

Xác định đồng thời 05 anthocyanidin trong một số loại rau, củ, quả bằng phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ (lc/ms/ms)

Vũ Thị Trang^{1,*}, Lê Thị Hồng Hảo¹, Tăng Thị Phương², Nguyễn Xuân Trung²

¹*Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia - Bộ Y tế*

²*Khoa Hóa học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

Nhận ngày 05 tháng 7 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 17 tháng 8 năm 2016; Chấp nhận đăng ngày 01 tháng 9 năm 2016

Tóm tắt: Anthocyanin là một họ chất màu có hoạt tính chống oxy hóa tự nhiên được tìm thấy trong nhiều loại rau, củ, quả có màu đỏ đến tím. Phát triển phương pháp phân tích nhanh, chính xác để xác định đồng thời 5 anthocyanidin phổ biến nhất bao gồm: Cyanidin, Delphinidin, Pelargonidin, Malvidin, Peonidin. Các chất được tách bằng sắc ký lỏng sử dụng chương trình rửa giải gradient và định lượng bằng detector khối phổ MS/MS trong 13 phút. Quá trình chuẩn bị mẫu bao gồm sự thủy phân các anthocyanin thành anthocyanidin sử dụng hỗn hợp MeOH/HCl 2,7M ở 80°C trong 2 giờ. Hiệu suất thủy phân đạt >95% và độ chụm RSD <4%. Ứng dụng phương pháp phân tích 16 mẫu rau, củ, quả thu thập trên thị trường cho hàm lượng anthocyanidin trong khoảng 1-50mg/100g.

Từ khóa: Anthocyanidin, sắc ký lỏng khối phổ, LC/MS/MS.

1. Mở đầu

Anthocyanin là một họ chất màu phổ biến, có hoạt tính chống oxy hóa tự nhiên, tồn tại trong hầu hết các thực vật cao và được tìm thấy trong nhiều loại rau củ quả có màu từ đỏ đến tím. Một nghiên cứu tại Mỹ [6] ghi nhận mức tiêu thụ hàng ngày (daily intake) của anthocyanin là 180-215mg/ngày. Nhóm các loại quả berry là nguồn anthocyanin được sử dụng phổ biến hiện nay cho sản xuất thực phẩm chức năng chống oxy hóa, không phổ biến tại Việt nam. Việc tìm kiếm nguồn nguyên liệu đa dạng cung cấp hàm lượng cao các anthocyanin được tập trung nghiên cứu. Anthocyanin tồn tại trong tự nhiên do gốc aglycon có màu

(anthocyanidin) kết hợp với gốc đường. Chỉ có 6 anthocyanidin phổ biến: cyanidin, delphinidin, malvidin, pelardonidin, peonidin, petunidin [1] nhưng số lượng anthocyanin do chúng tạo thành nhiều gấp 15-20 lần, đồng thời cấu trúc rất phức tạp làm cho việc xác định gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung xác định 5 anthocyanidin phổ biến sau khi đã thủy phân tách gốc đường của các anthocyanin.

Các công trình đã công bố thường xác định anthocyanin bằng phương pháp pH vi sai [3, 5], HPLC-PDA [4], LC/MS [6, 7],... Một số ít nghiên cứu công bố về việc xác định anthocyanidin bằng HPLC-PDA [8] gặp khó khăn trong việc tách và loại ảnh hưởng của nền. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu điều kiện tối ưu để thủy phân các anthocyanin

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-916149106
Email: trang2103@gmail.com

thành anthocyanidin và định lượng bằng sắc ký lỏng khối phổ 2 lần. Phương pháp LC/MS/MS nhanh, xác định chính xác loại anthocyanidin và có thể sàng lọc các chất khác trong nhóm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Các chất chuẩn: cyanidin chloride, delphinidin chloride, pelargonidin chloride, malvidin chloride, peonidin chloride, peonidin-3-O-glucoside chloride, cyanidin-3-O-glucoside chloride, pelargonidin-3-O-glucoside chloride (Sigma-Aldrich). Các hóa chất tinh khiết phân tích: acetonitril, methanol, acid formic, acid hydrochloric. Các chất chuẩn anthocyanidin được pha trong methanol chứa HCl 2,7M. Các chất chuẩn anthocyanin được pha trong methanol.

Thiết bị: UPLC/MS/MS (XEVO TQD - Waters), Cột sắc ký Waters C18 (150mm × 4,6mm × 2,5µm) với tiền cột tương ứng

Mẫu nghiên cứu: một số loại rau (bắp cải tím, rau dền, tía tô, rau bớp...), củ (khoai lang tím, củ dền, hành tím...), quả (thanh mai, dâu ta...).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nghiên cứu điều kiện tối ưu xác định đồng thời 6 anthocyanidin bằng phương pháp LC/MS/MS

3.1.1. Điều kiện khối phổ

Điều kiện phân mảnh, điều kiện của nguồn và khí được tự động tối ưu trên hệ thống MS thu được các ion con đặc trưng (bảng 1).

Bảng 1. Điều kiện MS tối ưu xác định các anthocyanidin

Anthocyanidin	cyanidin	delphinidin	pelargonidin	malvidin	peonidin
Ion mẹ (cone vol, eV)	287 (72)	303 (60)	271 (60)	331 (56)	301 (58)
Ion con (CE, eV)	137 (34), 109 (42), 69 (44)	127 (50), 76 (64), 69 (40)	121 (38), 93 (42), 65 (52)	315 (30), 287 (28), 242 (30)	286 (24), 258 (30), 201 (38)

3.1.2. Điều kiện sắc ký

Trong nghiên cứu này, sử dụng cột tách C18 (100mm x 4,6mm x 2,5µm), pha động: acid formic và acetonitrile, tốc độ dòng 0,4 ml/ph. Khảo sát nồng độ acid formic và chương trình rửa giải tối ưu.

Khảo sát chế độ đẳng dòng (isocratic) với pha động là acid formic 0,1% và acetonitrile

theo các tỉ lệ 70/30; 75/25; 80/20; 85/15 cho thấy: với các chế độ đẳng dòng khác nhau khi tăng thành phần acetonitrile, thời gian lưu của các chất tăng, pic bị kéo dài và tại tỉ lệ 85/15 thì chỉ có delphinidin được rửa giải. Do đó, chương trình gradient tối ưu được đưa ra trong bảng 2.

Bảng 2. Chương trình gradient tối ưu

Thời gian (phút)	0	10	10,1	13
% acetonitril	20	30	20	20

Giá trị pH có ảnh hưởng rất lớn tới cấu trúc cũng như màu sắc của các anthocyanidin, mỗi anthocyanidin lại chịu ảnh hưởng khác nhau bởi các giá trị pH khác nhau. 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%.

3.2. Nghiên cứu điều kiện tối ưu thủy phân anthocyanin thành anthocyanidin

Trên nền mẫu (rau, củ, quả), các anthocyanidin tồn tại ở dạng aglycon liên kết với gốc đường. Do đó, để xác định các anthocyanidin thì phải có tác nhân cắt mạch gốc đường, chuyển từ dạng anthocyanin thành anthocyanidin. Các dung môi được sử dụng phổ biến là: HCl và MeOH. Quá trình thủy phân cũng như độ bền và dạng tồn tại của các anthocyanidin phụ thuộc rất lớn vào nồng độ acid, nhiệt độ thủy phân và thời gian thủy phân. Để đánh giá hiệu quả của quá trình thủy phân, chúng tôi thủy phân các chất chuẩn: cyanidin-3-O-glucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside song song cùng với nền mẫu quả thanh mai.

Với các chất chuẩn anthocyanin: hút 50 μ L chuẩn hỗn hợp 3 anthocyanin 20ppm vào vial 2mL, thêm 950 μ L hỗn hợp MeOH/HCl. Với nền mẫu, cân chính xác khoảng 1g mẫu đã đồng nhất vào lọ thủy phân 6mL, thêm 5mL hỗn hợp MeOH/HCl. Chuẩn và mẫu được thủy phân đồng thời trong điều kiện nhiệt độ, thời gian

xác định. Làm lặp 3 lần cho mỗi loại tại mỗi điều kiện.

Khi cố định nhiệt độ thủy phân 80°C, dung môi thủy phân MeOH/HCl 2,7M, thay đổi thời gian thủy phân: 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút hoặc khi cố định dung môi thủy phân MeOH/HCl 2,7M, thời gian thủy phân 120, thay đổi nhiệt độ thủy phân: 50°C; 60°C; 70°C; 80°C; 90°C; 100°C thì hiệu suất thủy phân của các chất chuẩn là cao nhất (95 - 99%) và hàm lượng các anthocyanidin trong nền mẫu quả thanh mai lớn nhất (47,3mg/100g) tại nhiệt độ 80°C trong 120 phút. Thời gian thủy phân lâu hơn hay nhiệt độ thủy phân cao hơn thì hàm lượng anthocyanidin bị giảm có thể do quá trình phân hủy của anthocyanidin ở nhiệt độ cao.

pH ảnh hưởng rất lớn đến cấu trúc và độ bền của các anthocyanidin. Khi thay đổi nồng độ HCl trong dung môi chiết (1,5M; 2M; 2,5M; 2,7M; 3M; 3,5M) thì hiệu suất thủy phân thay đổi đáng kể, đạt cao nhất tại nồng độ HCl 2,7M.

3.3. Đánh giá phương pháp phân tích

Đường chuẩn phân tích 5 anthocyanidin đã được thiết lập sử dụng điều kiện phân tích tối ưu, trong khoảng nồng độ 0,01 - 10ppm. Kết quả phương trình đường chuẩn, hệ số tương quan, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) và độ lặp lại của các anthocyanidin được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá phương pháp phân tích

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R ²	LOD (μ g/g)	LOQ(μ g/g)	RSD (%)
cyanidin	y= 17517,3 x + 13558,6	0,99998	0,1	0,33	2,2-3,1
delphinidin	y= 13232,3 x + 50,7743	0,99995	0,5	1,67	2,0-2,9
pelargonidin	y= 21283,6 x + 17140,3	0,99999	0,03	0,10	3,0-3,4
malvidin	y= 38818,5 x + 30825,6	0,99998	0,003	0,01	3,5 - 4,0
peonidin	y= 217711 x + 2803,38	0,99998	0,003	0,01	3,3-3,9

3.4. Phân tích một số mẫu thực tế

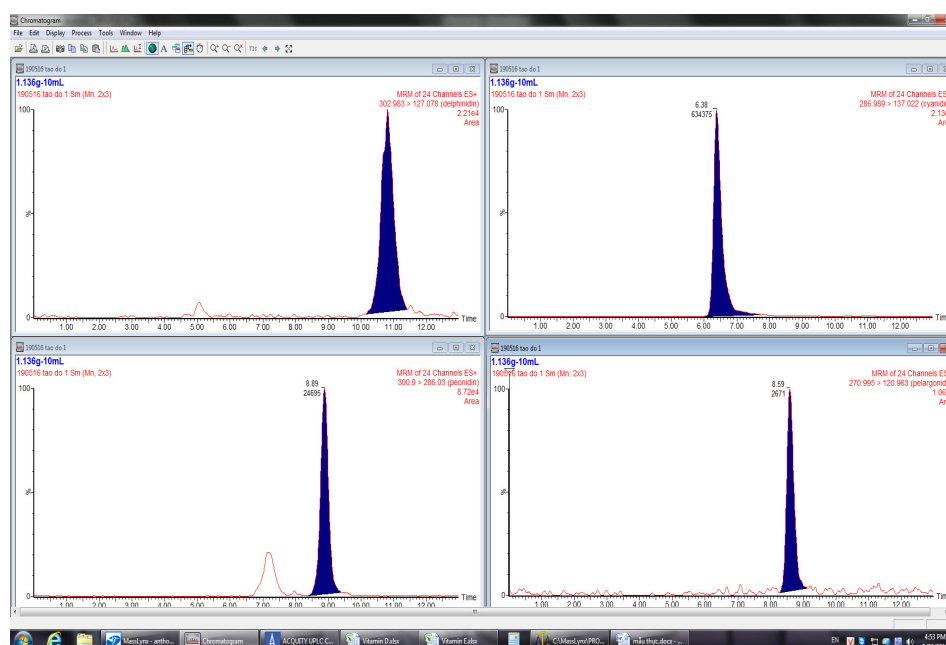
Tiến hành phân tích 16 mẫu thực tế được lấy ngẫu nhiên trên thị trường, bao gồm: bắp cải tím, cà tím, su hào tím, hành tây tím, táo đỏ, lá tía tô, quả thanh mai, rau bớp, rau dền, củ dền,

khoai lang tím cho thấy: hàm lượng tổng các anthocyanidin trong rau, củ, quả trong khoảng 1-50mg/100g. Trong đó, cyanidin là chất phổ biến nhất, nó có mặt trong tất cả các loại rau, củ, quả được phân tích và chiếm hàm lượng cao nhất (14/16 mẫu, hàm lượng 2 - 43 mg/100g),

tiếp đến là peonidin (11/16 mẫu, hàm lượng 0,1-5mg/100g), pelargonidi (9/16 mẫu, hàm lượng 0,01-1,5mg/100g), delphinidin (4/16 mẫu, hàm lượng 0,5-2,5mg/100g). malvidin không phát hiện trong mẫu rau, củ, quả nào có thể do đây là anthocyanidin kém phổ biến. Điều này phù hợp với thông tin được đưa ra trong nghiên cứu trước đó [4]: Các glycosid của 3 anthocyanidin không bị methyl hóa (cyanidin, delphinidin, pelargonidin) là phổ biến nhất trong tự nhiên, chúng chiếm hơn 80% sắc tố trong lá, 69% sắc tố trong quả và 50% sắc tố trong hoa.

Trong các đối tượng mẫu được phân tích, hàm lượng anthocyanidin trong quả thanh mai

cao nhất, tiếp đến là lá tía tô, su hào tím, táo đỏ Mỹ, bắp cải tím... Củ dền và rau dền không phát hiện bất cứ anthocyanidin nào mặc dù chúng có màu tím khá đậm, có thể màu tím này do sắc tố khác ngoài nhóm anthocyanin tạo thành. Đáng chú ý là quả thanh mai chứa 4 loại anthocyanidin với hàm lượng tương đối cao với nền mẫu khá sạch có thể được đề xuất để tinh chế anthocyanin cho sản xuất thực phẩm chức năng. Đây là loại quả chưa phổ biến, mới được trồng tại Quảng Ninh và một số tỉnh miền núi phía Bắc.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu táo đỏ (phát hiện 4 anthocyanidin: cyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin).

4. Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã nghiên cứu, khảo sát được các điều kiện tối ưu xác định đồng thời 5 anthocyanidin bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS và áp dụng quy trình phân tích tối ưu để xác định hàm lượng của các anthocyanidin trong một số loại mẫu rau, củ,

quả. Từ đó cho thấy, đây là một phương pháp hiệu quả để xác định nhanh, chính xác hàm lượng các anthocyanidin và có khả năng mở rộng để xác định hàm lượng anthocyanidin trong thực phẩm chức năng. Nghiên cứu cũng chỉ ra hàm lượng anthocyanidin trong một số loại rau, củ, quả Việt nam làm cơ sở để lựa chọn nguồn nguyên liệu cho sản xuất thực phẩm chức năng chống oxy hóa.

Tài liệu tham khảo

- [1] A.C. Ovando, M.L. Pacheco-Hernández, M.E. Páez-Hernández, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113 (2009) 859.
- [2] Antonieta Ruiz, Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51(2013) 706.
- [3] AOAC 2005.02. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines pH differential method.
- [4] Nafiz Oncu Can et al, Rapid determination of free anthocyanins in foodstuff using high performance liquid chromatography, *Food Chemistry* 130 (2012) 1082.
- [5] Phạm Thị Thanh Nhân, Nguyễn Hữu Cường, Lê Trần Bình, Tách chiết và phân tích hàm lượng anthocyanin từ các mẫu thực vật khác nhau, *Tạp chí sinh học*, số 33(4) (2011) 79.
- [6] Wang, L. S., & Stoner, G. D., Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269 (2008) 281.
- [7] Yafang Shao et al, Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryzasativa L.*) grains at four stages of development after flowering, *Food Chemistry*, 143 (2014) 90.
- [8] Zhe Zhang et al, Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts, *J. Agric. Food Chem*, 52 (2004) 688.

Simultaneous Determination of 5 Anthocyanidins in Some Vegetable and Fruits by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (lc/ms/ms)

Vu Thi Trang¹, Le Thi Hong Hao¹, Tang Thi Phuong², Nguyen Xuan Trung²

¹Laboratory of Food Quality and Food Additives National Institute for Food Control

²Chemical Department, VNU University of Science

Abstract : Anthocyanins constitute a major group of natural antioxidant compounds, and they are responsible for the colours of fruits and vegetables. A rapid and accuracy method for the determination of the five most abundant anthocyanidins in vegetable and fruits is described, including Cyanidin, Delphinidin, Pelargonidin, Malvidin, Peonidin. The compounds were separated by gradient elution and quantified using UPLC/MS/MS within 13 min. A sample preparation step was employed which hydrolyzes anthocyanins to anthocyanidin using MeOH/HCl 2,7M at 80°C for 2h. Hydrolysis recovery was > 95% and RSD <4,0%. Testing on 16 different vegetable and fruit samples demonstrated the applicability in the concentration range of about 1 - 50mg/100g.

Keywords: Anthocyanidin, liquid chromatography tandem spectrometry, LC/MS/MS.