

# NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG LYCOPEN TRONG CÀ CHUA BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Chữ Văn Mến\*, Nguyễn Duy Bắc\*,  
Đặng Trường Giang\*, Nguyễn Văn Long\*

## TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển phương pháp định lượng Lycopene trong cà chua bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với quang phổ UV-Vis. Phân tách được tiến hành trên cột pha đảo C<sub>18</sub> (5 µm, 10 mm x 250 mm), pha động gồm có methyl -tert butyl ether và methanol với tỷ lệ 75:25, tốc độ dòng 1,5 mL/phút, bước sóng 472,8 nm. Khoảng tuyến tính được xác định từ khoảng 0,02-66,67 µg/mL. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của Lycopene tương ứng là 8,0 và 16,0ng/mL. Độ đúng và độ chính xác của phương pháp tương ứng nằm trong khoảng là 97,6 % - 103,4 % và 2,35 % - 4,87 %. Phương pháp được áp dụng để xác định hàm lượng Lycopene trong 20 mẫu cà chua thu mua trên thị trường, kết quả cho thấy hàm lượng Lycopene của cà chua thay đổi từ 3 đến 12 mg/100 g, tính theo khối lượng tươi.

**Từ khóa:** Lycopene; Cà chua; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

## SUMMARY

### QUANTITATION OF LYCOPENE IN TOMATOES USING HPLC-UV/VIS METHOD

In this study, we developed a new HPLC-UV/Vis method for the quantitation of Lycopene in tomatoes. The separation was carried out on a reversed phase C<sub>18</sub> column (10 mm x 250 mm, 5 µm) with the mobile phase of methyl -tert butyl ether: methanol (75:25, v/v), flow rate of 1.5 mL/min, wavelength of 472 nm. The linear range of the method was 0.02-66.67 µg/mL. LOD and LOQ of the methods were 8,0 and 16,0 ng/mL, respectively. The precision and accuracy of the method were 2.35%-4.87% and 97.6%-103.4%, respectively. The method was applied to the quantitation of 20 tomatoes samples purchased from markets, the contents of Lycopene in Tomatoes varied from 3 to 12 mg/100 g based on fresh weight.

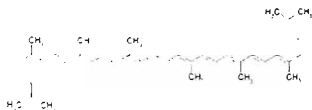
**Keywords:** Lycopene; Tomato; HPLC.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lycopene là một sắc tố thuộc nhóm carotenoid màu đỏ sáng và là chất được tìm thấy có nhiều trong cà chua và các quả có màu đỏ khác. Rau

quả có hàm lượng cao Lycopene gồm có gấc, cà chua, đu đủ, ớt... Cà chua (*Lycopersicon esculentum*) thuộc họ Cà, là một nông sản phổ biến nhất trên thế giới cũng như ở Việt Nam [1]. Về mặt cấu trúc, Lycopene là một tetraterpen được tạo bởi 8 đơn vị isopren (Hình 1), bao gồm 40 nguyên tử carbon và 56 nguyên tử hydro. Với 11 liên kết đôi liên hợp và 2 liên kết đôi không liên hợp, người ta thấy rằng đây là một chất chống oxy hóa hiệu quả hơn β-caroten, α-caroten, và α-tocopherol [2]. Lycopenehoạt tính chống oxy hóa cao nhất và khả năng dập tắt các gốc tự do oxy mạnh nhất trong số các carotenoid [3]. Lycopene từ quả cà chua có giá trị sinh học cao được sử dụng trong các chế phẩm thuốc, mỹ phẩm và thực phẩm hàng ngày giúp phòng và điều trị một số bệnh như: ung thư, tim mạch, huyết áp, bệnh đường tiêu hóa, bệnh mắt; giúp bồi bổ cơ thể, chống lão hóa; làm đẹp da, dưỡng da....Lycopene có hàm lượng cao trong quả cà chua là nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước. Lycopene được biết đến là một chất có tác dụng chống oxy hóa rất mạnh, tăng cường hệ miễn dịch, chống lão hóa, giảm thiểu các bệnh về tim mạch và trong điều trị ung thư, đặc biệt là ung thư tiền liệt tuyến [4-7].

