

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT NHÓM
SILYMARIN TRONG THỰC PHẨM CHỨC NĂNG BẰNG
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

Đến tòa soạn 15 - 9 – 2017

Nguyễn Thị Thu Hằng, Cao Công Khánh, Lê Thị Hồng Hảo

Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia

Lê Huyền Trâm

Trường đại học Bách khoa Hà Nội

SUMMARY

**DETERMINATION OF SILYMARIN IN DIETARY
SUPPLEMENT BY HPLC**

Seeds of milk thistle, Silybum marianum (L.) Gaertn., are used for treatment and prevention of liver disorders and were identified as a high priority ingredient requiring a validated analytical method. A method of simultaneous determination of silymarin content in dietary supplement by reverse phase - high performance liquid chromatography was developed. The method was adapted to analyze 07 active compounds in forms: materials, tablets, capsules and softgel. The photo diode array detector was used as a tool for peak identification and purity confirmation especially that silymarin have several reported peaks. The method was validated according to the AOAC guidelines (Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals) with respect to specificity, linearity, detection and quantitation limits, recovery and precision. This method showed high reliability and can be implemented in practical application.

Keywords: Silymarin, dietary supplement, HPLC.

I. MỞ ĐẦU

Silymarin là hỗn hợp của một số chất flavonoid polyphenolic được phân lập từ cây kế sữa, *Silybum marianum*, họ Cúc (*Asteraceae*). Kế sữa vốn mọc hoang dã ở vùng Địa Trung Hải và được phát triển chủ yếu ở châu Âu,

châu Phi, Nam Mỹ, Trung và Đông Á. Môi trường sinh trưởng của cây kế sữa là ở những vùng khô ráo, nhiều ánh nắng mặt trời. Hiện nay, cây kế sữa đã được du nhập vào trồng ở Việt Nam và đang phát triển tốt tại các vùng cao có đất tốt và khí hậu mát mẻ

như: Tam Đảo, Sapa,.... Bộ phận được sử dụng chính là quả kể sữa với hàm lượng Silymarin từ 1,5-3,0%. Các thành phần chính của silymarin là silybinin (silybin A và silybin B), isosilybinin (isosilybin A và isosilybin B), silydianin, silychristin. Trong đó, Silybin là thành phần chính và chiếm khoảng 70-80%.

Từ thời Hy Lạp cổ đại và La Mã, hạt giống của cây kể sữa đã được sử dụng để bảo vệ gan. Nó đã trở thành một loại thuốc chuyên dùng để điều trị các bệnh gan mật vào thế kỷ 16 và vào năm 1960 ở châu Âu. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu hiện đại đánh giá hiệu quả của Silymarin để điều trị một loạt các bệnh về gan, túi mật và rối loạn đường ruột. Từ đó, các sản phẩm thực phẩm chức năng (TPCN) chứa thành phần kể sữa ngày càng phát triển, đặc biệt là ở Hoa Kỳ và Châu Âu. Để tăng hiệu quả sử dụng, phần lớn các sản phẩm này đều chứa thành phần kể sữa dưới dạng cao thảo dược đã được tiêu chuẩn hóa về hàm lượng các hoạt chất Silymarin và được bào chế chủ yếu dưới dạng viên nang cứng và viên nang mềm. Nhằm bảo vệ quyền lợi người tiêu dùng, cũng như hỗ trợ các cơ quan chức năng trong việc kiểm soát tốt vấn đề an toàn và chất lượng thực phẩm, nghiên cứu này sẽ khảo sát tối ưu và đánh giá phương pháp phân tích hàm lượng Silymarin trong nguyên liệu cao thảo dược, sản phẩm TPCN dạng viên nang cứng và viên nang mềm. Trong đó, phương pháp sắc ký lỏng

hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) kết hợp detector PDA được sử dụng với ưu điểm: đơn giản, dễ sử dụng, hiệu quả cao, dễ triển khai, chuyển giao cho các phòng thí nghiệm khác.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

• Đối tượng nghiên cứu:

- Dạng nguyên liệu cao thảo dược, viên nang cứng, viên nang mềm chứa kể sữa.
- Đối tượng phân tích được lấy ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội.

