

Sử dụng enzym protease hỗ trợ quá trình thủy phân để tách và định lượng đồng thời vitamin A, D₃, E trong thực phẩm bổ sung bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Hằng¹, Lê Thị Hồng Hào^{1*}, Phạm Thị Thanh Hà², Đinh Viết Chiến¹

¹ Viện Kiểm nghiệm ATVSTP Quốc gia, ² Trường ĐH Dược Hà Nội.

*E-mail: lethihonghao@yahoo.com

Summary

An HPLC method was developed for simultaneous determination of vitamin A, D₃ and E in food supplements and milk-based infant formulas. The analyzed samples were first kept undergoing enzymic hydrolysis with protease. By experiments of this hydrolysis for better extraction and isolation of each vitamin helped to establish the procedure as follows: To the analyzed samples, protease about 20% (v/w) and 50 ml KOH 20%/ethanol are added (60°C, 40 min); and then liquid-liquid extracted with n-hexane : petroleum ether (50:50). The developed method was validated in term of specificity, precision, accuracy, linearity, limit of detection and limit of quantitation. It proved to be specific, precise (RSD<2% at 6 replicates), accurate (with recovery 92.7% - 107% for vit. A; 83.8% - 97.6% for vit D₃; 84.4% to 97.2% for vit. E), linear (with R² >0.9997 for all the vitamins in question), and sensitive with LOD (µg/100 g blank sample) was 4.0 for vit. A; 0.7 for vit. D₃; 120 for vit. E and LOQ (µg/100 g blank sample) was 14.0 for vit. A; 2.3 for vit. D₃ and 400 for vit. E. The proposed method showed time-saving, economical and efficient, and as such, practically applicable to simultaneous determination of fat-soluble vitamins.

Keywords: Vitamin A, D₃, E, simultaneous determination, food supplements, protease.

Đặt vấn đề

Thực phẩm bổ sung ngày càng được cải tiến, phát triển với những nền mẫu đa dạng, phục vụ nhiều đối tượng người tiêu dùng như người già, phụ nữ có thai, trẻ nhỏ, người ốm yếu. Trong đó, các loại vitamin tan trong dầu hay được sử dụng để bổ sung trong thực phẩm nhằm phòng chống thiếu hụt vitamin và nâng cao sức khỏe. Do nền mẫu phức tạp, các vitamin thường được bổ sung dưới dạng vi lượng nên các phương pháp xử lý mẫu đơn giản gặp nhiều khó khăn khi tách và định lượng các vitamin A, D₃, E. Trong nghiên cứu này, enzym protease đã được sử dụng để thủy phân mẫu nhằm tăng hiệu quả tách và giúp định lượng đồng thời các vitamin A, D₃, E trong thực phẩm bổ sung bằng HPLC, sử dụng cột sắc ký pha đảo. Hướng nghiên cứu này đã giúp tiết kiệm thời gian, hóa chất phân tích, cho độ chính xác cao, đơn giản, dễ áp dụng tại các phòng kiểm nghiệm thực phẩm.

Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu kiểm tra đánh giá hàm lượng vitamin A, D₃, E bao gồm:

- Sữa công thức có vitamin A, D₃, E.
- Thực phẩm bổ sung vi chất dinh dưỡng.

Trang thiết bị, hóa chất

Danh mục các trang thiết bị, vật tư, hóa chất

- Thiết bị: Hệ thống SKLHNC UFLC, detector PDA (Shimadzu, Nhật); Máy cắt quay chân không Eyela (Tokyonikanika, Nhật); Máy quang phổ hấp thụ UV-VIS UV1800 (Shimadzu, Nhật);...
- Chất chuẩn đối chiếu: Chuẩn Retinol 99,5% (Sigma, Mỹ); Chuẩn D,L- α -tocopherol 99,5% (Sigma, Mỹ); Chuẩn cholecalciferol 99,5% (Sigma, Mỹ).
- Hóa chất, dung môi HPLC: THF, dicloromethan, methanol (Merck, Đức); protease kiểm hàm lượng > 500U/g (Sigma, Mỹ); các hóa chất n-hexan, petroleum ether, butyl hydroxy toluen (BHT), kali hydroxyd, ethanol (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

Cách pha dung dịch chuẩn

- Các dung dịch chuẩn gốc vitamin A nồng độ 150 ppm, vitamin D₃ 240 ppm, vitamin E 5245 ppm được chuẩn bị bằng cách cân lượng chuẩn tương ứng vào cốc có mỏ 50 ml, hòa tan bằng methanol, sau đó chuyển vào bình định mức dung tích 100 ml và định mức đến vạch với methanol.