**Hình 1:** Cấu trúc hóa học của Lycopene trong cà chua



Hàm lượng Lycopene trong cà chua phụ thuộc vào loài và tăng lên khi quả chín. Lycopene là một hợp chất kém bền với các tác nhân, hàm lượng thay đổi nhiều trong quá trình chế biến và xử lý. Hiện nay, Học Viện Quân Y đang tiến hành chiết xuất Lycopene trong nguyên liệu cà chua bằng phương pháp chiết siêu tới hạn với nhiều ưu điểm hơn các phương pháp truyền thống. Kiểm soát nguyên liệu đầu vào là rất quan trọng để đảm bảo quá trình chiết xuất được ổn định.

\* Học viên Quân Y

Phân viện khoa học: PGS.TS Vũ Bình Dương

Chính vì vậy, việc phát triển một phương pháp đơn giản để định lượng Lycopene trong cà chua là cần thiết. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát triển phương pháp định lượng Lycopene trong cà chua. Phương pháp này được áp dụng để phân tích các mẫu cà chua trước khi được chọn làm nguyên liệu cho chiết xuất siêu tới hạn.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ THIẾT BỊ

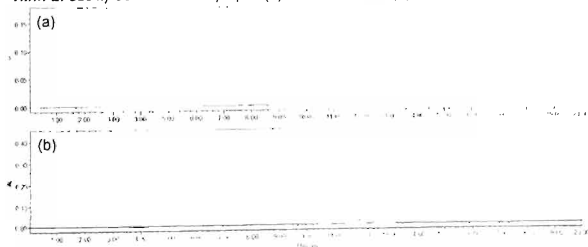
- Mẫu cà chua được mua tại các khu vực khác nhau của Việt Nam và được mã hóa thành các mẫu L01 đến L20.

- Hóa chất: Lycopene chuẩn (Sigma) độ tinh khiết trên 90%. Methyl - tert butyl ether, methanol, nước cất đạt tiêu chuẩn cho sắc ký lỏng hiệu năng cao. Các hóa chất dichloromethan, chloroform, carbon tetrachlorid, acid phosphoric đạt tiêu chuẩn phân tích.

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Alliance Water 2695D gồm hệ bơm 4 kênh dung môi, Autosampler, buồng ổn định nhiệt cột và Water 996 PADetector. Phân tích được thực hiện trên cột pha đảo C<sub>30</sub> (10 mm x 250 mm, 5 μm, Develosil, Normura Chemical, Japan).

## III. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

**Hình 2:** Sắc ký đồ của chuẩn Lycopene (a) và mẫu cà chua (b).



Kết quả cho thấy sắc ký đồ thu được cho các pic tách rõ ràng, nhiều nền thấp thể hiện qua sắc ký đồ của mẫu cà chua và chuẩn Lycopene. Trên sắc ký đồ, mẫu thử có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic Lycopene trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn với thời gian lưu là 12,635 phút (Hình 2). Tại thời gian lưu pic Lycopene trên các sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn, chúng tôi đã so sánh phổ hấp

## 3.1. Xây dựng quy trình định lượng

### 3.1.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu chuẩn và thử

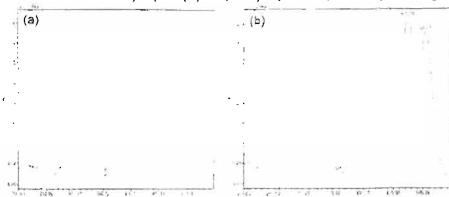
- Mẫu chuẩn: Dung dịch chuẩn mẹ được chuẩn bị bằng cách hòa tan Lycopene vào dung môi dichloromethan nồng độ 1 mg/ml. Các dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch mẹ Lycopene đến các nồng độ thích hợp.

- Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 10 g mẫu cà chua, thêm 5 mg BHT, nghiền nhỏ, cho vào bình nón định mức 100 ml, thêm 100 ml carbon tetrachlorid, chiết siêu âm trong 60 phút ở 25°C, lọc qua màng 0,45 μm, dịch lọc được dùng để tiêm mẫu.