• Dụng cụ, trang thiết bị:

- Hệ thống HPLC Alliance (Waters) với detector PDA sử dụng phần mềm Empower.
- Cột Symmetry (150mm x 4,6mm; 50 µm) (Waters) và tiền cột tương ứng
- Các dụng cụ phòng thí nghiệm và một số thiết bị phụ trợ.

• **Hóa chất, chất chuẩn:** các hóa chất, chất chuẩn sử dụng đều thuộc loại tinh khiết phân tích (p.a).

- Silybinin (A+B), Isosilybinin (A+B), Silydianin, Silychristin, Taxifolin (Sigma Aldrich).
- Methanol, acid phosphoric, n-hexan và nước cất 2 lần đạt yêu cầu HPLC.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích

• **Khảo sát và lựa chọn các điều kiện phân tích Silymarin bằng HPLC**

Qua tham khảo tài liệu [4, 5] kết hợp với tiến hành thử nghiệm, chúng tôi đã lựa chọn được các điều kiện phân tích các chất Silymarin trên hệ thống HPLC như sau:

+ Cột sắc kí C18 Symmetry (150mm x 4,6mm; 5,0µm) (Waters) và tiền cột tương ứng

+ Thẻ tích tiêm mẫu 20µl; nhiệt độ buồng cột: 40°C; tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

+ Khoảng quét phổ: 200-400nm, bước sóng định lượng: 288nm.

+ Pha động: kênh A: methanol/acid phosphoric/nước cất (20:0,5:80) và kênh B: methanol/acid phosphoric/nước cất (80:0,5:20) theo chương trình gradient như trong bảng 1:

Bảng 1: Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
Bắt đầu	85	15
5,0	85	15
20	55	45
40	55	45
45	85	15
55	85	15

• **Nghiên cứu quy trình xử lý mẫu:**

Silymarin không có tính chất thân dầu mặc dù độ tan trong nước của nó thấp. Silymarin hòa tan được trong các dung môi phân cực (EtOH, MeOH,...) và không hòa tan trong các dung môi không phân cực (chloroform, ether petroleum,...). Do đó chúng tôi tiến hành khảo sát các dung môi chiết phù hợp với từng loại mẫu, sử dụng kết hợp một số kỹ thuật phụ trợ như: lắc Vortex, siêu âm, ly tâm,...

Khảo sát dạng mẫu bột (viên nang cứng, nguyên liệu):

- Thử nghiệm các dung môi hữu cơ phân cực thường được sử dụng là acetone, methanol, ethanol trên mẫu viên nang cứng, mỗi dung môi chiết thử nghiệm 04 lần, kết quả thu được như trong bảng 2:

Bảng 2: Kết quả thử nghiệm mẫu dạng bột với các dung môi chiết khác nhau

Dung môi chiết	Methanol	Ethanol	Acetone
Hàm lượng Silymarin trung bình (mg/g)	169	172	174

Kết quả định lượng Silymarin thu được khi sử dụng các dung môi chiết như trong bảng 2 không có sự khác biệt đáng kể. Tuy nhiên, trong quá trình phân tích sắc ký, mẫu chiết bằng acetone cho thấy có lẫn rất nhiều tạp, ảnh hưởng đến việc phân tích Silymarin. So sánh giữa methanol và ethanol, sắc đồ của mẫu chiết bằng methanol có chân pic gọn hơn, hình dạng pic đẹp hơn và tách tốt hai đồng phân silybin A và silybin B, tạo thuận lợi cho việc xác định hàm lượng và phân lập chất phân tích. Do vậy, chúng tôi lựa chọn dung môi để chiết mẫu nang cứng là methanol và quy trình xử lý mẫu dạng bột khi phân tích Silymarin gồm các bước như sau:

+ Xác định khối lượng trung bình lượng bột trong một viên nang, đồng nhất mẫu.

