

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13285:2021

Xuất bản lần 1

**NGUYÊN LIỆU VÀ THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE
CHỨA *HYPERICUM PERFORATUM* – XÁC ĐỊNH
HÀM LƯỢNG HYPERICIN VÀ PSEUDOHYPERICIN BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Raw materials and health supplements containing *Hypericum perforatum* –
Determination of hypericin and pseudohypericin contents by
high performance liquid chromatographic (HPLC) method*

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13285:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2013.15
Hypericin and pseudohypericin in St John's wort. HPLC method;

TCVN 13285:2021 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm
quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Nguyên liệu và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa *Hypericum perforatum* – Xác định hàm lượng hypericin và pseudohypericin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Raw materials and health supplements containing Hypericum perforatum – Determination of hypericin and pseudohypericin contents by high performance liquid chromatographic (HPLC) method

CẢNH BÁO: Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng hypericin và pseudohypericin trong nguyên liệu và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa *Hypericum perforatum* bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2 Nguyên tắc

Chất phân tích trong mẫu thử được chiết bằng metanol với sự hỗ trợ của kỹ thuật siêu âm. Dịch chiết được cho tiếp xúc với nguồn ánh sáng đặc hiệu trong 30 min trước khi phân tích. Chất chiết sau đó được phân tích bằng HPLC và định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn dựa vào chất chuẩn hypericin.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương. Nước sử dụng là nước đã loại ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Metanol (CH_3OH).

3.2 Ethyl axetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$).

TCVN 13285:2021

3.3 Natri dihydro phosphat ngậm hai phân tử nước ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

3.4 Axit phosphoric (H_3PO_4), 85 %

3.5. Axit phosphoric (H_3PO_4 loãng), 1 %

Lấy khoảng 1,2 ml axit phosphoric (3.4) cho vào bình định mức 100 ml có chứa sẵn khoảng 90 ml, thêm nước đến vạch, trộn đều.

3.6 Pyridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$).

3.7 Dung dịch đệm pha động, pH 2,1

Hòa tan 15,6 g natri dihydro phosphat ngậm hai phân tử nước (3.3) trong nước và thêm nước đến 1 000 ml. Chỉnh pH đến $2,1 \pm 0,1$ bằng axit phosphoric (3.5).

3.8 Pha động

Pha động A: Metanol (3.1) : dung dịch đệm pH 2,1 (3.7) : etyl axetat (3.2) (tỷ lệ thể tích 1893 : 618 : 526);

Pha động B: Metanol (3.1) : dung dịch đệm pH 2,1 (3.7) : etyl axetat (3.2) (tỷ lệ thể tích 2392 : 685 : 518).

3.9 Chất chuẩn hypericin, có độ tinh khiết ít nhất 97,39 %.

3.10 Dung dịch chuẩn hypericin

Cân từ 3 mg đến 4 mg chất chuẩn hypericin (3.9), chính xác đến 0,01 mg cho vào bình định mức 25 ml (4.9) và thêm 20 ml metanol (3.1). Siêu âm 5 min cho đến khi hòa tan hoàn toàn, thêm metanol (3.1) đến vạch và lắc đều.

Chuẩn bị năm dung dịch chuẩn để dựng đường chuẩn 5 điểm bao trùm dải phân tích. Nếu chất chuẩn không hòa tan hoàn toàn thì thêm vài giọt pyridin (3.6) và siêu âm cho đến khi tan hết. Bảo quản dung dịch chuẩn ở nhiệt độ phòng để ở nơi tối khi không sử dụng. Cần kiểm tra dung dịch chuẩn trước khi sử dụng, dung dịch chuẩn hypericin bền trong 3 tháng.

Hiệu chỉnh lại nồng độ dung dịch chuẩn dựa theo độ tinh khiết của thuốc thử và lượng cân thực tế.

3.11 Bông sợi

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

4.1 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao.

4.2 Cột phân tích HPLC, ví dụ: cột MZ Analytical (Mainz, Germany) Kromasil 4,0 mm × 125 mm, 5 μm, RP18 (Cat. No. 51516184); Waters Symmetry® C18, 3,9 mm × 150 mm, 5 μm, Part No. WAT046980

(Waters, Milford, MA); Phenomenex Luna® (Torrence, CA) C18(2), 4,0 mm × 150 mm, 5 µm, Part No. 00F-4252-EO, SN 314914 hoặc loại tương đương.¹⁾

4.3 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

4.4 Bể rung siêu âm.

4.5 Ống ly tâm.

4.6 Lọ, dung tích 2 ml dùng cho bộ bơm mẫu tự động HPLC

4.7 Đèn, ví dụ: Lumilux L 18W/11 (Osram Sylvania) hoặc Octron® 700 Series F017735 (Osram Sylvania).¹⁾

Đèn có chỉ số hoàn màu (Coloring Rendering Index - CRI) từ 75 đến 80. Đèn không có bộ phận lọc hoặc khuếch tán.