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Các dung dịch chuẩn gốc bảo quản ở -20°C , sử dụng ổn định được trong 6 tháng, kiểm tra lại nồng độ định kì 3 tháng một lần hoặc khi cần thiết.

- Dung dịch chuẩn trung gian A, D₃, E: Lấy chính xác 1 ml mỗi loại dung dịch chuẩn gốc vitamin A, D₃, E bằng pipet vào trong bình định mức 10 ml, định mức tới vạch bằng methanol ở nhiệt độ phòng, lắc đều hỗn hợp, pha mới dung dịch này hàng ngày.

- Dung dịch chuẩn làm việc: Từ các dung dịch chuẩn trung gian, tiến hành pha loãng vào các bình định mức sao cho được dãy chuẩn dung dịch vitamin A, D₃, E có nồng độ loãng 20; 50; 500; 1000; 2000 lần so với các dung dịch chuẩn gốc.

Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát điều kiện thủy phân có sử dụng enzym protease để tăng hiệu suất thủy phân mẫu: tối ưu hóa các điều kiện thể tích enzym, nhiệt độ thủy phân, thời gian thủy phân, thể tích KOH 20%/ethanol, lựa chọn dung môi và tỷ lệ dung môi chiết tách vitamin A, D₃, E.

- Thẩm định quy trình phân tích.

- Ứng dụng qui trình đã xây dựng trong phân tích một số mẫu thực phẩm bổ sung trên thị trường.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình xử lý mẫu

Khảo sát ảnh hưởng của enzym đến quá trình thủy phân

Khảo sát 06 mẫu sữa công thức, mỗi mẫu khoảng 2,5 g vào lọ nhựa có nắp kín, thêm vào mỗi mẫu khoảng 0,1 g chất chống oxy hóa BHT, 10 ml nước để phân tán mẫu và enzym protease với thể tích thay đổi từ 0 → 1,5 ml. Siêu âm mẫu trong 15 phút. Thêm vào mỗi mẫu 50 ml KOH 20%/ethanol. Tiến hành thủy phân ở 60°C trong 40 phút và phân tích trên hệ thống HPLC. Từ kết quả khảo sát cho thấy, sử dụng enzym protease làm tăng hiệu suất thủy phân mẫu từ 8-18%; trong đó khi thể tích enzym chiếm khoảng 20% so với cơ chất (mẫu kiểm nghiệm) thì quá trình thủy phân đạt hiệu quả tốt nhất; với các mẫu sử dụng lượng enzym nhiều hơn, khi phân tích trên sắc ký thấy xuất hiện

nhiều nền nhiễu hơn. Do đó, chúng tôi lựa chọn thể tích enzym chiếm 20% khối lượng mẫu.

Khảo sát thể tích KOH 20%/ EtOH

Tiến hành phân tích song song 5 mẫu sữa có khối lượng khoảng 5 g, cố định thể tích Enzym bổ sung để hỗ trợ thủy phân là 1 ml (chiếm 20% cơ chất), thay đổi thể tích KOH 20%/ ethanol từ 30 → 100 ml. Sau đó tiến hành các qui trình thủy phân, tách và định lượng bằng HPLC. Kết quả cho thấy với thể tích KOH 20%/EtOH là 50 ml vừa tiết kiệm hóa chất phân tích vừa giúp thủy phân được tối đa lượng mẫu phân tích.

Khảo sát nhiệt độ thủy phân

Tiến hành thủy phân các mẫu tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau trong khoảng từ 50°C đến 90°C , các thông số khác không thay đổi (thể tích enzym, thể tích KOH, thời gian thủy phân). Nhận thấy với nhiệt độ thủy phân là 60°C cho hàm lượng vitamin thu được cao nhất. Nhiệt độ thấp quá thì vitamin A và E ở dạng ester chưa được thủy phân hoàn toàn, kết quả định lượng thấp; nhiệt độ cao quá khiến cho kết quả định lượng giảm đi đáng kể vì đây là các vitamin không bền với nhiệt độ cao.

Khảo sát thời gian thủy phân

Tiến hành thủy phân 5 mẫu, mỗi mẫu khoảng 5 g, cố định các thông số: thể tích enzym khoảng 1 ml, thể tích KOH 50 ml, nhiệt độ thủy phân 60°C , thời gian thủy phân thay đổi 30, 45, 60, 75, 90 phút. Lựa chọn thời gian thủy phân 60 phút cho hàm lượng vitamin D₃ và E cao nhất, nếu kéo dài thời gian thủy phân, hàm lượng lên đến 90 phút, hàm lượng vitamin A có cao hơn nhưng hàm lượng vitamin D₃ lại giảm đáng kể.

Khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết và tỷ lệ dung môi chiết

Tiến hành phân tích song song các mẫu với điều kiện thủy phân đã được tối ưu ở trên với dung môi chiết thay đổi n-hexan, ether dầu hỏa, hỗn hợp các dung môi trên. Kết quả cho thấy sử dụng n-hexan:ether dầu hỏa theo tỷ lệ 50:50 cho hiệu quả tách vitamin cao nhất, đồng thời trong quá trình chiết, cân bằng giữa hai pha diễn ra nhanh hơn.

Bảng 1: Kết quả khảo sát quá trình xử lý mẫu

Khảo sát ảnh hưởng của enzym đến quá trình thủy phân					
Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Thể tích Enzym (ml)	Hàm lượng vitamin A ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Hàm lượng vitamin D ₃ ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Hàm lượng vitamin E (mg/100g)
M1	2,3217	0	445	12,3	12,3
M2	2,6008	0,25	478	13,2	13,6
M3	2,6078	0,5	506	13,4	14,5
M4	2,6038	0,75	505	12,6	14,2
M5	2,4887	1,00	498	12,9	14,4
M6	2,5059	1,50	503	12,5	14,3

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Khảo sát ảnh hưởng của thể tích KOH 20% / EtOH

Mẫu	Khối lượng cân (g)	Thể tích KOH 20% / ethanol	Hàm lượng vitamin A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin D ₃ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin E (mg/100 g)
Mẫu 1	5,221	30	414	11,1	11,6
Mẫu 2	5,018	40	497	13,2	14
Mẫu 3	5,0125	50	519	14,0	14,1
Mẫu 4	5,0215	70	502	14	13,8
Mẫu 5	5,1008	100	491	13,1	13,9

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân

Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Nhiệt độ thủy phân	Hàm lượng vitamin A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin D ₃ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin E (mg/100 g)
M1	5,0752	50°C	293	13,6	8,7
M2	5,0669	60°C	530	14,7	14,5
M3	5,0156	70°C	459	14,4	13,8
M4	5,0180	80°C	481	12,0	13,7
M5	5,0101	90°C	298	10,7	8,3

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân

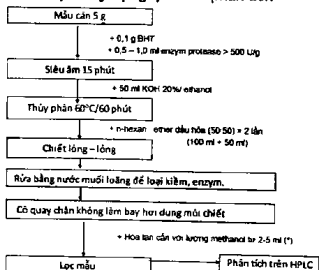
Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Thời gian thủy phân (phút)	Hàm lượng vitamin A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin D ₃ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin E (mg/100 g)
M1	5,0722	30	460	14,9	13,7
M2	5,0680	45	476	14,8	13,7
M3	5,0074	60	501	15,2	13,9
M4	5,0316	75	498	13,7	13,3
M5	5,0618	90	508	7,5	13,3

Khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết

Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Dung môi chiết	Hàm lượng vitamin A ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin D ₃ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Hàm lượng vitamin E (mg/100 g)
M1	5,2209	n-hexan	472	13,3	14,1
M2	5,1537	petroleum ether	483	13,4	13,6
M3	5,0268	n-hexan: petroleum ether (50:50)	504	13,8	13,9

Kết quả và bàn luận

Kết quả xây dựng qui trình phân tích



Hình 1: Quy trình phân tích các vitamin A, D₃, E

(*) Thể tích hòa cần phụ thuộc vào hàm lượng chất phân tích trong mẫu

Điều kiện sắc ký: Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao UFLC Shimadzu.

Cột Shodex C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm);

Detector PDA bước sóng 265 nm, 292 nm, 325 nm;

Pha động: Methanol: THF: H₂O (92:3:5);

Tốc độ dòng: 1,5 ml/ phút;

Nhiệt độ buồng cột: 40°C;

Thể tích tiêm: 20 μl .

Thẩm định phương pháp phân tích

Tính thích hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần các dung dịch chuẩn đơn có nồng độ chính xác khoảng 0,5 ppm với vitamin A, 15 ppm với vitamin E, 0,7 ppm với vitamin D₃, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Kết quả cho thấy giá trị RSD (%) của thời gian lưu và diện tích pic đều đạt yêu cầu (RSD < 2%) [4].

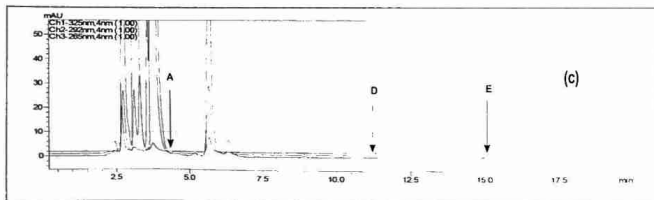
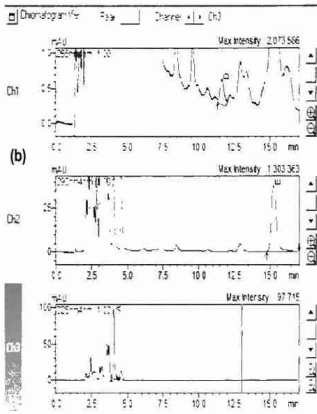
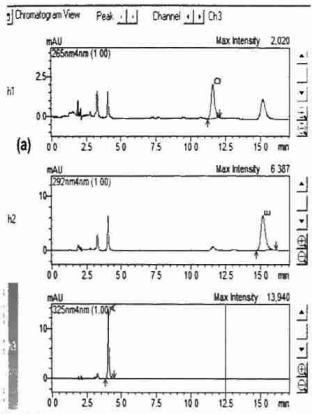
Bảng 2: Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống

TT		L1	L2	L3	L4	L5	L6	TB	RSD %
Vitamin A	S pic	35733	35825	35806	35812	36019	35914	35851	0,278
	$t_{R(pH)}$	4,03	4,02	4,06	4,11	4,08	4,09	4,07	0,86
Vitamin D ₃	S pic	19901	19805	19791	20016	20129	19981	19937	0,654
	$t_{R(pH)}$	11,57	11,55	11,59	11,62	11,60	11,60	11,59	0,21
Vitamin E	S pic	78651	78012	80012	81572	79986	80314	79757	1,585
	$t_{R(pH)}$	15,14	15,11	15,17	15,21	15,20	15,21	15,17	0,27

Độ chọn lọc

So sánh pic của chất phân tích tại cùng một thời gian lưu của mẫu chuẩn và mẫu thử. Kết quả cho thấy tại thời điểm thời gian lưu của chất chuẩn đều xuất hiện pic của chất phân tích trên các

mẫu thử, mẫu trắng thêm chuẩn tương ứng. Độ tinh khiết của các pic phân tích đều đạt trên 99%. Mẫu trắng không xuất hiện pic phân tích tại các điểm thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất phân tích trên mẫu chuẩn.



Hình 2: (a) Sắc ký đồ mẫu chuẩn; (b) Sắc ký đồ mẫu thử; (c) Sắc ký đồ mẫu trắng

Khoảng tuyến tính

Bảng 3: Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Vitamin	Khoảng nồng độ tuyến tính	Đường chuẩn	Hệ số R ²
Vitamin A	Từ 0,05 ppm đến 20 ppm	$y = 71846x - 189,83$	0,9999
Vitamin D ₃	Từ 0,14 ppm đến 27 ppm	$y = 28522x - 173,77$	1,0000
Vitamin E	Từ 3 ppm đến 600 ppm	$y = 5372,1x - 5930,5$	0,9997

Nhân thấy trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ các vitamin và tỷ lệ diện tích pic tương ứng với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1.

Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

LOD được xác định bằng cách thêm chuẩn (từ các dung dịch chuẩn đã chuẩn bị ở mức "Cách pha dung dịch chuẩn") với hàm lượng giảm dần vào mẫu trắng đến khi kết quả trên sắc ký đồ thu được pic của chất phân tích có chiều cao gấp khoảng 3 lần nhiễu đường nền.

Bảng 5: Bảng kết quả tính độ lặp lại

Chỉ tiêu	Khối lượng cân (g)	Thể tích định mức (ml)	Diện tích pic	Hàm lượng (µg/100g)	Trung bình (µg/100g)	SD	RSD (%)	Yêu cầu của AOAC
Vitamin A	2,5073	4	96351	219	231,5	11,6	5,00	< 11%
	2,5421	4	103360	227				
	2,6036	4	105445	226				
	2,5960	4	112554	242				
	2,4767	4	100330	226				
	2,6137	4	116880	249				
Vitamin D	2,5073	4	2539	15,4	14,6	0,8	5,82	< 15%
	2,5421	4	2277	13,6				
	2,6036	4	2512	14,7				
	2,5960	4	2553	14,9				
	2,4767	4	2494	15,3				
	2,6137	4	2309	13,4				
Vitamin E	2,5073	4	238656	7,3	7,5	0,23	3,15	< 5,3%
	2,5421	4	257048	7,7				
	2,6036	4	251954	7,4				
	2,5960	4	258401	7,6				
	2,4767	4	229302	7,1				
	2,6137	4	260112	7,8				

Độ thu hồi

Đánh giá độ thu hồi bằng cách thêm lượng chuẩn đã biết trước của các vitamin A, D₃, E vào

Giới hạn định lượng LOQ = 10/3 * LOD. Các giá trị LOD, LOQ tính được đối với lượng mẫu trắng khoảng 5 g.

Bảng 4: Kết quả xác định LOD & LOQ

Vitamin A	Vitamin D ₃	Vitamin E
Nồng độ thêm chuẩn (µg/100g mẫu) (ppm)	Nồng độ thêm chuẩn (µg/100g mẫu) (ppm)	Nồng độ thêm chuẩn (µg/100g mẫu) (ppm)
LOD 0,051	4	0,035
LOQ 0,170	14	0,115
		2,3
		5,024
		400

Độ lặp lại

Phân tích lặp lại 6 mẫu thực phẩm bổ sung có khối lượng cân gần bằng nhau. Hàm lượng vitamin A, D₃, E và các giá trị độ lệch chuẩn tương đối được tính tại bảng Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại đạt yêu cầu theo AOAC [4].

nên mẫu thực phẩm bổ sung. Tính hiệu suất thu hồi và so sánh với tiêu chuẩn AOAC.

Bảng 6: Kết quả đánh giá độ thu hồi

Chỉ tiêu	Nồng độ mẫu thực (µg/100g)	Nồng độ thêm vào (µg/100g)	Nồng độ định lượng (µg/100g)	Độ thu hồi	Theo yêu cầu AOAC [4]
Vitamin A	231,5 ± 11,6	354,2 ± 33	590 ± 41,3	101,3%	80-110%
Vitamin D	14,6 ± 0,8	23,9 ± 2,13	36,4 ± 2,74	91,1%	80-110%
Vitamin E	7414 ± 233,7	10478 ± 977,3	16958 ± 1310,6	91,1%	80-107%

(Xem tiếp trang 40)