+ Cân chính xác lượng mẫu khoảng 0,5g vào ống ly tâm 50 mL.

- + Thêm khoảng 25 mL methanol, lắc Vortex 1 phút, siêu âm 15 phút.
- + Ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, gạn dịch trong vào bình định mức 50mL.
- + Phần cặn chiết lặp lại lần 2 với 15 ml methanol.
- + Gộp dịch chiết, định mức bằng methanol, lắc đều.
- + Lọc qua màng lọc 0,45µm, pha loãng (nếu cần) rồi phân tích trên HPLC.

Quy trình xử lý mẫu với dung môi chiết methanol khá đơn giản, dễ thực hiện và cũng được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác [3, 4, 5].

Khảo sát dạng mẫu nhiều lipid (viên nang mềm):

- Điểm đặc trưng của đối tượng mẫu này là nền mẫu có rất nhiều lipid như dầu thực vật, các hoạt chất có tính thân dầu, kết hợp với bột cao dược liệu. Do đó cần phải có giai đoạn loại béo (lipid) trong quá trình xử lý mẫu. Trong các dung môi không phân cực thường dùng, chúng tôi lựa chọn sử dụng n-hexan để loại béo vì tính kinh tế và ít độc hại với con người, môi trường. Chúng tôi tiến hành thử nghiệm 02 quy trình: chiết loại lipid bằng n-hexan trước, sau đó chiết mẫu bằng methanol (loại lipid trước) và ngược lại (loại lipid sau). Mỗi quy trình tiến hành 04 lần. Kết quả thu được cho thấy với quy trình loại lipid trước và sau thì hàm lượng Silymarin thu được tương ứng là 6,11 mg/g và 5,87 mg/g. Từ đó cho thấy, khi thực hiện loại lipid trước bằng n-hexan, sau đó chiết mẫu bằng methanol có

hiệu quả hơn so với cách chiết mẫu bằng methanol sau đó loại lipid bằng n-hexan. Như vậy, quy trình xử lý mẫu dạng viên nang mềm (mẫu nhiều lipid) khi phân tích silymarin gồm các bước như sau:

- + Xác định khối lượng trung bình lượng dịch trong 1 viên nang, đồng nhất mẫu.
- + Cân lượng mẫu khoảng 1,0g vào ống ly tâm 50 mL.
- + Thêm khoảng 25 mL n-hexan, lắc Vortex 1 phút.
- + Ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ lớp n-hexan.
- + Phần cặn để cho bay hơi hết n-hexan, tiến hành chiết như với mẫu dạng bột.

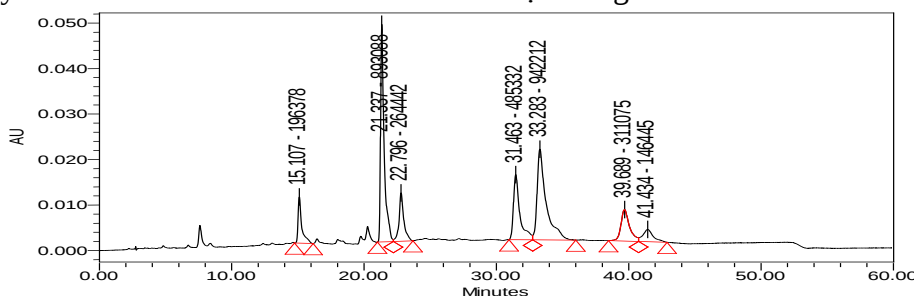
2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp:

Độ đặc hiệu, độ chọn lọc:

Tiến hành phân tích theo các điều kiện sắc ký đã lựa chọn với mẫu dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc, mẫu trắng và mẫu trắng có thêm dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc. Kết quả thu được như sau:

- Trên sắc đồ của mẫu trắng không xuất hiện các pic của các chất Silymarin.
- Trên sắc đồ của mẫu dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc và mẫu trắng có thêm dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc thì thời gian lưu của các chất Silymarin là giống nhau, đồng thời các pic này cũng có phổ giống nhau.
- Thời gian lưu tương đối của Taxifolin, Silychristin, Silydianin, Silybin A, Silybin B, Isosilybin A, Isosilybin B lần lượt là: 0,480; 0,678;

0,725; 1,00; 1,057; 1,262; 1,317 (hình 2). Như vậy so với phương pháp phân tích kế thừa của USP 38 thì nghiên cứu của chúng tôi có phần tốt hơn, đặc biệt là khả năng tách giữa các đồng phân của Silybin và Isosilybin.