### 3.1.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Chúng tôi tiến hành khảo sát với các điều kiện sắc ký: cột Develosil C<sub>30</sub> (10 mm x 250 mm; 5 μm); pha động gồm methyl-tert butyl ether: methanol với các điều kiện rửa giải khác nhau và chúng tôi tìm được điều kiện sắc ký tối ưu gồm có chương trình chạy đẳng dòng, tỷ lệ pha động là methyl-tert butyl ether: methanol = 75:25; tốc độ dòng 1,5 ml/phút, thể tích tiêm 10 μl; detector UV bước sóng phát hiện 472,8 nm. Kết quả thu được sắc ký đồ ở Hình 2:

thu UV thu được của pic. Kết quả cho thấy phổ mẫu thử và mẫu chuẩn trùng khít lên nhau với hệ số phù hợp lần lượt là 0,9997 (Hình 3). Điều này chứng tỏ: pic thu được trên sắc ký đồ của mẫu thử tinh khiết và các thành phần khác có trong mẫu thử không ảnh hưởng đến quá trình phân tích Lycopene.

**Hình 3:** Phổ UV của chuẩn Lycoplen (a) và pic Lycoplen được xác định trong mẫu cà chua (b).

### 3.2. Thẩm định phương pháp định lượng

#### 3.2.1. Lựa chọn bước sóng

Khảo sát các bước sóng khác nhau để định lượng Lycoplen. Kết quả xác định tỷ lệ tín hiệu/nhiều của pic chuẩn Lycoplen được trình bày trong bảng 1.

**Bảng 1:** Tỷ lệ tín hiệu/nhiều của Lycoplen tại các bước sóng khác nhau

Bước sóng (nm)	503,1	472,8	446,1	360,2	294,1	224,4
Tín hiệu/nhiều	31794	34392	30796	18381	22191	19629

Kết quả bảng 1 cho thấy ở bước sóng 472,8nm, pic Lycoplen có tỷ lệ tín hiệu/nhiều cao nhất vì vậy chúng tôi lựa chọn bước sóng này để phân tích Lycoplen trong các mẫu cà chua.

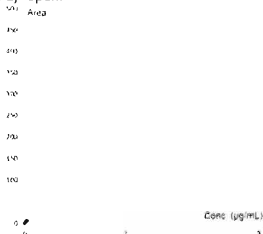
#### 3.2.2. Tính tương thích của hệ thống sắc kí (System Suitability):

Tính tương thích hệ thống sắc kí được khảo sát dựa vào việc phân tích 5 lần một mẫu chuẩn trên máy HPLC với cùng điều kiện đã nêu. Đánh giá dựa vào sai số tương đối và độ lệch chuẩn tương đối của 5 phép thử song song đối với thời gian lưu, diện tích pic.

**Bảng 2:** Kết quả đánh giá tính tương thích của hệ thống sắc ký:

Lycoplen (10 $\mu$ g/ml)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic
1	12,357	909629,00
2	12,346	913600,00
3	12,348	908757,00
4	12,357	912254,00
5	12,354	911784,00
Trung bình	12,352	911204,80
SD	0,005	1977,89
RSD(%)	0,042	0,217

Phương trình đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

**Hình 4:** Đường chuẩn của Lycoplen.

### 3.2.3. Đường chuẩn của Lycopen

Lycopen được hòa tan trong dichloromethan tới nồng độ 1000 µg/mL được dung dịch chuẩn mẹ dung để pha các dung dịch chuẩn làm việc khác. Các dung dịch chuẩn làm việc được pha loãng tới nồng độ thích hợp để thiết lập đường chuẩn bằng cách xây dựng mối liên hệ giữa diện tích pic Lycopan với nồng độ. Phương trình tuyến tính được xây dựng dưới dạng  $y = ax + b$ , trong đó  $y$  và  $x$  lần lượt tương ứng với diện tích pic và

nồng độ Lycopan. Đối với giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), dung dịch chuẩn mẹ được hòa loãng tới các nồng độ thích hợp với nước cất và tiêm vào hệ thống HPLC để phân tích. LOD được đánh giá dựa trên pic thấp nhất có thể phát hiện trên sắc đồ có giá trị tỷ lệ tín hiệu/nhiều bằng 3. LOQ được đánh giá dựa trên nồng độ thấp nhất có thể định lượng được có giá trị tín hiệu/nhiều bằng 10.

**Bảng 3:** Phương trình đường chuẩn, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của Lycopan.

Tham số	Giá trị
Hệ số góc	7,12
Intercept (giao trục tung)	0,19
Hệ số tuyến tính	0,9999
LOD (ng/ml)	8,0
LOQ (ng/ml)	16,0
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	0,02 – 66,67

### 3.2.4. Độ thu hồi

Thí nghiệm độ thu hồi được thực hiện để đánh giá mức độ chính xác của phương pháp bằng cách thêm một lượng xác định chuẩn vào mẫu đã biết trước hàm lượng. Hỗn hợp được chiết và phân tích ngay. Chất chuẩn thêm vào được chuẩn bị ở 3 nồng độ khác nhau; tại mỗi nồng độ, tiến hành lặp lại 5 lần.

