam - Bắc Giang (BG), Kim Động - Hưng Yên (HY), Hàm Yên - Tuyên Quang (TQ), Vân Đồn - Quảng Ninh (QN), Trà Ôn - Vĩnh Long (VL), Anh Sơn - Nghệ An (NA), Bắc Quang - Hà Giang (HG), Cao Phong - Hòa Bình (HB) gồm 9 nhóm mẫu, mỗi nhóm lấy 5 mẫu.

Bảng 7. Kết quả phân tích trên một số nền mẫu nước cam

| Nhóm mẫu | Naringin (mg/L) | Hesperidin (mg/L) | Neohesperidin (mg/L) | Quercetin (mg/L) |
|----------|-----------------|-------------------|----------------------|------------------|
| BG.V | KPH* | 233,39 ± 77,96 | KPH** | KPH*** |
| HY.V | KPH | 445,59 ± 159,44 | KPH | KPH |
| TQ.V | KPH | 444,58 ± 217,13 | KPH | KPH |
| QN.V | KPH | 693,70 ± 135,21 | KPH | KPH |
| TQ.S | KPH | 351,74 ± 61,023 | KPH | KPH |
| VL.S | KPH | 203,84 ± 54,36 | KPH | KPH |

| | | | | |
|-------|-----|-----------------|-----|-----|
| NA.XD | KPH | 276,40 ± 72,64 | KPH | KPH |
| HG.XD | KPH | 610,99 ± 113,29 | KPH | KPH |
| HB.CP | KPH | 479,99 ± 146,55 | KPH | KPH |

(KPH: nồng độ dưới MQL; (*): 0,40mg/L; (**): 0,43mg/L; (***) : 0,60mg/L)

Kết quả trong bảng 7 cho thấy, trong các mẫu cam Việt Nam đem phân tích, không phát hiện thấy naringin, neohesperidin và quercetin, chỉ phát hiện được hesperidin. Hàm lượng hesperidin phụ thuộc giống cam và vùng địa lý. Hàm lượng hesperidin trong các mẫu cam nằm trong khoảng 203,84 - 693,70mg/L và mẫu có hàm lượng cao nhất là cam Vinh trồng tại Quảng Ninh.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình xác định đồng thời naringin, hesperidin, neohesperidin và quercetin trong nước cam bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector diod quang (HPLC - PDA) với khoảng tuyến tính rộng từ 0,1mg/L - 200mg/L. Quy trình xử lý mẫu đơn giản, dễ dàng triển khai ở hầu hết các cơ sở kiểm nghiệm. Phương pháp đã được xác nhận giá trị sử dụng và áp dụng để phân tích mẫu nước cam Việt Nam đều không phát hiện naringin, neohesperidin và quercetin, hàm lượng hesperidin thay đổi theo giống cam và vùng địa lý.

Trong thời gian tới, tiếp tục tiến hành định lượng flavonoid trong các mẫu nước cam tự nhiên với số lượng lớn hơn và định lượng trong mẫu nước cam thương mại, từ đó ứng dụng các thuật toán học máy để có thể phân biệt được cam ở các vùng trồng và phân biệt giữa cam tự nhiên với cam thương mại dựa trên thành phần hóa học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. María d.M.C, Mónica Z, Eva GM, Nuria MN, "Free and Bound Phenolic Compounds Present in Orange Juice By-Product Powder and Their Contribution to Antioxidant Activity," *Antioxidants*, 11(9): 1748, 2022.
- [2]. Tejada S, Pinya S, Martorell M, Capó X, Tur JA, Pons A, Sureda A, "Potential effects of hesperidin from the genus Citrus," *Current Medicinal Chemistry*, 24(37), 4929 - 4945, 2017.
- [3]. Alam M.A, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD, "Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action," *Advances in Nutrition*, 5(4), 404-417, 2014.
- [4]. Davis JM, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Gangemi JD, "Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise," *AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 295(2), 505-509, 2008.

[5]. Careri M, Elviri L, Mangia A, Musci M, "Spectrophotometric and coulometric detection in the high performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice," *Journal of Chromatography A*, 881, 1-2, 449-460, 2000.

[6]. Belajova E, Suhaj M, "Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography," *Food Chemistry*, 86(3), 339-343, 2004.

[7]. Lidércia CRCEs, Jorge MD, Rafael DSQB, Sergio LCF, Juceni PD, Pedro SR, Roy EBS, "Determination of flavanones in orange juices obtained from different sources by HPLC/DAD," *J Anal Methods Chem.*, 2014.

[8]. Luu Minh Chau, et al., "Determination of total phenolic, flavonoid contents and antioxidant capacity of king mandarin fruits (*Citrus nobilis*)," *TNU Journal of Science and Technology*, 228(13), 374 - 382, 2023

[9]. AOAC, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Appendix F, 1-18, 2016.

AUTHORS INFORMATION

**Nguyen Duc Thanh^{1,4}, Nguyen Thi Quyen², Nguyen Thi Van Anh²,
Le Viet Ngan³, Le Thi Hong Hao³, Ta Thi Thao¹**

¹University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

²Vietnam University of Traditional Medicine, Vietnam

³National Institute for Food Control, Vietnam

⁴Vietnam Military Medical Academy, Vietnam