

3. Lê Thị Hồng Hào, Phạm Luận, Nguyễn Xuân Trung (2006), “Ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao với dẫn suất trước cột AQC để tách và xác định đồng thời 17 axit amin trong cá”, *Tạp chí phân tích Hoá, Lý và Sinh học*, Tập 11, Số 4/2006, trang 15 - 23.
4. Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thuý Dung (2007), “Đánh giá chất lượng Protein trong đậu tương, đậu phụ và sữa đậu nành trên thị trường Hà Nội” , Kỷ yếu hội nghị khoa học vệ sinh an toàn thực phẩm lần thứ 4 - 2007, Nhà xuất bản y học, trang 281 - 286.
5. Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thuý Dung (2007) , “ Xác định hàm lượng một số acid amin trong đậu tương và sản phẩm chế biến bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao” , *Tạp chí dinh dưỡng và thực phẩm, Hội Dinh dưỡng Việt Nam*, Tập 3 - Số 4 - Tháng 12 năm 2007, trang 68 - 77.
6. Lê Thị Hồng Hào (2004), “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) tối ưu hoá các điều kiện phân tích một số axit amin trong cá”, *Giấy chứng nhận đăng ký kết quả nghiên cứu khoa học và công nghệ số: 2006-64-095/KQ của Trung tâm thông tin khoa học và công nghệ quốc gia, Bộ khoa học và công nghệ*.
7. Lê Hồng Dũng, Lê Thị Hồng Hào (2007), “Bước đầu xác định hàm lượng Daidzein, genistein và 17 axit amin trong đậu tương và sản phẩm chế biến”, *Giấy chứng nhận đăng ký kết quả nghiên cứu khoa học và công nghệ số: 2007-64-329/KQNC của Trung tâm thông tin khoa học và công nghệ quốc gia, Bộ khoa học và công nghệ*.

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
----- -----

LÊ THỊ HỒNG HẢO

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA CÁC ĐIỀU KIỆN ĐỂ TÁCH
VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ AXÍT AMIN TRONG THỰC
PHẨM BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

Chuyên ngành: **Hóa phân tích**
Mã số: **62 44 29 01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ HÓA HỌC

Hà Nội - 2008

Công trình được hoàn thành tại: Bộ môn Hoá Phân tích, Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học quốc gia Hà Nội; Viện Dinh Dưỡng Quốc Gia - Bộ Y tế.

Nam”, *Tạp chí Y học thực hành*, số 496, trang 92-95.

Người hướng dẫn khoa học: **PGS. TS. Phạm Luận**
PGS. TS. Nguyễn Xuân Trung

Phản biện 1: **GS. TSKH. Trịnh Xuân Giản**
Viện Hóa học - Viện KH&CN Việt Nam

Phản biện 2: **PGS. TS. Ngô Huy Du**
Hội KHKH phân tích Hóa, Lý và Sinh học Việt Nam

Phản biện 3: **PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo**
Viện Công nghệ Môi trường - Viện KH&CN Việt Nam

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước họp tại Phòng Hội thảo - Khoa Hóa học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội vào hồi **9h00 ngày 29 tháng 4 năm 2008**.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội
- Trung tâm Thông tin - Tư liệu - Đại học Quốc Gia Hà Nội

tính.

5. Lần đầu tiên ở Việt Nam, đã đưa ra quy trình phân tích xác định đồng thời 17 axit amin trong nhiều loại thực phẩm thông dụng đại diện mà nhân dân ta thường dùng, cụ thể đã phân tích 51 mẫu gồm đậu tương, đậu phụ và sữa đậu nành, 50 mẫu cá các loại và 20 mẫu thịt các loại.
6. Phương pháp phân tích đồng thời 17 axit amin đã được chuẩn hóa và các số liệu phân tích hàm lượng 17 axit amin trong đậu tương, đậu phụ, sữa đậu nành, cá và thịt các loại có thể sử dụng trong việc cập nhật số liệu vào bảng thành phần thực phẩm Việt Nam. Đề nghị được áp dụng phương pháp phân tích axit amin đã được chuẩn hóa này cho nhiều đối tượng thực phẩm khác nhau nhằm cung cấp thêm số liệu vào bảng thành phần thực phẩm của Việt Nam và số liệu cho các nghiên cứu dinh dưỡng cũng như cho chế độ ăn dùng cho người bệnh./.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. Ha Thi Anh Dao, Le Thi Hong Hao, Nguyen Thanh Huong, Nguyen Thi Dung (2003), “The nutritive quality of selected street foods in Hanoi”, *ASEAN food science and technology: cooperation and integration for development, proceedings of the 8th ASEAN food conference, agriculture publishing house- Hanoi, pp. 228-233.*
2. Lê Thị Hồng Hảo, Hà Thị Anh Đào, Nguyễn Thuý Dung (2004), “Hàm lượng axit amin trong một số loại cá Việt

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Axit amin là một thành phần quan trọng của cơ thể. Axit amin tạo nên tế bào, phục hồi mô, tạo nên các kháng thể chống lại vi khuẩn và virus. Axit amin là một phần của enzym và hệ thống hormon. Nó tạo nên ARN (axít ribo nucleic), ADN (axít deoxy nucleic) vận chuyển oxy đi khắp cơ thể và tham gia vào hoạt động của các cơ. Axit amin cung cấp cho cơ thể từ thực phẩm giàu protein. Protein khi vào cơ thể được chuyển hóa thành 20 axit amin, trong đó có 8 axit amin thiết yếu không được tạo ra từ cơ thể, isoleucin, leucin, lysin, methionin, phenylalanin, threonin, tryptophan và valin. Sự thiếu hụt axit amin dẫn đến cơ thể mệt mỏi, hạ đường huyết, dị ứng [81].

Tại Việt Nam, việc phân tích các thành phần có hoạt tính sinh học trong thực phẩm còn hạn chế, chủ yếu mới có số liệu của một số loại carotenoid trong rau, quả. Số liệu phân tích các axit amin trong thực phẩm Việt Nam còn thiếu, đặc biệt đối với một số axit amin quan trọng như lysin, cystin,... Cho đến nay, tại Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào về tách và xác định đồng thời 17 axit amin trong một số nhóm thực phẩm thông dụng (gồm: một số loại thịt, một số loại cá nước ngọt, cá nước mặn, cũng như hạt đậu tương và các sản phẩm chế biến từ đậu tương) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Việc tách và xác định 17 axit amin trong một số loại thịt, một số loại cá nước ngọt, cá nước mặn, cũng như hạt đậu tương và các sản phẩm chế biến từ đậu tương giúp chúng ta có được cách phối hợp hiệu quả các thực phẩm với nhau để nâng cao chất lượng của protein trong khẩu phần và như vậy là vấn đề cần thiết có tính thời sự và

thực tiễn phục vụ cho khảo sát nguồn thực phẩm giàu axit amin ở Việt Nam. Đồng thời việc này cũng góp phần bổ sung, hoàn thiện số liệu của bảng thành phần thực phẩm Việt Nam và cung cấp số liệu cho các nghiên cứu dinh dưỡng.

Vì vậy, đề tài này được thực hiện với mục tiêu nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện để tách và xác định một số axit amin trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2. Nội dung của luận án

Các nghiên cứu của luận án nhằm góp phần phát triển phương pháp phân tích đồng thời 17 axit amin trong thực phẩm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao phục vụ việc phân tích thành phần dinh dưỡng và đặc biệt các thành phần có hoạt tính sinh học (axit amin) trong thực phẩm thông dụng Việt Nam. Để đạt được mục tiêu đề ra, một số vấn đề cần được giải quyết là:

- Tổng kết các tài liệu về các phương pháp phân tích định lượng axit amin trong nước và trên thế giới từ trước đến nay.
- Nghiên cứu tìm và chọn những điều kiện tối ưu như các thông số máy, cột tách, pha động,... để tách và xác định đồng thời 17 axit amin bằng kỹ thuật HPLC/FID.
- Đánh giá thống kê phương pháp phân tích đưa ra.
- Áp dụng phương pháp đã xây dựng để phân tích một số mẫu thực phẩm đại diện.
- Đánh giá kết quả thành phần axit amin của thực phẩm Việt Nam so với thành phần axit amin của các thực phẩm tương tự trên thế giới.
- Đánh giá chất lượng protein của một số đối tượng thực phẩm dựa vào thành phần axit amin thiết yếu.

2. Những đóng góp mới của luận án

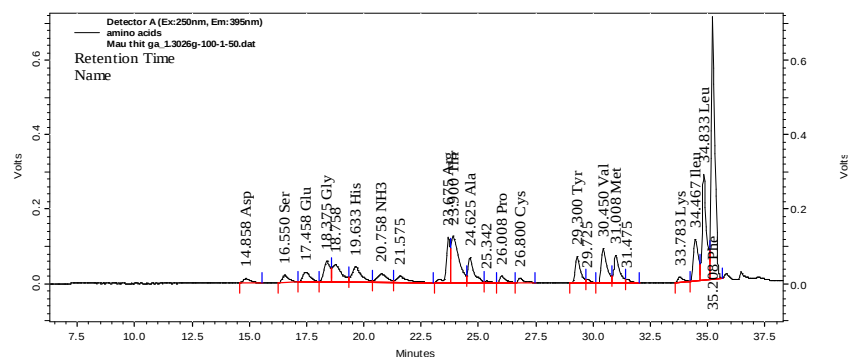
tính hình thành do quá trình ăn uống. Để đáp ứng đủ nhu cầu dinh dưỡng và đồng thời tiết kiệm được chi phí, người dân nên tăng cường ăn các loại cá và các sản phẩm nhóm đậu đỗ thay vì thường xuyên sử dụng các loại thịt như thói quen thông thường trước đây.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở những kết quả đã nghiên cứu với mục đích là nghiên cứu tối ưu hóa quy trình xác định đồng thời 17 axit amin trong các đối tượng thực phẩm khác nhau, chúng tôi đã đạt được kết quả như sau:

1. Nghiên cứu và khảo sát một cách có hệ thống và chọn được các điều kiện thích hợp nhất của hệ RP-HPLC như các thông số máy, thể tích bơm mẫu, loại detector, bước sóng; loại pha tĩnh, cỡ hạt, loại pha động, thành phần và tốc độ pha động, rút ngắn được thời gian phân tích, làm tăng độ nhạy cho việc tách và xác định đồng thời 17 axit amin.
2. Nghiên cứu chọn được các điều kiện để thủy phân xử lý mẫu, các điều kiện chuyển mẫu về môi trường phù hợp trước khi chuẩn bị dẫn xuất mà không nhất thiết phải đuổi hết axit còn dư khi thủy phân mẫu, tiết kiệm thời gian cũng như tránh sự mất mát axit amin (đưa ra 2 lược đồ quy trình thủy phân).
3. Nghiên cứu áp dụng một cách hệ thống kỹ thuật dẫn xuất với chất dẫn xuất (AQC) để cho sản phẩm của quá trình sau dẫn xuất có thời gian ổn định lâu, tách tốt và có độ nhạy, độ lặp lại cao.
4. Quy trình phân tích đưa ra đã được đánh giá bằng đường chuẩn, sai số, độ lặp lại và hệ số thu hồi. Độ thu hồi đối với các loại axit amin nằm trong khoảng 89 - 98% trong vùng đường chuẩn tuyến

mẫu thăn thịt bò, 5 mẫu thăn bê, 5 mẫu thịt gà và 5 mẫu thịt lợn. Hàm lượng tổng các axit amin trong thịt bò cao hơn hàm lượng axit amin trong thịt lợn và tổng hàm lượng axit amin trong gà công nghiệp là thấp nhất 8,64 g/100g. Mặc dù tổng axit amin trong mẫu thịt bò là cao nhất, nhưng không có đầy đủ các axit amin như thịt lợn và thịt gà.



Hình 3.36. Sắc đồ tách axit amin trong dịch thủy phân mẫu sữa đậu nành, cột RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 μ m), tốc độ dòng 1ml/phút, detector huỳnh quang ($\lambda_{ex} = 250$; $\lambda_{em} = 395$)

Qua kết quả phân tích hàm lượng các axit amin trong các loại thực phẩm cho thấy, tổng hàm lượng axit amin trong các loại thực phẩm như hạt đậu tương (33 - 40g/100g), đậu phụ (7 - 10g/100g), thịt (8,6 - 18 g/100g) và cá (8 - 21 g/100g) không có sự chênh lệch đáng kể. Từ kết quả nghiên cứu này, chúng ta có thể tuyên truyền, khuyến cáo giúp cho người dân có cái nhìn tổng quát hơn về chất lượng của các loại thực phẩm, có thể tính khẩu phần ăn, cân đối và lựa chọn nguồn thực phẩm giàu đạm và phối hợp các loại thực phẩm khác nhau vẫn đủ dinh dưỡng mà giảm được nguy cơ của các bệnh mãn

1. Nghiên cứu và khảo sát một cách có hệ thống và chọn được các điều kiện thích hợp nhất của hệ RP-HPLC như loại pha tĩnh, cỡ hạt, loại pha động, thành phần và tốc độ pha động, rút ngắn được thời gian phân tích, làm tăng độ nhạy cho việc tách và xác định đồng thời 17 axit amin. Đã chọn được các thông số máy, tối ưu hóa được các điều kiện phù hợp của hệ thiết bị sắc ký (HPLC) như thể tích bơm mẫu, loại detector (detector huỳnh quang), bước sóng.
2. Nghiên cứu chọn được các điều kiện để thủy phân xử lý mẫu, các điều kiện chuyển mẫu về môi trường phù hợp trước khi chuẩn bị dẫn xuất mà không nhất thiết phải đuổi hết axit còn dư khi thủy phân mẫu, tiết kiệm thời gian cũng như tránh sự mất mát axit amin (đưa ra 2 lược đồ quy trình thủy phân mẫu).
3. Lần đầu tiên tại ở Việt Nam đã nghiên cứu một cách hệ thống áp dụng kỹ thuật dẫn xuất với chất dẫn xuất Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamat (AQC) để cho sản phẩm của quá trình sau dẫn xuất có thời gian ổn định lâu, tách tốt và có độ nhạy, độ lặp lại cao.
4. Lần đầu tiên ở Việt Nam đã đưa ra quy trình phân tích đồng thời 17 axit amin trong các loại thực phẩm khác nhau. Đóng góp kết quả phân tích đồng thời 17 axit amin trong một số loại thực phẩm thông dụng đại diện mà nhân dân ta thường dùng (10 loại cá, 4 loại thịt, đậu tương, sữa đậu nành) để bổ sung và hoàn thiện số liệu của bảng thành phần thực phẩm Việt Nam.

4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 114 trang với 40 hình và sắc đồ; 37 bảng số liệu và 84 tài liệu tham khảo. Luận án được cấu tạo gồm: 7 trang danh mục các bảng biểu, hình vẽ, sắc đồ, đồ thị và mục lục, 3 trang mở

đầu, 25 trang tổng quan tài liệu, 17 trang nội dung và phương pháp nghiên cứu, 67 trang kết quả nghiên cứu và thảo luận, 1 trang kết luận, 1 trang kiến nghị. Ngoài ra luận án còn có 2 trang danh mục công trình của tác giả có liên quan đến luận án, 10 trang tài liệu tham khảo và 11 trang phụ lục.

B. NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Chương này đề cập đến nội dung như sau:

Lịch sử phát hiện ra protein và axit amin, phân lập và xác định cấu trúc của các axit amin, tác dụng của protein cũng như axit amin với cơ thể con người và tính chất hoá lý của axit amin. Các phương pháp định tính và định lượng protein cũng như axit amin.

Phương pháp truyền thống phân tích axit amin được đưa ra và phát triển bởi Moore và Stein là tách và xác định các axit amin tự do bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion với dẫn xuất sau cột (ninhydrin hoặc O-phthalaldehyd). Kỹ thuật này đã được áp dụng hơn 40 năm. Trong thời gian qua đã có nhiều phương pháp áp dụng để phân tích axit amin như: điện di mao quản (CE), sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS), sắc ký khí (GC/FID), sắc ký khí khối phổ, nhưng mỗi phương pháp có hạn chế riêng.

Để xây dựng một phương pháp phân tích đồng thời một số axit amin thì phương pháp HPLC có một số ưu điểm mà ít có phương pháp khác có thể được, đó là: quá trình tách và xác định là một hệ thống kín, quá trình dẫn xuất có thể sử dụng dẫn xuất trước hoặc sau cột, dung môi chạy sắc ký chủ yếu là đệm, quá trình thủy phân mẫu và hòa tan mẫu là các axit vô cơ không tốn kém. Chính vì những ưu điểm trên mà nhiều tác giả đã lựa chọn phương pháp HPLC để tách và phân tích axit amin.

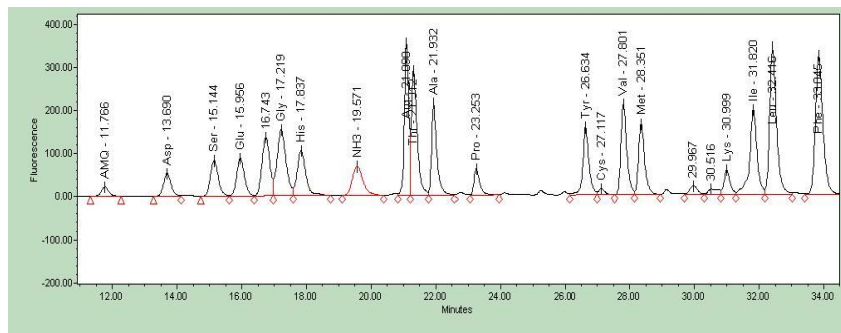
và lấy giá trị trung bình cho thấy tổng hàm lượng 17 axit amin nằm trong khoảng 33 - 40g/100g. Trong đó ngoài axit glutamic có tỷ lệ cao nhất một số axit amin không thay thế cũng có hàm lượng khá cao như phenylalanin, leucin, isoleucin, threonin, valin và lysin. Kết quả hàm lượng tổng 17 axit amin trong hạt đậu tương theo bảng thành phần của Mỹ là 37,99g/100g. Như vậy đậu tương của ta cũng có hàm lượng các axit amin cao.

Trong thành phần của đậu phụ có đủ các axit amin cần thiết cho cơ thể. Trong 6 chợ được tiến hành thu thập mẫu, phân tích và lấy giá trị trung bình cho thấy tổng hàm lượng 17 axit amin nằm trong khoảng 7 - 10g/100g. Trong đó ngoài axit glutamic có tỷ lệ cao nhất một số axit amin không thay thế cũng có hàm lượng khá cao như phenylalanin, leucin, isoleucin, tyrosin và lysin. Đặc biệt đậu phụ mua ở chợ Mơ cho thấy có hàm lượng tổng axit amin là cao nhất so với đậu ở các chợ khác 10,6g/100g. Kết quả hàm lượng tổng 17 axit amin trong đậu phụ theo bảng thành phần của Mỹ là 14,9g/100g.

Trong thành phần sữa đậu nành có đủ các axit amin cần thiết cho cơ thể. Tổng hàm lượng 17 axit amin trung bình nằm trong khoảng 11 - 18mg/lit. Trong đó, ngoài axit glutamic có tỷ lệ cao nhất một số axit amin không thay thế cũng có hàm lượng khá cao như arginin, phenylalanin, leucin, tyrosin, threonin và lysin. Kết quả hàm lượng tổng 17 axit amin trong sữa đậu nành theo bảng thành phần của Mỹ là 3,65g/100g. Có sự sai lệch lớn về nồng độ tổng 17 axit amin so với bảng thành phần của Mỹ là do độ đậm đặc của loại sữa đậu nành và do có sự khác nhau về đơn vị khi phân tích (mg/lit so với g/100g của Mỹ).

3.6.3. Kết quả phân tích mẫu thịt các loại

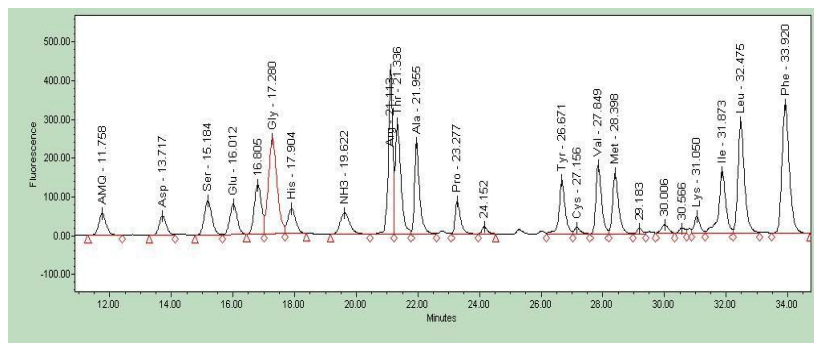
Mẫu nghiên cứu gồm 4 loại thịt đại diện cho 20 mẫu thịt: 5



Hình 3.33: Sắc đồ tách axit amin trong dịch thủy phân mẫu cá thu, cột RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 μ m), tốc độ dòng 1ml/phút, detector huỳnh quang ($\lambda_{ex} = 250$; $\lambda_{em} = 395$)

3.6.2. Kết quả phân tích mẫu đậu tương, đậu phụ và sữa đậu nành

Tổng số mẫu phân tích cho 3 loại thực phẩm là 17 x 3 = 51



mẫu.

Hình 3.35: Sắc đồ tách axit amin trong dịch thủy phân mẫu đậu phụ, cột RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 μ m), tốc độ dòng 1ml/phút, detector huỳnh quang ($\lambda_{ex} = 250$; $\lambda_{em} = 395$)

Trong thành phần của hạt đậu tương có đủ các axit amin cần thiết cho cơ thể. Trong 7 chợ được tiến hành thu thập mẫu, phân tích

Vì vậy, đề tài này được thực hiện nhằm bước đầu xây dựng phương pháp xác định đồng thời 17 axit amin trong thực phẩm phục vụ cho công tác nghiên cứu chế độ ăn trong dinh dưỡng phòng và điều trị bệnh là rất có ý nghĩa về mặt khoa học và thực tiễn.

CHƯƠNG 2.

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mục tiêu của đề tài này là nghiên cứu, khảo sát có hệ thống để xây dựng phương pháp tách và xác định đồng thời 17 axit amin trong thực phẩm và áp dụng quy trình vào phân tích mẫu thực phẩm đại diện phục vụ cho công tác nghiên cứu chế độ ăn trong phòng, điều trị bệnh và cung cấp số liệu cho bảng thành phần dinh dưỡng thực phẩm do Viện Dinh dưỡng quốc gia biên soạn. Để đạt được mục tiêu đề ra, chương 2 đã đưa ra các vấn đề cần được giải quyết.

Luận văn chọn phương pháp phân tích là sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) để tách và xác định 17 axit amin trong thực phẩm. Đưa ra những dụng cụ, hoá chất cần thiết để thực hiện nghiên cứu cũng như phương pháp lấy mẫu và đối tượng mẫu để tiến hành xác định hàm lượng axit amin.

Đối tượng mẫu: gồm 4 loại thực phẩm

1. Đậu tương (đậu nành)
2. Các sản phẩm chế biến từ đậu tương: đậu phụ, sữa đậu nành
3. Cá nước ngọt (trắm, trôi, cá quả, rô phi, chép);
4. Cá nước mặn (thu, nục, cá chim trắng, cá hồng, cá cam)

Cỡ mẫu

Cỡ mẫu được tính toán theo công thức sau [38]

$$N \geq (t_{\alpha, n-1})^2 SD^2 / (A \times \mu)^2; \text{ trong đó:}$$

N là cỡ mẫu (số lượng mẫu);

A là độ chính xác của kết quả phân tích (có giá trị 0,1 hoặc 0,05);

μ là giá trị trung bình (kết quả phân tích) của quần thể, thu được từ các nghiên cứu trước đây;

SD độ lệch chuẩn của giá trị trung bình;

t là giá trị thu được từ bảng thống kê chuẩn (bảng Student), với α là giới hạn tin cậy (95% hoặc 99%).

Như vậy, để có số liệu đảm bảo độ chính xác 0,1 thì cần lấy 17 mẫu phân tích axit amin. Trong khuôn khổ của đề tài này chúng tôi chọn cỡ mẫu phân tích tối thiểu là $n = 17$, với độ chính xác là 0,1.

Thu thập mẫu

* Thu thập mẫu đậu, đỗ, thịt

Mẫu được thu thập bằng cách bốc thăm ngẫu nhiên từ các chợ đại diện cho 9 quận nội thành Hà Nội, gồm Chợ Thái Hà, chợ Hôm, chợ Mơ, chợ Trương Định, chợ Hàng Da, chợ Ngã Tư Sở, chợ Thành Công, chợ Lê Quý Đôn và chợ Ngô Sĩ Liên.

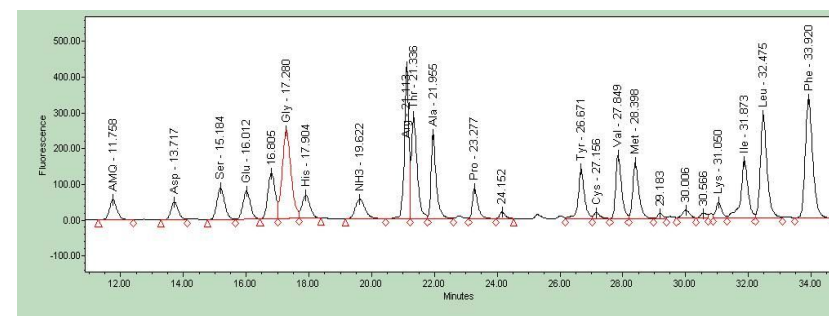
* Thu thập mẫu cá

Mẫu nghiên cứu gồm 10 loại cá đại diện cho 50 mẫu cá: 5 loại cá nước ngọt (trắm, trôi, cá quả, rô phi, chép); 5 loại cá nước mặn (thu, nục, cá chim trắng, cá hồng, cá cam). Mẫu được lấy ngẫu nhiên bằng cách mua tại 5 chợ lớn tại Hà Nội, mỗi mẫu mua ít nhất 3 con, đưa về phòng thí nghiệm trong thời gian không quá hai giờ. Ở phòng thí nghiệm mẫu được phân loại, lọc lấy phần ăn được (loại bỏ phủ tạng, vây, vây, xương), sau đó mẫu được xay nhuyễn, làm đồng nhất và tiến hành thủy phân ngay trong ngày lấy mẫu; phần mẫu lưu cho vào hộp sạch bảo quản trong tủ lạnh âm sâu - 20°C.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.7.1. Kết quả phân tích mẫu cá (phân tích mẫu theo lược đồ quy trình 2 tại mục 3.5)

Mẫu nghiên cứu gồm 10 loại cá đại diện cho 50 mẫu cá: 5 loại cá nước ngọt (trắm, trôi, cá quả, rô phi, chép); 5 loại cá nước mặn (thu, nục, cá chim trắng, cá hồng, cá cam).



Hình 3.32: Sắc đồ tách axit amin trong dịch thủy phân mẫu cá quả, cột RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 μ m), tốc độ dòng 1ml/phút, detector huỳnh quang ($\lambda_{ex} = 250$; $\lambda_{em} = 395$)

Trong cá nước ngọt hàm lượng tổng axit amin từ 6,12 - 19,52 g/100g, cá rô phi có hàm lượng tổng các axit amin cao nhất (19,52 g/100g), thấp nhất là cá trắm 6,12 g/100g.

Hàm lượng tổng các axit amin trong cá nước mặn nằm trong khoảng 13 - 21g/100g, không có loại axit amin nào không xác định thấy. Cá nục cho hàm lượng axit amin cao nhất 20,74 g/100g; cá thu 18,20 g/100g, thấp nhất là cá chim trắng 13,94 g/100g. Nhìn chung hàm lượng axit amin trong cá nước mặn cao hơn trong cá nước ngọt.

$$RSD_x = S_x \times 100/x_{tb}$$

* **Độ lệch chuẩn về thời gian lưu được tính theo công thức sau:**

$$S_t = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (t_i - t_{tb})^2}{(n - 1)}}$$

Độ lệch chuẩn tương đối về thời gian lưu được tính theo công thức sau:

$$RSD_t = S_t \times 100/t_{tb}$$

Độ lặp lại về hàm lượng axit amin và thời gian lưu (đối với tất cả các đối tượng mẫu) có độ lệch chuẩn tương đối giao động là chấp nhận được, vì đều nhỏ hơn ngưỡng cho phép 10%.

3.6.3. Xác định hiệu suất thu hồi của phương pháp

Từ dung dịch chuẩn làm việc, chuẩn bị 3 hỗn hợp dung dịch chuẩn có nồng độ là như tại mục 3.6.1 trên:

Các kết quả về hiệu suất thu hồi của cả 3 vùng nồng độ đều trên 90% trong khoảng tuyến tính và độ thu hồi càng cao khi thêm nồng độ chuẩn cao. Do đó có thể kết luận, phương pháp cho phép xác định hàm lượng các axit amin có độ thu hồi trong khoảng 89 - 98%. Độ thu hồi này đều tốt hơn so với độ thu hồi cho phép (85%) khi xác định các chất có hàm lượng từ 10 - 1000 ppb.

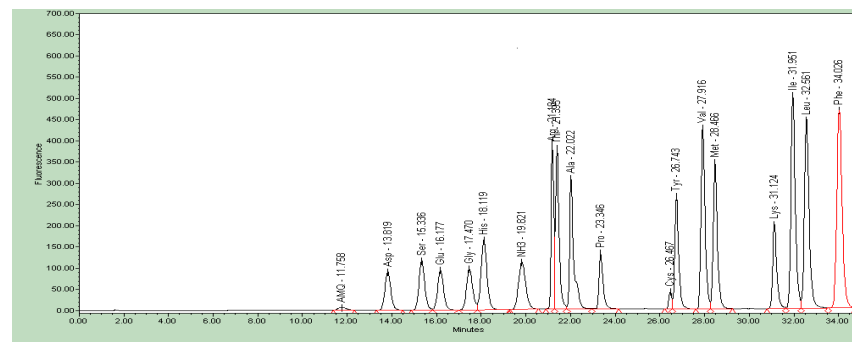
3.7. Phân tích mẫu thực tế

Sau khi tìm được các điều kiện tối ưu cho quá trình xử lý mẫu phân tích axit amin trong thực phẩm với các đối tượng mẫu khác nhau. Đánh giá thống kê quy trình phân tích axit amin đều đạt được trong giới hạn cho phép, tiến hành phân tích mẫu thực tế, gồm 50 mẫu cá, 51 mẫu đậu tương và đậu phụ, 12 mẫu thịt các loại cụ thể kết quả như sau.

Trên cơ sở lý thuyết của kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, theo tính chất của chất phân tích và trên cơ sở điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi tập trung nghiên cứu khảo sát thông số máy, những ảnh hưởng của pha tĩnh và pha động đến quá trình tách và phân tích, chọn phương pháp chiết mẫu,... để phát hiện và tối ưu hóa các điều kiện nhằm mục đích xây dựng quy trình tách và xác định đồng thời 17 axit amin trong thực phẩm.

3.1. Khảo sát chọn loại chất dẫn xuất cho axit amin

Theo một số tác giả và kết quả khảo sát về hai dẫn xuất OPA và AQC cho thấy: OPA có khả năng dẫn xuất được 15 axit amin, không dẫn xuất được các axit amin bậc 2. Axit amin sau khi dẫn xuất bằng OPA chỉ ổn định trong vòng 20 phút, vì vậy phản ứng dẫn xuất này thuận tiện cho những hệ thống HPLC có bộ phản ứng sau cột.



Hình 3.2. Sắc đồ tách axit amin bằng dẫn xuất AQC trước cột, cột RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 μ m), tốc độ dòng 1ml/phút, detector huỳnh quang (λ_{ex} = 250; λ_{em} = 395)

Dẫn xuất AQC có khả năng dẫn xuất cả axit amin bậc 1 và axit amin bậc 2 (cystin, prolin) thành sản phẩm phát huỳnh quang mạnh ở bước sóng 395 nm với độ ổn định cao (mẫu sau khi dẫn xuất ổn định trong vòng 1 tuần nếu bảo quản ở 4°C) nên có thể tách được 17 axit

amin (xem hình 3.2).

Trong quá trình dẫn xuất AQC có phản ứng phụ khi dư, nó tác dụng với nước tạo hợp chất AMQ phát quang yếu ở bước sóng 395nm (đây là điểm để xác định phản ứng đã xảy ra hoàn toàn). Ngoài ra phản ứng dẫn xuất còn có sản phẩm là N-hydroxysuccinimid (NHS) và CO₂, nhưng cả 2 chất này đều không ảnh hưởng đến quá trình phân tích, vì nó không phát huỳnh quang.

Vì vậy trong nghiên cứu này chúng tôi chọn AQC để làm chất dẫn xuất các axit amin trong thực phẩm.

3.2. Tối ưu hóa các điều kiện xác định axit amin bằng HPLC

3.2.1. Khảo sát chọn Detector

Detector là một trong những bộ phận quan trọng của hệ HPLC để phát hiện và định lượng chất.

Các axit amin không có tính chất phát quang, nhưng khi được kết hợp với chất dẫn xuất AQC sẽ tạo ra các sản phẩm phát quang khi bị kích thích ($\lambda_{ex} = 250\text{nm}$; $\lambda_{em} = 395\text{nm}$) với độ nhạy và độ chọn lọc cao. Với các axit amin, có thể phát hiện bằng detector mảng diot (PDA) và huỳnh quang. Vì thế, để khẳng định loại nào phù hợp và tốt chúng tôi đã làm thực nghiệm với cả 2 loại detector này.

Từ 2 sắc đồ nhận được bằng 2 detector mảng diot (PDA) và huỳnh quang cho thấy, tín hiệu pic sắc ký phát hiện bằng detector huỳnh quang có độ nhạy tốt hơn, pic sắc ký nét và cân đối hơn nên trong phân tích các axit amin để có được hiệu quả tốt, chúng tôi đã sử dụng detector huỳnh quang với bước sóng kích thích $\lambda_{ex} = 250\text{nm}$; và bước sóng phát quang $\lambda_{em} = 395\text{nm}$ trong suốt quá trình tách và xác định axit amin.

3.2.2. Chọn pha tĩnh và cột tách

3.6. Đánh giá thống kê phương pháp

3.6.1. Độ chính xác của phép đo

Từ dung dịch chuẩn làm việc, chuẩn bị 3 hỗn hợp dung dịch chuẩn có nồng độ là:

- **Nồng độ thứ 1:** hút 10 μl dung dịch chuẩn làm việc, pha loãng với nước cất tinh khiết để được chính xác 1 ml, dung dịch này có chứa 1000 pmol/ml đối với 16 axit amin và 500 pmol/ml đối với cystin.
- **Nồng độ thứ 2:** hút 50 μl dung dịch chuẩn làm việc, pha loãng với nước cất tinh khiết để được dung dịch chính xác 1ml, dung dịch này có chứa 5000 pmol/ml đối với 16 axit amin và 2500 pmol/ml đối với cystin.
- **Nồng độ thứ 3:** hút 100 μl dung dịch chuẩn làm việc, pha loãng với nước cất tinh khiết để được dung dịch chính xác 1ml, dung dịch này có chứa 10000 pmol/ml đối với 16 axit amin và 5000 pmol/ml đối với cystin.

Tiến hành chạy sắc ký trong các điều kiện như lược đồ quy trình phân tích 1. Mỗi mẫu chạy 5 lần lặp lại. Tại mọi điểm trên đường chuẩn, sai số của phép đo đều nằm trong giới hạn cho phép. Ở cận dưới của đường chuẩn mắc phải sai số lớn nhất, nhưng tất cả đều nhỏ hơn 10% (cho phép 15%).

3.6.2. Độ lặp lại của phương pháp

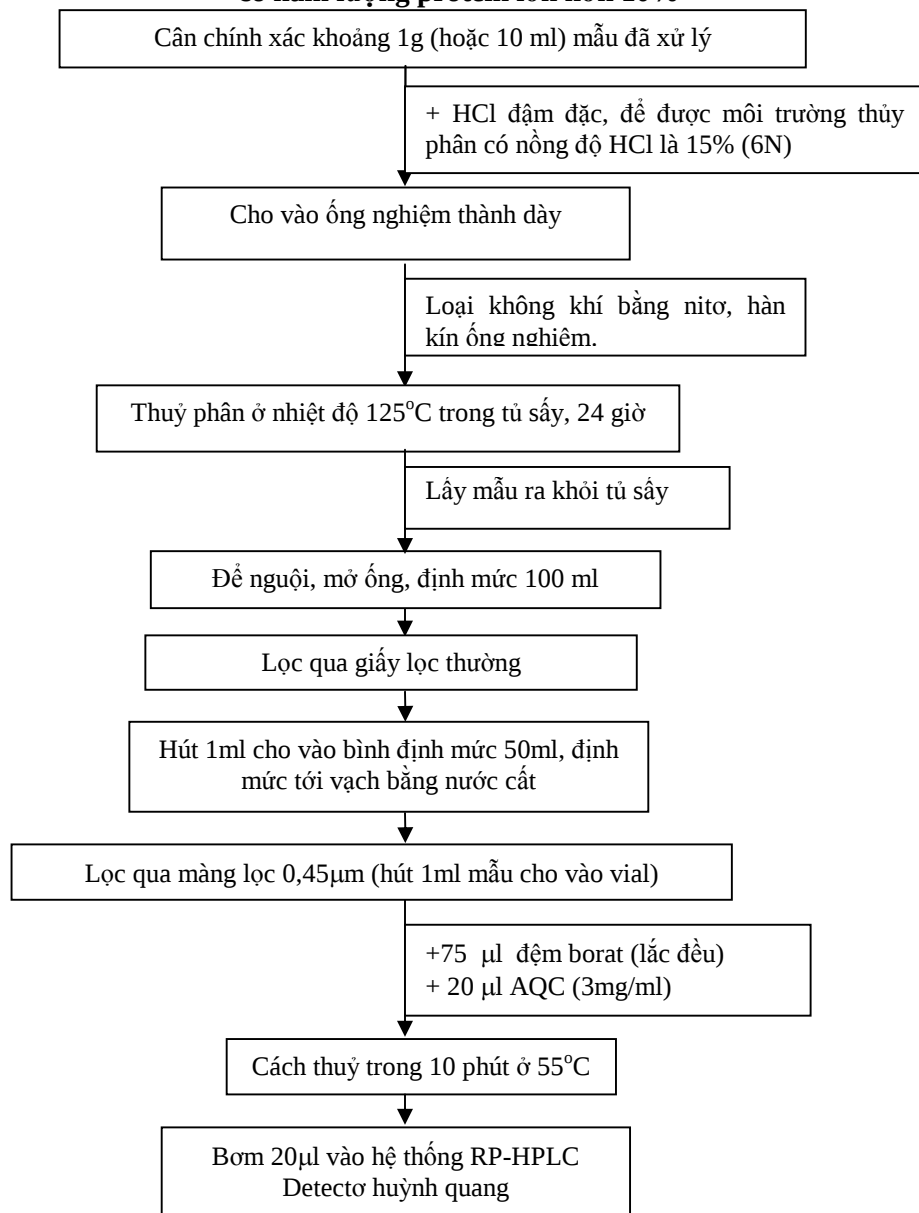
* **Độ lệch chuẩn về hàm lượng được tính theo công thức sau:**

$$S_x = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{tb})^2}{(n - 1)}}$$

Độ lệch chuẩn tương đối về hàm lượng được tính theo công thức sau:

LƯỢC ĐỒ QUY TRÌNH PHÂN TÍCH 2

Quy trình tách và xác định các axit amin trong mẫu thực phẩm có hàm lượng protein lớn hơn 10%

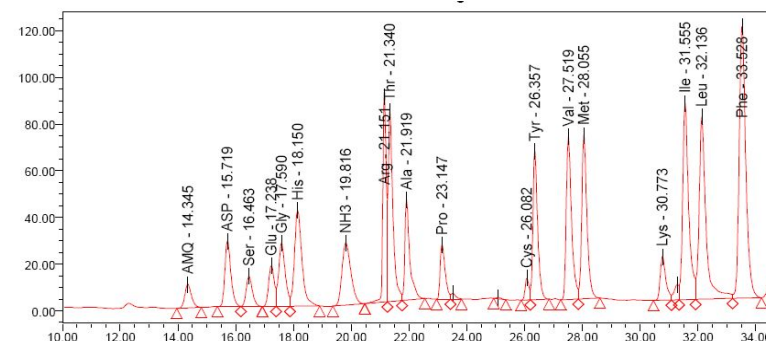


3.2.2.1. Chọn loại pha tĩnh

Đối tượng phân tích của chúng tôi là các axit amin có gốc cơ bản là như nhau và nhóm thế khác nhau nhưng do trong phân tử đều có gốc – COOH và NH₂ nên tất cả các axit amin đều là chất phân cực. Vì vậy để tách được các axit amin chúng tôi chọn pha tĩnh là pha ngược, loại RP18 cho nghiên cứu này.

3.2.2.2. Chọn cột và kích thước hạt pha tĩnh

Để tách được các axit amin với tính chất hóa học rất giống nhau thì cột tách phải có số đĩa lý thuyết lớn (N>9000) mới có khả năng tách được nên chúng tôi chọn cột là Symmetry axit amin RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 µm) để tìm các điều kiện khác tối ưu hóa việc tách axit amin. Cùng với điều kiện chạy máy và chất dẫn xuất AQC, sắc đồ hỗn hợp chuẩn 17 axit amin được chỉ ra hình 3.6.



Hình 3.6: Sắc đồ hỗn hợp chuẩn 17 axit amin ở nồng độ 10 mM, cột RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9µm), tốc độ dòng 1ml/phút, detector huỳnh quang ($\lambda_{ex}=250$; $\lambda_{em}=395$)

3.2.3. Nghiên cứu chọn hệ dung môi pha động

Các dung môi acetolnitril, đệm, nước là những dung môi hay được sử dụng như là dung môi cơ bản trong pha động của hệ pha ngược, vì thế trong nghiên cứu của chúng tôi các dung môi này cũng

được sử dụng để khảo sát. Dưới đây là kết quả nghiên cứu một số hệ pha động và yếu tố ảnh hưởng của thành phần pha động đến quá trình tách các axit amin.

3.2.3.1. Khảo sát sơ bộ chọn hệ pha động cho sự tách của axit amin

Bảng 3.2. Thành phần và tỷ lệ pha động chạy theo chế độ gradient

Thời gian (Phút)	Tốc độ dòng (MP) (ml/phút)	% Đệm phosphat-acetat	% Acetonitril	% H ₂ O
Nền	1,0	100	0	0
0,5	1,0	99	1	0
18,0	1,0	95	5	0
19,0	1,0	91	9	0
29,5	1,0	83	17	0
33,0	1,0	0	60	40
36,0	1,0	100	0	0
40,0	1,0	0	60	40

3.2.3.2. Ảnh hưởng của triethylamin trong pha động

Lựa chọn triethylamin thêm vào pha động với nồng độ 17mM để tách 17 axit amin trong thực phẩm.

3.2.3.3. Khảo sát tốc độ pha động

Bắt đầu với tốc độ dòng từ 1,2 ml/phút; sau đó, giảm tốc độ dòng xuống 1 ml/phút; 0,8 ml/phút và 0,5 ml/phút. Khi tốc độ pha động quá lớn (1,2 ml/phút), các chất trong hỗn hợp mẫu chưa kịp tách ra khỏi nhau, dẫn đến hiện tượng chồng và chèn píc, nên không

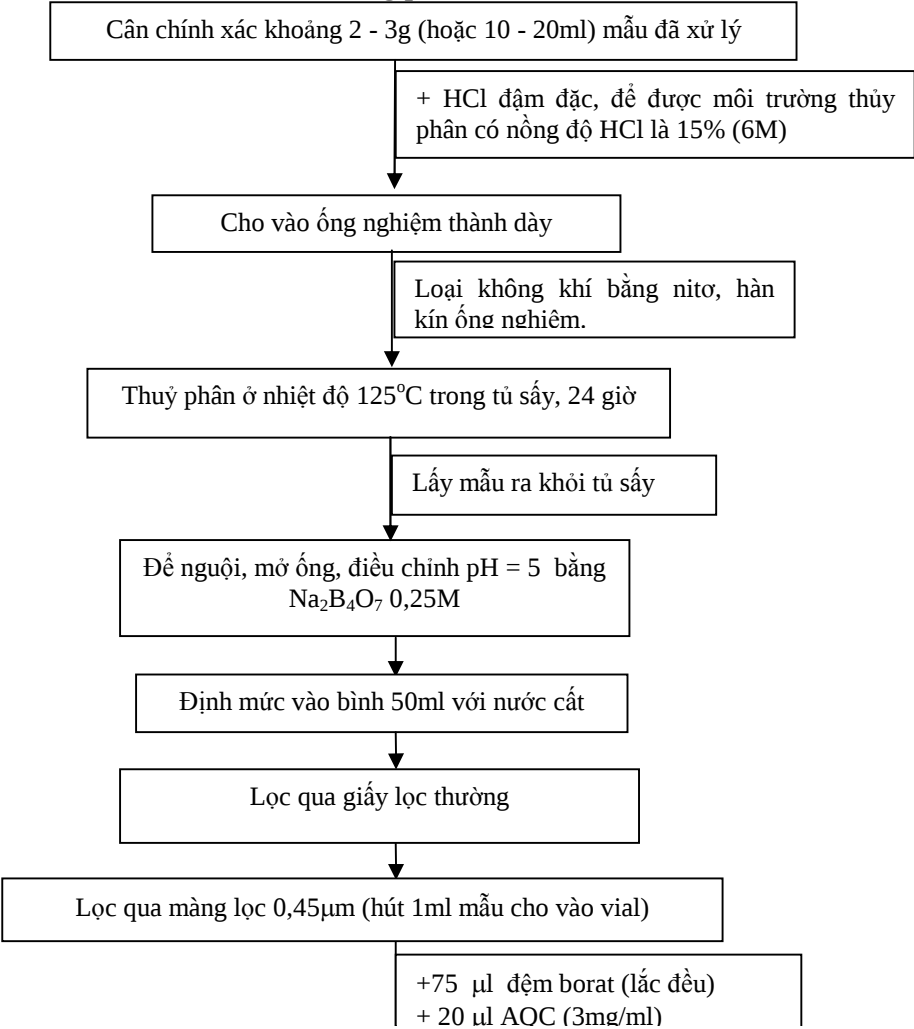
phút. Kết quả này phù hợp với kết quả của tác giả L. Bosch [58], sản phẩm dẫn xuất có thể ổn định trong vòng 1 tuần ở nhiệt độ phòng.

3.5. Lược đồ quy trình phân tích đối với các mẫu thực phẩm

Đã đề xuất đưa ra 2 lược đồ quy trình cho từng đối tượng:

LƯỢC ĐỒ QUY TRÌNH PHÂN TÍCH 1

Quy trình tách và xác định các axit amin trong mẫu thực phẩm có hàm lượng protein nhỏ hơn 10%



3.4.3. Khảo sát điều kiện làm giàu và chuyển mẫu về trung tính sau thủy phân

3.4.3.1. Khảo sát điều kiện làm giàu mẫu

a. Mẫu lỏng ít đậm nhưng lại nhiều đường:

b. Với mẫu rắn, khô, ít đậm (như mẫu rau):

3.4.3.2. Khảo sát điều kiện chuyển mẫu về trung tính sau thủy phân

Qua kết quả trên, đã lựa chọn $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,25M để điều chỉnh pH mẫu sau khi thủy phân, tạo pH phù hợp cho phản ứng dẫn xuất các axit amin bằng AQC.

3.4.4. Khảo sát quá trình tạo dẫn xuất huỳnh quang

Quá trình dẫn xuất có 2 yếu tố ảnh hưởng lớn đến kết quả phân tích cần được khảo sát đó là pH của môi trường trước khi dẫn xuất và nhiệt độ dẫn xuất:

3.4.4.1. Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng tạo dẫn xuất huỳnh quang đến hiệu suất thu hồi

Mẫu sau khi thủy phân được điều chỉnh về pH = 5 bằng $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,25M, sau đó lấy 0,5 - 1ml thêm 75 μl đệm borat rồi mới tiến hành dẫn xuất. Kết quả này cũng phù hợp với tác giả L. Bosch [58] đã chọn pH dẫn xuất là 8,2 - 9,7.

3.4.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng tạo dẫn xuất huỳnh quang đến hiệu suất thu hồi

Chúng tôi chọn nhiệt độ để dẫn xuất là 55°C. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của tác giả L. Bosch [58] nhiệt độ dẫn xuất tốt nhất là 55°C.

3.4.4.3. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng tạo dẫn xuất huỳnh quang đến hiệu suất thu hồi

Đã lựa chọn được thời gian thực hiện quá trình dẫn xuất là 10

tách được các axit amin. Tại tốc độ dòng 1ml/phút các pic sắc ký vừa đủ để tách ra khỏi nhau, thời gian 35 phút để tách được 17 axit amin. Còn nếu tiếp tục giảm tốc độ pha động (0,8 ml/phút và 0,5 ml/phút), thì các pic sắc ký ra muộn, gây doãng chân pic, nên các axit amin không tách được ra khỏi nhau gây hiện tượng chồng và chèn pic. Vì vậy tốc độ dòng pha động tối ưu trong nghiên cứu này là 1ml/phút.

Tổng hợp các điều kiện hệ thống RP-HPLC

Từ các kết quả đã nghiên cứu về chọn loại detector, bước sóng của detector, loại cột tách, thể tích bơm mẫu, nhiệt độ cột, nhiệt độ mẫu, tốc độ và thành phần pha động,... các điều kiện phù hợp nhất cho hệ thống RP-HPLC để tách và xác định 17 axit amin (xem bảng 3.4).

Bảng 3.4. Các điều kiện đo RP-HPLC cho xác định các axit amin

TT	Các thông số	Các điều kiện được chọn
1	Cột tách	RP18 (150mm x 4,6mm x 3,9 μm)
2	Kích thước hạt pha tĩnh	3,9 μm
3	Nhiệt độ cột	37°C
4	Tốc độ dòng pha động	1ml/phút
5	Thể tích bơm mẫu	20 μl
6	Nhiệt độ mẫu	30°C
7	Detector	Huỳnh quang
8	Bước sóng	$\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$
9	Thành phần pha động	A: đệm axetat - phosphat pH 5,05 B: axetonitril C: nước cất tinh khiết (tỷ lệ trong gradient theo bảng 3.2)

3.3. Đánh giá phương pháp phân tích

3.3.1. Giới hạn phát hiện LOD

LOD được xác định bằng nồng độ tối thiểu của chất phân tích tại đó cho các pic có tín hiệu bằng 3 lần nhiễu đường nền ($S/N = 3$) [7]. Đây là một thông số đặc trưng cho độ nhạy của phương pháp. Chất nào nhạy hơn sẽ có giới hạn phát hiện nhỏ (bảng 3.7).

3.3.2. Giới hạn định lượng LOQ

Giới hạn định lượng được định nghĩa là nồng độ nhỏ nhất của chất phân tích mà phép phân tích vẫn định lượng được chính xác với độ tin cậy 95%. Theo lý thuyết thống kê trong hóa phân tích thì LOQ là nồng độ chất phân tích mà cho tín hiệu gấp 10 lần tín hiệu đường nền ($S/N = 10$), tức là $LOQ = 3,3 LOD$ (bảng 3.7).

$$LOQ = LOD \times 3,3$$

Bảng 3.7: Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

TT	Axit amin	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
1	Axit aspartic	0,045	0,149
2	Serin	0,028	0,091
3	Axit glutamic	0,048	0,159
4	Glycin	0,024	0,079
5	Histidin	0,005	0,015
6	Arginin	0,014	0,046
7	Threonin	0,010	0,032
8	Alanin	0,009	0,029
9	Prolin	0,027	0,088
10	Cystin	0,045	0,149
11	Tyrosin	0,021	0,069

12	Valin	0,008	0,028
13	Methionin	0,013	0,044
14	Lysin	0,023	0,074
15	Isoleucin	0,008	0,026
16	Leucin	0,009	0,030
17	Phenylalanin	0,011	0,036

3.3.3. Xây dựng đường chuẩn

Để tiến hành xây dựng đường chuẩn của phương pháp phân tích, chúng tôi pha dãy chuẩn có nồng độ từ 1mM đến 10mM cho 16 axit amin và từ 0,5mM đến 5mM đối cystin, để tiến hành xác định khoảng tuyến tính của tất cả các 17 axit amin (bảng 3.8).

3.4. Tối ưu hóa các điều kiện thủy phân mẫu

Cụ thể phải tối ưu các vấn đề sau:

- Khảo sát chọn môi trường thủy phân
- Khảo sát chọn điều kiện thủy phân như: nhiệt độ, thời gian.

3.4.1. Khảo sát chọn môi trường thủy phân

Từ những kết quả thí nghiệm, đã chọn axit HCl làm môi trường thủy phân mẫu.

3.4.2. Khảo sát các điều kiện thủy phân mẫu bằng HCl

* Về nồng độ axit:

Từ kết quả này, chọn nồng độ axit HCl 6M làm môi trường thủy phân mẫu phân tích cho các nghiên cứu tiếp theo

* Khảo sát nhiệt độ thủy phân:

Từ những kết quả thực nghiệm, đã lựa chọn nhiệt độ 125°C để thủy phân mẫu thực phẩm.

* Khảo sát thời gian thủy phân mẫu:

Chúng tôi đã khảo sát và chọn thời gian 23 - 24 giờ để tiến hành thủy phân mẫu thực phẩm.