**Bảng 4:** Độ thu hồi của Lycopan

Chất	Thêm(µg/ml)	Phát hiện(µg/ml)	Độ thu hồi trung bình (%)	RSD (%)
Lycopan	0,0	5,92	-	-
	5,0	10,82	98,01	2,01
	10,0	15,85	99,32	1,87
	25,0	30,31	97,64	3,11

### 3.2.5. Độ đúng và độ chính xác (độ lặp)

Độ đúng và độ lặp lại trong ngày được thực hiện bằng cách phân tích dung dịch chuẩn 5 lần/ngày, và độ đúng và độ lặp lại giữa các ngày được thực hiện bằng cách phân tích dung dịch chuẩn trong 5 ngày liên tiếp.

**Bảng 5:** Độ đúng và độ lặp lại của Lycopan

Nồng độ ban đầu (µg/ml)	Trong ngày (n=5)			Giữa các ngày (n=5)		
	Nồng độ phát hiện (µg/ml)	Độ đúng (%)	Độ lặp (%)	Nồng độ phát hiện (µg/ml)	Độ đúng (%)	Độ lặp (%)
50	48,80±2,21	97,60	4,52	51,70±2,52	103,40	4,87
25	25,79±1,00	103,16	3,89	24,94±0,78	99,76	3,14
10	10,27±0,24	102,70	2,35	10,21±0,35	102,10	3,43

### 3.3. Kết quả định lượng Lycopene trong các mẫu cà chua

Định lượng Lycopene trong các mẫu cà chua được thu mua tại các khu vực khác nhau. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6:** Hàm lượng Lycopene trong cà chua (mẫu tươi):

Mẫu	Hàm lượng (mg/100g)	SD (n=5)
L01	10,22	0,42
L02	6,97	0,17
L03	7,21	0,28
L04	12,87	0,51
L05	12,75	0,44
L06	9,39	0,38
L07	4,22	0,24
L08	5,97	0,37
L09	6,21	0,31
L10	10,88	0,45
L11	9,75	0,32
L12	7,39	0,29
L13	5,26	0,22
L14	5,92	0,27
L15	8,25	0,34
L16	10,84	0,41
L17	12,15	0,50
L18	6,91	0,27
L19	7,23	0,38
L20	12,80	0,46

Bảng trên cho thấy hàm lượng Lycopene thay đổi nhiều giữa các mẫu, hàm lượng biến đổi trong khoảng từ 4,22 đến 12,87 mg trên 100g cà chua tươi. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó.

## IV. KẾT LUẬN

Phương pháp mới và đơn giản định lượng Lycopene trong cà chua (*Lycopersicon esculentum*, họ Cà - Solanaceae) được phát triển và thẩm định đầy đủ. Phương pháp này được áp dụng vào phân tích hàm lượng Lycopene trong các mẫu cà chua thu mua trên thị trường. Kết quả cho thấy hàm lượng của Lycopene biến đổi nhiều giữa các mẫu thu mua trên thị trường.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Schulzova V., Hajslova J., *Biologically active compounds in tomatoes from various fertilization systems*, 3<sup>rd</sup> QLIF Congress, Hohenheim, Germany, 2007.
- Chun Yi, John Shi, S. Jun Xue, Y. Jiang, Dong Li, *Effects of supercritical fluid extraction parameters on Lycopene yield and antioxidant activity*, Food Chemistry, 2009, 113 (4), 1088-1094.
- Dimascio P., Kaiser S., Sies H., *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher*, Arch. Biochem. Biophys. 1989, 274, 532-538.
- Simona Drăgan, I. Gergen, Carmen Socaci, *Alimentația funcțională cu componente bioactive naturale în sindromul metabolic*, Edit. Eurostampa, 2008, 183.
- Tan LL, et al. *Lycopene inhibits the growth of human androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in BALB/c nude mice*. J. Nutr. 2005; 135, 287-290.
- Giovannucci E. *Tomatoes, tomato-based products, Lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature*. J Natl Cancer Inst 1999; 91, 317-331.
- Rao AV & Agarwal S. *Role of Lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review*. Nutr Res 1999; 19, 305-323.