4.8 Máy cô quay.

4.9 Bình định mức, dung tích 25 ml, 50 ml và 1 000 ml.

4.10 Bình cầu đáy tròn, dung tích 250 ml.

4.11 Máy ly tâm, có thể ly tâm ở tốc độ 4 500 r/min.

5 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch thử

6.1.1 Mẫu chiết dạng bột

Dùng cân (4.3) cân 750 mg ± 0,1 mg mẫu chiết dạng bột vào bình định mức 50 ml (4.9). Thêm 40 ml metanol (3.1) và siêu âm trong bể (4.5) trong 15 min. Làm nguội đến nhiệt độ phòng, thêm

¹⁾ Đây là các ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

TCVN 13285:2021

metanol (3.1) đến vạch và trộn đều. Lấy 10 ml dung dịch này cho vào ống ly tâm (4.5) và ly tâm ở tốc độ 4 500 r/min trong 5 min. Chuyển lớp trên được ly tâm vào lọ (4.6), để dưới đèn (4.7) trong 30 min cách xa đèn 10 cm. Sau đó đem phân tích trên hệ thống HPLC (4.1).

6.1.2 Mẫu dạng nguyên liệu thô

Dùng cân (4.3) cân từ 900 mg đến 1 100 mg nguyên liệu thô đã được nghiền mịn lọt qua sàng cỡ 25 mesh, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình cầu 100 ml đáy tròn (4.10). Đun hồi lưu trong 20 min với 80 ml metanol (3.1). Lọc mẫu qua bông sợi (3.11), giữ lại phần dịch lọc. Chiết thêm 2 lần mỗi lần 60 ml metanol. Lọc và gộp dịch lọc thu được và nước rửa vào bình cầu đáy tròn 250 ml. Cô bằng bộ cô quay (4.9) cho đến khi còn lại khoảng 3 ml. Chuyển vào bình định mức 25 ml và hòa tan bằng metanol, trộn đều. Ly tâm 5 min trên máy ly tâm (4.11) ở tốc độ 4 500 r/min. Chuyển lớp trên được ly tâm vào lọ (4.6), để dưới đèn (4.7) trong 30 min cách xa đèn 10 cm. Sau đó đem phân tích trên hệ thống HPLC.

CHÚ THÍCH: Sau khi để dưới đèn 10 min, thu được hypericin và pseudohypericin ở nồng độ cao nhất (tham khảo Phụ lục A). Thời gian này tương ứng với việc không thể phát hiện các hợp chất proto trong sắc ký đồ. Không thay thế ly tâm bằng lọc trừ khi có phân tích chứng minh. Teflon và cellulose axetat trong giấy lọc được chứng minh là có liên kết với hypericin.

6.2 Xác định

6.2.1 Điều kiện vận hành HPLC

Các điều kiện vận hành sau đây được coi là thích hợp:

- Cột: Kromasil 4,0 mm x 125 mm, 5 µm, RP 18;
- Nhiệt độ cột: 40 °C;
- Pha động: chế độ đẳng dòng; pha động A, pha động B
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;
- Bước sóng phát hiện: 590 nm;
- Thể tích bơm: 10 µl;
- Thời gian phân tích: 10 min;

CHÚ THÍCH: Pha động và tốc độ dòng có thể được điều chỉnh để giảm thời gian lưu và cải thiện hình dạng pic khi sử dụng cột tương đương.

6.2.2 Tiến hành phân tích

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và các dung dịch mẫu thử. Chuẩn bị dung môi chiết mẫu trắng metanol. Bơm mẫu trắng, sau đó bơm các dung dịch chuẩn.

Chuẩn bị đường chuẩn tuyến tính đối với hypericin. Đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa chiều cao pic và nồng độ chuẩn (mg/ml). Phân tích hồi quy tuyến tính dữ liệu thu được, với $R^2 \geq 0,999$.

Sau cùng là bơm mẫu.

7 Tính kết quả

Hàm lượng của từng chất phân tích (hypericin và pseudohypericin) trong mẫu thử, X , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{C \times V \times D \times 100}{W}$$

Trong đó:

- C là nồng độ hypericin hoặc pseudohypericin trong dung dịch thử, được ngoại suy từ đường chuẩn, tính bằng miligam/mililit (mg/ml);
- V là thể tích dung dịch thử cuối cùng, tính bằng mililit (ml);
- D là hệ số pha loãng mẫu (nếu có);
- W là khối lượng mẫu, tính bằng miligam (mg).

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- c) phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(tham khảo)

Chuyển dạng proto của hypericin và pseudohypericin khi phơi dưới đèn

Thời gian phơi, phút	Pseudohypericin, %	Hypericin, %	Tổng pseudohypericin và hypericin, %
0	0,11998	0,06860	0,18858
1	0,13145	0,07157	0,20302
3	0,15233	0,07756	0,22989
5	0,16696	0,08191	0,24887
10 ^a	0,17512	0,08379	0,25891
15	0,17589	0,08354	0,25943
20	0,17670	0,08317	0,25987
25	0,17604	0,08256	0,25890
30	0,17583	0,08260	0,25843
^a Sau 10 min phơi dưới đèn, nồng độ của hypericin và pseudohypericin lớn nhất, và không thấy còn hợp chất proto phát hiện được bằng sắc ký.			

Phụ lục B
(tham khảo)

Các thông số hiệu năng của phương pháp

Thông số	Khoảng nồng độ	Kết quả
Khoảng tuyến tính, µg/ml		0,1 đến 90
Giới hạn phát hiện, µg/ml		0,361
Giới hạn định lượng, µg/ml		0,321
Độ thu hồi	Từ 0,05 µg/ml đến 1 µg/ml	98,1 % đến 102 %
Độ chụm	Từ 0,05 µg/ml đến 1 µg/ml	
Độ lặp lại trong phòng thử nghiệm		< 4 %
Độ tái lập liên phòng thử nghiệm		< 4 %