Hình 1: Sắc đồ mẫu trắng (viên nang cứng) thêm chuẩn Silymarin

Tính thích hợp của hệ thống:

Tiến hành phân tích lặp lại 06 lần dung dịch chuẩn trên hệ thống HPLC với các điều kiện đã chọn ở trên, tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic của các chất phân tích. Kết quả thu được cho thấy: Giá trị RSD (%) của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2%, phù hợp với quy định của AOAC. Như vậy, hệ thống HPLC thích hợp để phân tích đồng thời các chất nhóm

Như vậy, phương pháp đã xây dựng có độ đặc hiệu, độ chọn lọc cao, phù hợp để phân tích đồng thời các hoạt chất Silymarin trong thực phẩm chức năng. Sắc đồ phân tích mẫu viên nang cứng thêm chuẩn Silymarin được thể hiện trong hình 1.

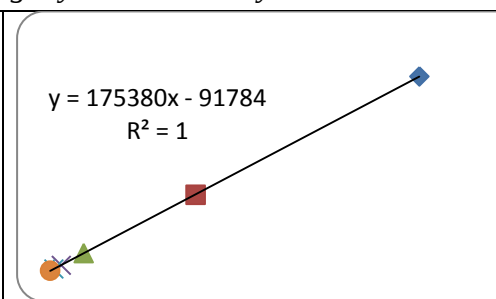
Silymarin trong thực phẩm chức năng.

Khoảng tuyến tính:

Pha các chuẩn nhóm Silymarin trong methanol và phân tích dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp trên hệ thống HPLC. Xây dựng đồ thị biểu thị mối tương quan tuyến tính giữa tỉ lệ diện tích pic chuẩn với nồng độ chất phân tích tương ứng. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của Silybin

C µg/ml	Area	C' µg/ml	Bias (%)
121	21144045	121,1	0,07
48,4	8356436	48,18	-0,47
12,1	2049351	12,21	0,90
4,84	732314	4,699	-2,91
2,42	335600	2,437	0,70
1,21	148534	1,370	13,3



- Các chất phân tích có khoảng tuyến tính từ 1,21 µg/ml đến 121 µg/ml.
- Phương trình đường chuẩn của tất cả các chất phân tích đều có giá trị $R^2 > 0,999$.

- Kết quả kiểm tra lại đường chuẩn cho thấy độ lệch (bias) tại các điểm trên đường chuẩn đều có giá trị $< \pm 15\%$, đạt theo yêu cầu của AOAC.

- Điểm thấp nhất của đường chuẩn theo USP 38 đối với Silybin là 4,0 µg/ml. Như vậy phương pháp này có đường chuẩn phù hợp để phân tích các chất Silymarin.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:

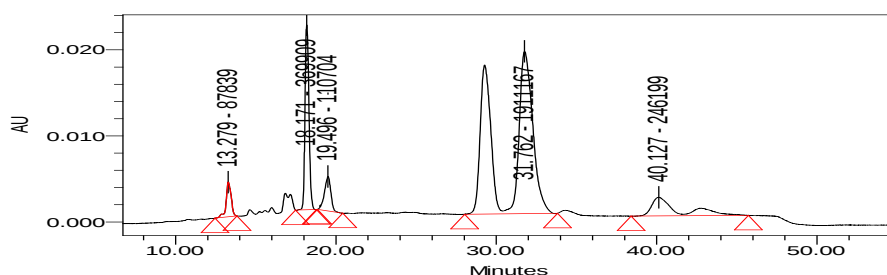
Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ dựa trên độ lệch chuẩn (SD) bằng cách tiến hành phân tích song song với 10 mẫu thử. Từ kết quả thu được tính giá trị trung bình $\bar{x}$ và độ lệch chuẩn SD, từ đó tính LOD = $3 \times SD$ và LOQ = $10 \times SD$. Việc đánh giá thực hiện dựa vào hệ số R = $\bar{x}/LOD$ ($\bar{x}$ là giá trị trung bình của mẫu). Kết quả thực nghiệm thu được cho thấy: LOD và LOQ của các chất Silymarin lần lượt là 0,24 mg/g và 0,80 mg/g. Các giá trị R của các chất phân tích đều nằm trong khoảng > 4 và < 10 nên các giá trị về LOD và LOQ thu được tin cậy và đạt yêu cầu so với AOAC.

Độ lặp lại của phương pháp:

Theo quy định của USP 38 về cao khô kế sữa, tổng hàm lượng Silymarin phải có 20-45% silychristin + silidianin, 40-65% silybinin (A+B), 10-20% isosilybinin (A+B) [6]. Các nhà sản xuất cao chiết kế sữa cũng công bố chất lượng sản phẩm theo quy định này. Do đó, khi tiến hành thẩm định độ chính xác của phương pháp (độ lặp lại và độ thu hồi), chúng

tôi tiến hành tính tổng Silybinin và Isosilybinin theo đúng chất chuẩn hỗn hợp của Sigma.

Tiến hành phân tích lặp lại 06 lần đối với mỗi nền mẫu theo quy trình phân tích đã được xây dựng tương ứng, cụ thể: phân tích hàm lượng các chất taxifolin, silychristin, silydianin, silybinin (A+B), isosilybinin (A+B) trong các mẫu nguyên liệu, mẫu viên nang cứng và viên nang mềm. Kết quả cho thấy: nền mẫu nguyên liệu cho độ lặp lại tốt nhất (với RSD từ 1,28% đến 2,41%). Nền mẫu viên nang cứng và viên nang mềm cho độ lặp lại giống nhau (trong khoảng 2-3%). Các giá trị này phù hợp với quy định của AOAC [6]. Các kết quả phân tích độ lặp lại trong phương pháp này tương đồng với nghiên cứu của E. Mudge và cộng sự [4]. Cũng từ kết quả này cho thấy trong mẫu nguyên liệu của nghiên cứu này thì thành phần Isosilybinin thấp hơn một chút so với quy định. Các mẫu viên nang cứng và viên nang mềm đã sử dụng các nguyên liệu để sản xuất phù hợp với tiêu chuẩn của USP 38 [5]. Kết quả cũng cho thấy, hàm lượng Taxifolin chiếm khoảng 5-6% tổng hàm lượng Silymarin. Tuy nhiên cũng chưa có quy định về hoạt chất này trong thành phần silymarin trong dược liệu cũng như trong cao nguyên liệu. Hình ảnh minh họa sắc đồ phân tích mẫu viên nang cứng



Hình 2: Sắc đồ phân tích độ lặp lại trên nền mẫu viên nang cứng

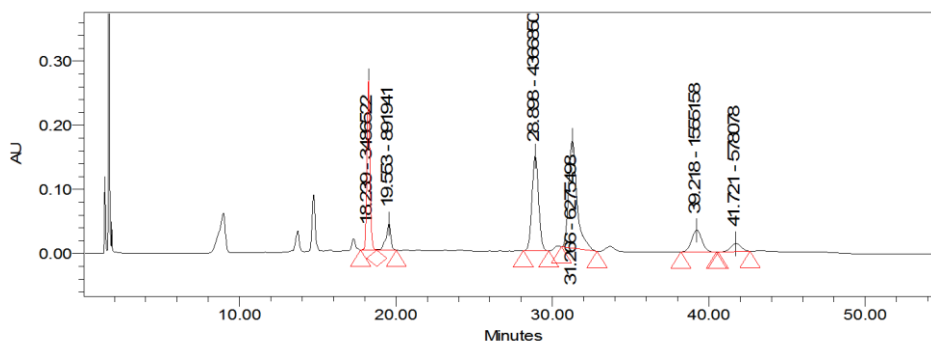
Độ thu hồi của phương pháp:

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn hỗn hợp silymarin vào nền mẫu thực phẩm chức năng không chứa silymarin qua đánh giá sơ bộ và xác định tỷ lệ (%) thu hồi của chuẩn silymarin khi xử lý mẫu và phân tích theo quy trình đã xây dựng. Kết quả cho độ thu hồi của các chất Taxifolin, Silychristin, Silydianin, Silybinin (A+B), Isosilybinin (A+B) trong các nền mẫu nguyên liệu, viên nang cứng và viên nang mềm nằm trong khoảng 96,02 – 102,1%, đạt yêu cầu của AOAC. Trong đó, nền mẫu nguyên liệu cho độ thu hồi tốt nhất, sau đó đến nền mẫu viên nang cứng và nền mẫu viên nang mềm. So sánh với một số nghiên cứu khác : độ thu hồi của phương pháp này cao hơn so với nghiên cứu của E. Mudge và cộng sự [4] nhưng thấp hơn một chút so với nghiên cứu của Mohamed A. Korany và cộng sự

[3]. Điều này có thể là do ảnh hưởng của nền mẫu trắng tới các chất phân tích trong các nghiên cứu chưa giống nhau.

3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MẪU THỰC

Tiến hành lấy mẫu ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội, phân tích theo phương pháp đã xây dựng và thẩm định. Kết quả phân tích cho thấy: hàm lượng silymarin trong 07 mẫu nguyên liệu: từ 5,91 g/100g đến 98,1 g/100g; trong 06 mẫu viên nang mềm: từ 6,64 mg/viên đến 32,8 mg/viên; trong 10 mẫu viên nang cứng: từ 11,1 mg/viên đến 126 mg/viên; trong 03 mẫu viên nén: từ 41,5 mg/viên đến 116 mg/viên. Tuy nhiên, đây mới chỉ là các kết quả phân tích ban đầu, cần tiếp tục nghiên cứu tiếp để có đánh giá tốt hơn về chất lượng của các loại nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm chức năng trên thị trường.



Hình 3: Sắc đồ phân tích mẫu viên nén VN01

V. KẾT LUẬN

HPLC là một phương pháp phân tích hiện đại, phổ biến và đáp ứng rất tốt các yêu cầu về phân tích chất lượng thực phẩm chức năng ở cả trong và ngoài nước. Sự kết hợp của chương trình gradient pha động giúp tách tốt các hoạt chất nhóm Silymarin và detector PDA đã giúp tăng độ đặc hiệu của phương pháp. Các kết quả thẩm định cho thấy phương pháp được xây dựng trong nghiên cứu này có khoảng tuyến tính rộng, độ nhạy tốt, độ lặp lại và độ thu hồi phù hợp yêu cầu. Phương pháp này dễ thực hiện, độ tin cậy cao và có khả năng triển khai áp dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L. Abenavoli, R. Capasso, et al. (2010), "Milk thistle in liver diseases: past, present, future", *Phytother Research*, 24(10), pp. 1423-1432.
2. S. AbouZid (2012), "Silymarin, Natural Flavonolignans from Milk Thistle", *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, (12), pp. 255-272.
3. Mohamed A. Korany, et al. (2017), "A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of Silymarin and Curcumin in various dosage forms ", *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1711–S1725.
4. E. Mudge, L. Paley, et al. (2015), "Optimization and single-laboratory validation of a method for the determination of flavonolignans in milk thistle seeds by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(25), pp. 7657-7666.
5. The United States Pharmacopeia (2015), "Powdered Milk Thistle Extract Monograph", *United States Pharmacopeia* 38 - NF33.
6. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2013), Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals.