NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHUẨN BỊ MẪU DẦU HẠT CHỨA ACID BÉO CÓ NỐI ĐÔI LIÊN HỢP TRONG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HPLC

Vũ Thị Ngọc Ánh[1], Phan Thế Duy[2], Ngô Thị Tú Trinh[3], Nguyễn Văn Anh[2]*

[1]Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga - Chi nhánh phía Nam

[2]Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. HCM

[3]Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ Trẻ

*Email: *anhnv@hufi.edu.vn*

Ngày nhận bài: 10/6/2022; Ngày chấp nhận đăng: 21/10/2022

TÓM TẮT

Acid béo chứa nối đôi liên hợp đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quý như khả năng chống ung thư, giảm béo phì, tiểu đường và tăng cường hệ miễn dịch. Tuy nhiên nhóm hợp chất này rất nhạy cảm với các yếu tố bên ngoài (nhiệt độ, ánh sáng), dễ bị phân hủy trong quá trình tách, chiết và xử lý mẫu khi phân tích. Trong nghiên cứu này, quy trình chuẩn bị mẫu nhanh, hiệu quả phục vụ cho quá trình phân tích thành phần triacylglycerol chứa acid béo có nối đôi liên hợp có trong dầu hạt đã được nghiên cứu nhằm hạn chế sự biến đổi, phân hủy của nhóm hợp chất này. Quy trình chuẩn bị mẫu được đề xuất gồm 3 giai đoạn: xác định nhanh sự có mặt của acid béo có nôi đôi liên hợp có trong dầu hạt; chiết dầu hạt bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ thường; làm sạch dầu thu được bằng phương pháp chiết pha rắn sử dụng silicagel làm pha tĩnh. Kết quả đã chỉ ra rằng, các đặc trưng phổ hấp thụ phân tử của dầu hạt trong *n*-hexanee trong vùng bước sóng 220-400 nm có thể sử dụng để phát hiện nhanh sự có mặt của các gốc acid béo có nối đôi liên hợp trong dầu. Dầu hạt được chiết bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ thường với 3 dung môi có độ phân cực khác nhau: n-hexanee; dichloromethane; acetone; và được so sánh với phương pháp chiết Soxhlet truyền thống. Phương pháp chiết pha rắn sử dụng silicagel làm pha tĩnh được sử dụng để tinh chế dầu hạt trước khi tiến hành phân tích bằng phương pháp HPLC. Hoạt tính xúc tác của silicagel với các chất hấp phụ trong pha tĩnh của cột chiết pha rắn được kiểm soát và thảo luận.

Từ khóa: Chuẩn bị mẫu, chiết pha rắn, dầu hạt, triacylglycerol, acid béo chứa nối đôi liên hợp.

1. MỞ ĐẦU

Acid béo không bão hòa đa (Polyunsaturated Fatty Acid) (PUFA) là những hợp chất tiềm năng cho công nghiệp dược phẩm do chúng là những acid thiết yếu, tốt cho sức khỏe, nhưng cơ thể con người không có khả năng tự tổng hợp. Đặc biệt acid béo chứa nối đôi liên hợp (Conjugated Fatty acid (CFA)) đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quý: khả năng chống ung thư, béo phì, tiểu đường và tăng cường hệ miễn dịch [1-4]. Chính vì vậy, dầu hạt chứa các acid béo gốc acid béo không no với nối đôi liên hợp là nguồn nguyên liệu quan trọng trong công nghiệp dược phẩm. Tuy nhiên, các CFA và triacylglycerol (TG) chứa các gốc CFA rất dễ bị biến đổi bởi nhiệt, dễ bị phân hủy trong quá trình tách, chiết và xử lý mẫu khi phân tích [5]. Do đó, khi phân tích các hợp chất này, quá trình xử lý và chuyển hóa mẫu cần được nghiên cứu rất cẩn thận để tránh bị phân hủy, từ đó dẫn đến kết quả phân tích kém chính xác.

Phân tích trực tiếp thành phần triacylglycerol trong dầu thực vật có vai trò rất quan trọng trong đánh giá chất lượng của dầu hạt do phương pháp này sở hữu nhiều ưu điểm như: cung cấp thông tin về thành phần của acid béo trong dầu, tránh được sự biến đổi của một số PUFAs (đặc biệt là các acid béo có nối đôi liên hợp) do không cần thiết phải xử lý mẫu để chuyển hóa TGs thành các methyl ester của acid béo (quá trình này thường đòi hỏi các tác nhân mạnh, dễ gây biến đổi thành phần các acid béo trong thành phần của triacylglycerol) [6]. Ngoài ra, phân tích phần triacylglycerol cung cấp thông tin về sự tổ hợp của các gốc acid béo trong mạch glixerol, đây là một đặc trưng quan trọng có thể được sử dụng trong phân tích tính thật giả của các mẫu chất béo [7, 8]. Phương pháp HPLC đã được chứng minh là phù hợp để có thể phân tích thành phần triacylglycerol trong dầu thực vật [9, 10].

Để tiến hành phân tích thành phần triacylglycerol có trong dầu thực vật, công đoạn chuẩn bị mẫu thường được tiến hành qua các giai đoạn. Đầu tiên, mẫu được tiến hành chiết phần chất béo trong hạt bằng phương pháp chiết khác nhau. Các phương pháp thường được sử dụng nhất để chiết thành phần các triacylglycerol từ hạt là ép dầu từ hạt (thường được tiến hành với những loại hạt có hàm lượng dầu cao) [11]; hoặc chiết bằng dung môi ở nhiệt độ cao sử dụng bộ chiết Soxhlet [12]. Ngoài ra, trong một số trường hợp đặc biệt, phương pháp ép lạnh hoặc chiết siêu tới hạn sử dụng dung môi CO_2 cũng đã được áp dụng thành công [13]. Trong quá trình chiết dầu từ hạt bằng các phương pháp ép hoặc chiết bằng dung môi thường thu được một hỗn hợp các chất phức tạp. Trong đó có những hợp chất có thể làm bẩn thành phần của dầu, gây cản trở trong quá trình phân tích các thành phần cơ bản trong dầu. Chính vì vậy, để thu được dầu tinh khiết cần phải tiến hành làm sạch dầu bằng những phương pháp khác nhau. Kĩ thuật chiết pha rắn là phương pháp nhanh và đơn giản để chuẩn bị mẫu cho quá trình phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [14]. Tuy nhiên, các nghiên cứu đề cập đến quá trình chiết pha rắn áp dụng cho việc tách lipid đều mô tả một cách sơ sài rất khó có thể lặp lại thành công nếu như các tác giả không đưa ra những thông tin tối thiểu, bao gồm việc chọn cột chiết pha rắn, điều kiện của các pha, thể tích và lượng mẫu đưa vào, dung môi rửa giải thích hợp. Sử dụng silicagel với vai trò là pha tĩnh trong chiết pha rắn để làm sạch mẫu dầu đã được đề cập đến trong các nghiên cứu trước đây [15]. Nếu sử dụng pha rắn là silicagel thì các triacylglycerol chứa ba nhóm ester có thể được tách ra khỏi các hợp chất phân cực hơn như di- hoặc monoacylglycerol, acid tự do và phospholipid [16]. Tuy nhiên, theo các nghiên cứu khảo sát của chúng tôi, một số hợp chất không no với nối đôi liên hợp (như carotenoid) khi sử dụng silicagel làm pha tĩnh thì chúng bị phân hủy rất nhanh. Vì vậy, khi sử dụng silicagel với vai trò chất hấp phụ cần phải kiểm soát hoạt tính của chúng với các chất mà nó hấp phụ.

Mục đích của bài báo này là nghiên cứu để đưa ra một quy trình chuẩn bị mẫu nhanh, hiệu quả phục vụ cho quá trình phân tích thành phần triacylglycerol có trong dầu hạt, hạn chế sự biến đổi phân hủy của các acid béo có nối đôi liên hợp. Quả gấc (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) là một loại thực phẩm được dùng trong nhiều món ăn truyền thống ở Việt Nam cũng như một số nước trong khu vực Đông Nam Á. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, hàm lượng β-carotenoid trong cơm gấc rất cao (gấp hơn 70 lần trong cà chua) [17], và phần cơm gấc đang được sử dụng trực tiếp cho thực phẩm hoặc dưới dạng dầu cơm gấc. Ở nước ta, hạt gấc hiện nay hầu như vẫn chưa được sử dụng và coi như phụ phẩm nông nghiệp, mặc dù đã trong y học cổ truyền hạt gấc được sử dụng như nguyên liệu chính của một số các bài thuốc. Trong nghiên cứu này, dầu hạt gấc được chọn làm đối tượng nghiên cứu do trong một nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng dầu hạt gấc không chứa acid béo với nối đôi liên hợp [17]. Mặc dù những công bố trước đó đều cho thấy trong dầu hạt mướp đắng (một loài cùng chi *momordica* với gấc) chứa hàm lượng lớn α-eleostearic acid [18]. Vì vậy, trong bài báo này nhóm tác giả tập trung đến việc chuẩn bị mẫu trước khi phân tích triacylglycerol bằng phương pháp HPLC: chiết và làm sạch dầu để hạn chế sự biến đổi chất phân tích trong quá trình nghiên cứu.

2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Hạt gấc (*Momordica cochinchinesis*) được thu hái trên địa phân tỉnh bến tre vào năm 2021. *n*-hexanee, dichloromethane, (tinh khiết hóa học), Isopropanol, acetonitrile (Sigma- Mĩ), các hóa chất còn lại sử dụng đều thuộc loại tinh khiết hóa học.

Cột chiết pha rắn DIAPAK C (BioChemMac CT, Moscow), được nhồi bằng silicagel (0,52g silicagel/cột). Silicagel thương mại KCMG: dạng hạt với khoang rỗng nhỏ, silicagel KCKG: dạng hạt với khoang rỗng lớn (tinh khiết hóa học).

Hệ thống sắc ký điều chế Shimadzu LC20, cột điều chế 250×10 mm, SUPELCOSIL^{TM}C-18, đầu dò điot quang.

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Agilent 1200 Infinity với đầu dò PDA, kết nối với khối phổ, cột tách 250×4 mm, Kromasil 100-5C18. Máy đo quang phổ UV-VIS, Shimadzu UV 2401.

2.2. Thực nghiệm

Hạt gấc được thu gom và sấy khô ở nhiệt độ 40 ^{o}C trong tủ sấy, sau đó bóc bỏ vỏ cứng bên ngoài, phần nhân bên trong được nghiền nhỏ và rây (sử dụng bộ rây sàng đường kính 0,5 mm). Bột nhân hạt gấc được trộn đều và sử dụng cho quá trình chiết.

Để tránh sự phân hủy của các hợp chất liên hợp kém bền, dầu hạt gấc được chiết bằng *n*-hexane bằng cối sứ ở nhiệt độ phòng khi nghiền hạt gấc với dung môi. Sau đó lọc bỏ cặn và đuổi hết dung môi bằng máy chưng cất chân không thu được dầu dạng thô.

Quá trình chiết pha rắn được sử dụng với cột chiết pha rắn DIAPAK C (BioChemMac CT, Moscow). Trước mỗi quá trình chiết, hoạt hóa cột bằng 6 mL *n*-hexane, sau đó dẫn 20 mL dung dịch dầu (hòa tan trong n-hexane) nồng độ 10 mg/mL qua cột chiết pha rắn theo từng lượng thể tích 1 mL. Xác định hàm lượng của dầu hấp phụ trên cột chiết pha rắn theo từng lượng thể tích bằng phương pháp quang phổ UV ở bước sóng 270nm. Tổng khối lượng dầu hấp phụ trên cột được tính bằng tổng khối lượng dầu hấp phụ theo từng lượng thể tích chảy qua và được xác định lại bằng phương pháp cân khối lượng để đối chiếu. Rửa giải dầu bằng dung môi dichloromethane theo từng phần thể tích 1 mL. Dầu thu được khi làm bay hơi dung môi sử dụng máy cất quay chân không và được giữ lạnh đến khi đem đi phân tích.

Để đánh giá quá trình lưu giữ dầu trong trạng thái bị hấp phụ trên silicagel, đầu tiên từ dầu sau khi đã làm sạch tiến hành tách riêng thành phần chính di-α-eleostearat-stearat (αE_2S) bằng hệ thống sắc ký điều chế Shimadzu LC20 sử dụng pha động 50% isopropanol và 50% acetonitrile với đầu dò diode quang ở bước sóng 270 nm. Từ thành phần thu được chuẩn bị dung dịch α-E_2S trong n-hexane (3 mg/mL). Lấy 1 mL dung dịch chuẩn bị cho vào trong chai đựng mẫu vials thêm vào 0,2 g pha rắn (silicagel) với ba nhãn hiệu khác nhau (silicagel KCMG: dạng hạt với khoang rỗng nhỏ, silicagel KCKG: dạng hạt với khoang rỗng lớn, silicagel trong cột chiết pha rắn DIAPAK C), đậy nắp, giữ ở nhiệt độ phòng và để tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng. Sau những khoảng thời gian nghiên cứu, gạn bỏ phần dung môi ra khỏi pha tĩnh, giải hấp bằng acetone, sau đó loại bỏ acetone và hòa tan mẫu bằng pha động để tiến hành chạy sắc ký HPLC.

Xác định thành phần triacylglycerol của dầu hạt gấc bằng phương pháp sắc ký hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) sử dụng dầu hạt mướp đắng làm dầu chuẩn. Mẫu được phân tích bằng hệ thống HPLC Agilent 1200 Infinity với đầu dò PDA và đầu dò khối phổ, cột tách 250×4.0 mm, Kromasil 100-5C18, dung môi 40% isopropanol và 60% acetonitrile, nhiệt độ cột 30 ^{o}C, thể tích tiêm mẫu 20 µl, nồng độ dầu 1mg/mL, bước sóng 270 nm. Đầu dò khối phổ được chạy trong điều kiện hỗn hợp: ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển và ion hóa trong điều kiện phun

mù electron với chế độ làm việc chuẩn trong điện thế 150V, tín hiệu đo với các ion dương. Tất cả các phép chạy mẫu HPLC đều sử dụng chế độ đẳng dòng. Sắc ký đồ được ghi, lưu trữ và tính toán sử dụng phần mềm ChemStation.

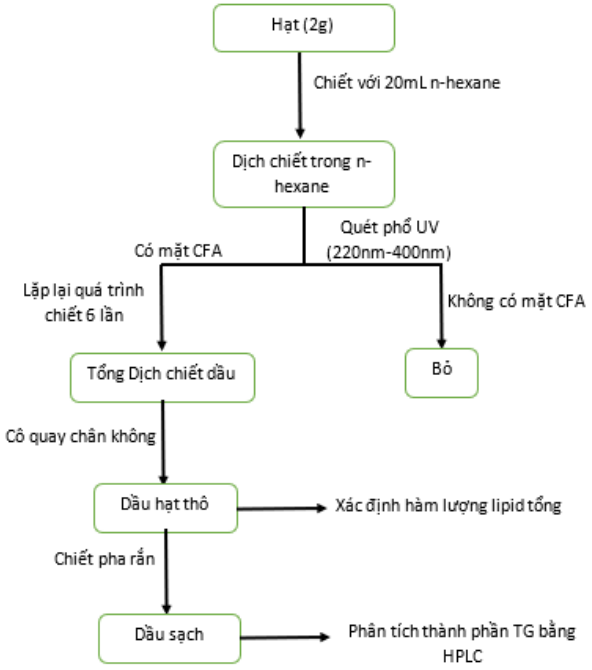
Quy trình chuẩn bị mẫu cho quá trình phân tích dầu hạt chứa acid béo có nối đôi liên hợp bằng phương pháp HPLC được đề xuất gồm 3 giai đoạn chính

- Giai đoạn 1: Xác định nhanh sự có mặt của acid béo có nối đôi liên hợp có trong dầu hạt

- Giai đoạn 2: Chiết dầu hạt bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ thường

- Giai đoạn 3: Làm sạch dầu thu được bằng phương pháp chiết pha rắn sử dụng silicagel làm pha tĩnh, có chú ý đến hoạt tính xúc tác của silicagel lên các chất phân tích

Quy trình tổng quát được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Quy trình chuẩn bị mẫu cho quá trình phân tích dầu hạt chứa acid béo có nối đôi liên hợp bằng phương pháp HPLC

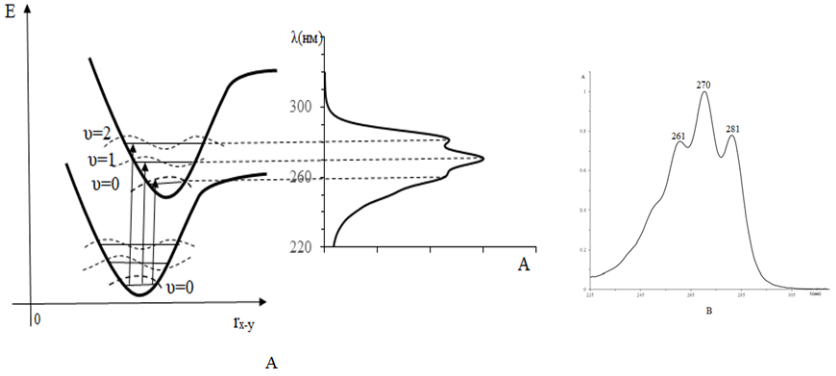
Triacylglycerol được ký hiệu hóa bằng hệ thống chữ cái đại diện cho 3 gốc acid béo của nó (không có sự khác nhau giữa về vị trí giữa các gốc trong phân tử). Ký hiệu αE và βE biểu thị cho gốc C18:3^{9Z11E13E} ((9*Z*,11*E*,13*E*)-octadeca-9,11,13-trienoic) và C18:3^{9E11E13E} ((9*E*,11*E*,13*E*)-octadeca-9,11,13-trienoic), tương tự: L-linoneic (C18:2^{9Z12Z}), O - oleic (C18:2^{9Z}), P - pamitinoic (C16:0) и S- stearic (C18:0). Ví dụ công thức αE_2S là ký hiệu của triacylglycerol chứa 2 gốc α-eleostearic và 1 gốc stearic.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định nhanh sự có mặt của acid béo có nôi đôi liên hợp có trong dầu hạt

Một trong những điểm khác đặc biệt của các hợp chất chứa nối đôi liên hợp so với các hợp chất không no thông thường nằm ở cấu trúc phổ dao động electron của chúng [19], với vùng hấp thụ tương ứng ở bước chuyển electron từ trạng thái dao động cơ bản của các electron ở trạng thái cơ bản theo " hướng dọc" (tức là sự trễ của sự thay đổi cấu hình hạt nhân trong sự

thay đổi của trạng thái electron) của các bước chuyển cùng lúc lên nhiều trạng thái dao động khác nhau của trạng thái kích thích electron đầu tiên (Hình 2).



A

Hình 2. Sơ đồ bước chuyển năng lượng của dao động electron (A)
và phổ hấp thụ phân tử của hợp chất chứa ba nối đôi liên hợp (B)

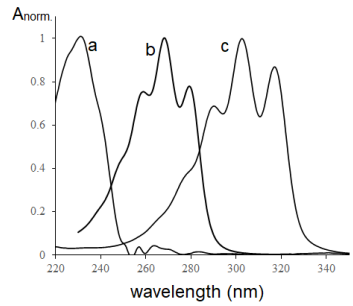
Kết quả chỉ ra rằng, phổ hấp thụ electron của các gốc chứa nối đôi liên hợp hấp thụ mạnh trong vùng 240-290 nm với số lượng các đỉnh hấp thụ phụ thuộc vào số lượng nối đôi liên hợp trong hệ và cấu hình cis-trans của các nối đôi C=C trong hệ liên hợp.

Từ những nghiên cứu trước đây của chúng tôi [9, 10] đã chỉ ra rằng, tất cả các loại dầu có acid octadecatrienoic liên hợp đều có phổ dao động điện tử với ba đỉnh phổ rõ ràng. Bước sóng cực đại của các đỉnh phổ phụ thuộc vào loại cấu hình cis-trans của các liên kết C=C trong hệ liên hợp cũng như thay đổi không nhiều trong các dung môi khác nhau. Sự thay thế cấu hình trans- trong hệ liên hợp bằng cấu hình cis gây ra sự dịch chuyển đỏ (bathochromic) trong phổ hấp thụ phân tử [9]. Ngoài ra, có sự phụ thuộc gần đúng giữa bước sóng của cực đại hấp thụ và chiều dài của chuỗi liên hợp. Sự liên hợp gây ra sự thay đổi sắc độ của dải hấp thụ, tỷ lệ với số liên kết đôi của hệ thống liên hợp trong nhóm mang màu của phân tử. Trong nghiên cứu này, phổ hấp thụ của triacylglycerol chứa gốc axit béo có nối đôi liên hợp với độ dài mạch liên hợp khác nhau đã được đo trong dung môi pha động (isopropanol: acetonitrile; 30:70 v/v). Phổ hấp thụ phân tử của 9-hydroxy-10E,12E-octadecadienoic acid (a), 9E,11E,13E-octadecatrienoic acid (b) và acid và 9E,11E,13E,15E-octadecatetraennoic acid (c) được trình bày trong Hình 3. Giữa bình phương của bước sóng cực đại hấp thụ và số liên kết đôi trong một hệ thống liên hợp cho một cấu hình tương tự của các liên kết C = C này có sự phụ thuộc [20]:

$$\lambda_{max}^2 = A + B \times n$$

với n là số liên kết đôi liên hợp trong nhóm mang màu của phân tử

A, B là các hệ số của phương trình hồi quy



Hình 3. Phổ hấp thụ phân tử của các gốc acid béo chứa nôi đôi liên hợp (a) gốc acid chứa 2 nối đôi C=C liên hợp; (b) gốc acid chứa 3 nối đôi C=C liên hợp; (c) gốc acid chứa 4 nối đôi C=C liên hợp

Chính vì vậy, đặc điểm đặc trưng này của phổ hấp thụ phân tử có thể được sử dụng để xác định nhanh chóng sự có mặt của các gốc chứa nối đôi C=C liên hợp trong dầu hạt. Để phục vụ cho mục đích này, khoảng 2 g nhân hạt được nghiền nhỏ và khuấy trộn với n-hexane trong vòng 5 phút, sau đó dịch chiết được lọc qua giấy lọc và tiến hành đo phổ UV trong khoảng bước sóng từ 220 nm - 400nm để phát hiện sự có mặt của các acid béo chứa nối đôi liên hợp trong dầu hạt. Khi xuất hiện vùng phổ hấp thụ trong vùng bước sóng trên với các hình dạng phổ đặc trưng có thể bước đầu kết luận về sự có mặt của các gốc chứa acid béo có nối đôi liên hợp trong thành phần triacylglycerol.

3.2. Chiết dầu hạt bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ thường

Phương pháp chiết dung môi được sử dụng rộng rãi trong phòng thí nghiệm để chiết các chất có hoạt tính sinh học trong các nguyên liệu. Trong đó, hàm lượng lipid tổng từ nguyên liệu hạt thường được xác định bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ cao sử dụng bộ chiết Soxhlet. Tuy nhiên, phương pháp này, dầu hạt tiếp xúc với dung môi ở nhiệt độ cao, trong thời gian dài (8-10 giờ) nên dễ bị biến đổi, oxi hóa trong quá trình chiết, đặc biệt với dầu có hàm lượng acid béo không bão hòa đa cao, chứa acid béo có nối đôi liên hợp. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành chiết dầu bằng dung môi ở nhiệt độ thường, sử dụng chày và cối sứ để chiết dầu hạt. Nghiên cứu tiến hành với 3 dung môi với độ phân cực tăng dần n-hexane (P=0,1), dichloromethane (P=3,1), và acetone (P=5,1) (P- giá trị đánh giá độ phân cực của dung môi theo Claidrom [21]) để chiết dầu từ hạt gấc. Kết quả chỉ ra rằng, với thể tích dung môi sử dụng được là như nhau, sự khác nhau về tổng phần trăm chiết chỉ xảy ra với 3 lần chiết đầu tiên. Trong ba lần chiết đầu tiên độ phân cực của dung môi càng tăng thì lượng dầu chiết cũng tăng theo. Điều này cũng không có gì mâu thuẫn với nguyên tắc chiết đã trình bày ở trên. Trong những lần đầu tiên khuấy trộn của hạt (đã được nghiền nhỏ) với dung môi thì các dung môi phân cực dễ dàng thẩm thấu và phá vỡ các tế bào dầu (oil body) trong hạt. Tuy nhiên sau một vài lần chiết khi lớp vỏ của các tế bào dầu đã bị phá vỡ thì việc sử dụng các dung môi phân cực chỉ làm tăng hàm lượng các tạp chất không cần thiết (các acid tự do, phospholipid…). Tổng thành phần chính (các triacylglycerol) đều gần như được chiết hoàn toàn sau 6 lần chiết (98%). Để so sánh mức độ chiết của các dung môi chúng tôi tiến hành lấy những lượng bằng nhau của hạt gấc đã được chuẩn bị sẵn. Tiến hành chiết 6 lần bằng dung các dung môi ở trên và xác định một số đặc điểm dầu thu được. kết quả chỉ ra trong Bảng 1.

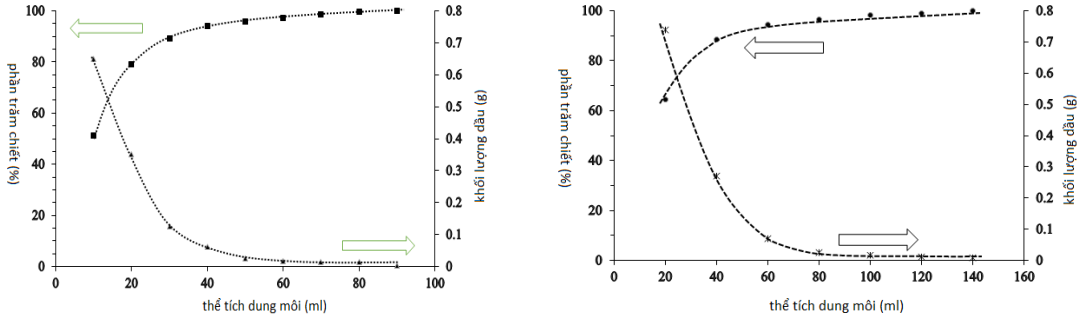
Bảng 1. Kết quả xác định 1 số đại lượng trong quá trình chiết dầu hạt gấc

Dung môi chiết	*n*-hexane	Dichloromethane	acetone
Hàm lượng dầu trong hạt (%)	42,33	42,68	42,70
Chỉ số khúc xạ của dầu thu được*	1,5035	1,5041	1,5045

* Chỉ số khúc xạ đo ở nhiệt độ t = 27^{o}C

Nhận thấy rằng cả 3 dung môi đều cho kết quả xác định hàm lượng dầu như nhau, chỉ số khúc xạ của dầu thu được không có sự khác nhau nhiều. Chứng tỏ rằng cả ba dung môi trên đều hoàn toàn phù hợp với việc chiết dầu từ hạt. Tuy nhiên xét về phương diện thuận tiện và bảo vệ môi trường thì n-hexane có ưu điểm hơn. Chính vì vậy chúng tôi chọn n-hexane làm dung môi chính để chiết trong các nghiên cứu sau này.

Sau đó chúng tôi tiến hành khảo sát sự phụ thuộc của thể tích dung môi của các lần chiết vào mức độ chiết dầu hạt. Tiến hành chiết dầu hạt gấc bằng *n*-hexane với 9 lần, thể tích dung môi mỗi lần thêm vào là 10 mL và 20 mL. Sau đó tiến hành xây dựng đồ thị phụ thuộc của lượng dầu thu được vào số lần chiết (Hình 4A và 4B) theo phương pháp đo quang.



Hình 4. Hiệu quả chiết dầu hạt gấc bằng dung môi hexane;
thể tích dung môi của mỗi lần chiết 10 mL (A) và 20mL (B)

Kết quả thu được trong hình 4A và 4B chỉ ra rằng trong trường hợp thể tích của dung môi ở mỗi lần chiết là 10 mL (tỷ lệ khối lượng nguyên liệu: dung môi là 1:5) thì chỉ với 6 lần chiết lượng dầu thu được khoảng 98% (tức là cần dùng hết 60 mL để chiết được 98% dầu có trong hạt gấc). Trong trường hợp chiết bằng 20 mL (tỷ lệ khối lượng nguyên liệu: dung môi là 1:10) dung môi mỗi lần chiết cần dùng 4 lần chiết (80 mL dung môi) để đạt được lượng dầu như trên.

Khi tiến hành so sánh với các chỉ số của dầu hạt gấc thu được giữa hai phương pháp chiết ở nhiệt độ thường và chiết Soxhlet ở nhiệt độ cao chúng tôi nhận thấy rằng các chỉ số khúc xạ, chỉ số xà phòng hóa và chỉ số acid hầu như không thay đổi. Trong khi đó, chỉ số peroxit của dầu thu được bằng phương pháp chiết Soxhlet cao hơn nhiều so với dầu thu được bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ thường (cao hơn gấp gần 10 lần). Chỉ số peroxit thay đổi bất thường khi chiết dầu bằng phương pháp chiết Soxhlet có thể do sự oxi hóa, biến đổi của các acid không no liên hợp khi chiết trong dung môi ở nhiệt độ cao với thời gian kéo dài. Chỉ số iodine cũng nhận thấy có sự giảm khi so sánh giữa phương pháp chiết Soxhlet ở nhiệt độ cao so với phương pháp còn lại, kết quả chỉ ra trong Bảng 2.

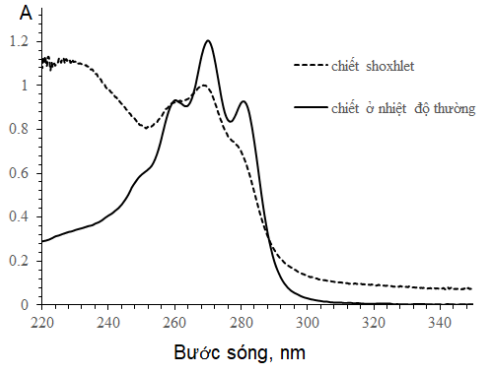
Bảng 2. Thông số của dầu gấc chiết được bằng phương pháp chiết Soxhlet

Các chỉ số	Chiết Soxhlet	Chiết dung môi ở nhiệt độ thường
Chỉ số khúc xạ (n)	1,488	1,492
Chỉ số acid (mg KOH/g chất béo)	0,733	0,533
Chỉ số peroxide (mqe/Kg)	12,5	1,2
Chỉ số iodine	175,1	179,1
Chỉ số xà phòng hóa	198,5	196,2
Hàm lượng dầu hạt	43,1±0,4*	42,3±0,5

* biểu diễn kết quả: mean±SD; n = 3

Trong trường hợp chiết dầu bằng dung môi, chỉ số peroxide của dầu hạt thấp chứng tỏ điều kiện chiết phù hợp, không làm biến đổi các thành phần trong dầu. Chỉ số iodine tỷ lệ với hàm lượng các acid béo không no có trong dầu hạt, với dầu hạt gấc chỉ số iodine cao, điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả xác định hàm lượng các acid béo có trong dầu hạt gấc [22]. Chỉ số khúc xạ của dầu thu được cao phù hợp với hàm lượng các acid béo không no trong dầu hạt lớn. Kết luận này hoàn toàn phù hợp với kết quả chỉ số iodine đã xác định được ở trên. Kết quả về hiệu suất chiết thu được theo 2 phương pháp là khác nhau không có ý nghĩa, như vậy phương pháp chiết dung môi hoàn toàn có thể sử dụng để thay thế cho phương pháp chiết Soxhlet trong trường hợp dầu chứa các thành phần dễ bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ.

Phổ UV-VIS của dầu hạt gấc thu được bằng hai phương pháp chiết ở trên cũng được đo trong dung môi n-hexane để đánh giá sự biến đổi trong thành phần của các acid béo không no chứa nối đôi liên hợp, kết quả chỉ ra trong Hình 5.

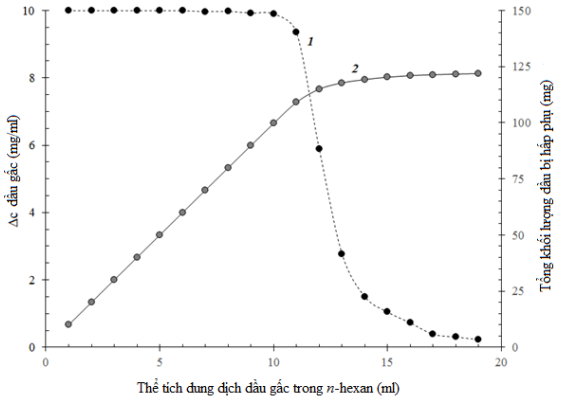


Hình 5. Phổ hấp thụ phân tử UV-VIS của dầu hạt gấc thu được bằng hai phương pháp trong n-hexane

Nhận thấy rằng, trong trường hợp chiết dầu hạt bằng phương pháp chiết Soxhlet xuất hiện vùng hấp thụ mạnh ở vùng 220-240 nm, ngoài vùng hấp thụ ở vùng 240-300 nm của các acid béo chứa nôi đôi liên hợp. Điều này có thể giải thích do sự biến đổi, sự oxi hóa dầu ở nhiệt độ cao trong quá trình chiết Soxhlet.

3.3. Quá trình chiết pha rắn làm sạch dầu hạt gấc

Chuẩn bị dung dịch dầu chưa được làm sạch trong *n*-hexane với nồng độ 10 mg/mL. Sau đó dẫn mẫu phân tích vào cột chiết pha rắn theo từng phần thể tích 1mL. Xác định hàm lượng dầu trong dung dịch sau khi đi qua cột chiết pha rắn bằng phương pháp phổ hấp thụ điện tử trong vùng UV (tại cực đại hấp thụ trong dung môi n-hexane ở 270 nm). Một đường chuẩn liên hệ giữa nồng độ của dầu (mg/mL) và mật độ quang A đã được xây dựng ở bước sóng 270 nm để xác định nồng độ của dầu gấc trong quá trình chiết pha rắn. Ngoài ra tổng lượng dầu không hấp phụ trên cột được xác định lại bằng phương pháp khối lượng. Kết quả thu được chỉ ra trong Hình 6.



Hình 6. Quá trình hấp thu dầu trên cột chiết pha rắn DIAPAK C.
1- Hàm lượng dầu hấp thu trên cột theo từng mL thể tích mẫu qua cột trong quá trình tăng thể tích,
2- Tổng khối lượng dầu được hấp thu trên cột trong quá trình chiết pha rắn (mg).

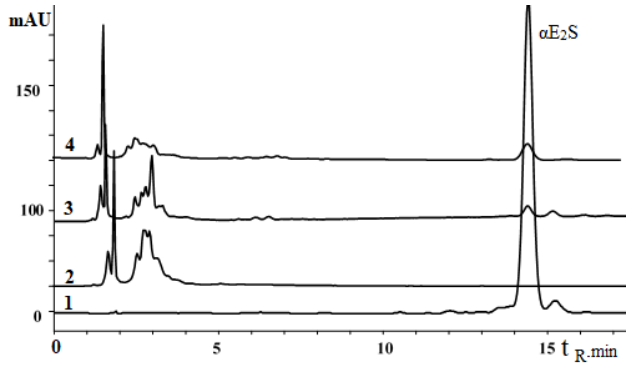
Từ những dữ liệu trên cho thấy rằng, cột chiết pha rắn hấp phụ hoàn toàn 10 mL dung dịch dầu trong *n*-hexane (nồng độ 10 mg/mL). Giới hạn hấp thu của cột chiết đối với dầu hạt gấc tính toán được là 120 ±2 (P = 0,95; n = 3) mg/cột chiết (chứa 0,5 g silicagel). Trong nghiên cứu này, để rửa giải dầu trong cột chiết chúng tôi sử dụng dung môi dichloromethane và rửa

giải theo từng phần thể tích 1mL, điều khiển quá trình rửa rải bằng phương pháp phổ hấp thụ UV-VIS và sắc ký lỏng hiệu năng cao. Kết quả chỉ ra rằng để rửa giải hoàn toàn dầu trong cột chiết pha rắn cần sử dụng 4 mL dung môi. Dung dịch thu được sau khi rửa giải được làm bay hơi dung môi thu được dầu trong suốt không chứa thành phần rắn vẩn đục như dầu khi chưa được làm sạch. Sau quá trình chiết pha rắn từ 122 mg dầu chưa làm sạch thu được 108 mg dầu sạch, như vậy trong dầu chưa làm sạch chứa khoảng 12% hợp chất phân cực hơn và hiệu suất thu hồi sau khi làm sạch khoảng 88%.

Ý nghĩa thực nghiệm của việc làm sạch dầu hạt gấc là cùng một mẫu dầu chưa làm sạch sau một thời gian cất giữ trong tủ lạnh (t = 10 ^{o}C) trong thời gian một vài tháng thì lượng triacylglycerol trong mẫu dầu chứa ban đầu bị phá hủy khá lớn (trên 50%), còn mẫu đã làm sạch thì không xảy ra hiện tượng đó.

Kiểm soát hoạt tính xúc tác của pha tĩnh dùng trong cột chiết pha rắn

Để đánh giá khả năng sử dụng silicagel làm pha tĩnh trong cột chiết pha rắn để làm sạch dầu hạt gấc chúng tôi tiến hành đánh giá quá trình chuyển hóa của αE_2S khi tiếp xúc với silicagel của các nhà sản xuất khác nhau và với thời gian tiếp xúc khác nhau bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC. Nghiên cứu được tiến hành với 3 loại silicagel với các nhãn hiệu khác nhau. Kết quả sau khi chạy sắc ký đưa ra trong Hình 7.



Hình 7. Quá trình giữ của αE_2S trong trạng thái hấp phụ trên silicagel.
1-Dung dịch dầu gốc, sản phẩm sau khi giải hấp sau 48h; 2-silicagel nhãn hiệu KCMG;
3- silicagel nhãn KCKG; 4- silicagel trong cột chiết pha rắn DIAPAK C.

Theo kết quả được chỉ ra trong Hình 7 có thể thấy rằng trong mẫu dung dịch chuẩn ban đầu tách ra từ dầu hạt gấc chứa triacylglycerol αE_2S, với một một lượng nhỏ đồng phân của nó (sắc ký đồ 1), nhưng sau một thời gian tiếp xúc trong thời gian 48 giờ với silicagel nhãn hiệu KCMG (sắc ký đồ 2), KCKG (sắc ký đồ 3) và silicagel chứa trong cột chiết pha rắn DIAPAK C (sắc ký đồ 4) đều phá hủy gần như hoàn toàn chất phân tích.

Sau đó chúng tôi nghiên cứu sự phụ thuộc của mức độ chuyển hóa của chất phân tích vào thời gian tiếp xúc của chất phân tích với silicagel chứa trong cột chiết pha rắn để đánh giá khả năng sử dụng cột chiết pha rắn DIAPAK C trong quá trình làm sạch dầu hạt gấc. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm như trên nhưng với thời gian giữ của chất phân tích trên silicagel khác nhau. Kết quả chỉ ra rằng với thời gian tiếp xúc của silicagel với α-E_2S càng ngắn thì mức độ chuyển hóa của chất phân tích càng nhỏ. Đồng thời với thời gian tiếp xúc không quá dài (0,5-1,0 giờ) chất phân tích bị phân hủy không đáng kể (nhỏ hơn 1%). Như vậy có thể sử dụng cột chiết pha rắn DIAPAK C để làm sạch dầu chứa gốc acid với nối đôi liên hợp tuy nhiên thời gian tiếp xúc giữa mẫu với pha rắn phải được giới hạn.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, quy trình chuẩn bị mẫu cho quá trình phân tích triacylglycerol trong dầu hạt chứa acid béo có nối đôi liên hợp gồm ba giai đoạn đã được nghiên cứu và đề xuất. Trong giai đoạn 1, sự có mặt của acid béo có nối đôi liên hợp có trong dầu hạt được xác định khi đo phổ hấp thụ phân tử của dịch chiết dầu hạt trong n-hexane trong vùng bước sóng 220-400 nm. Dầu hạt chứa acid béo có nối đôi liên hợp được chiết bằng dung môi n-hexane ở nhiệt độ thường. Để hiệu suất chiết đạt được trên 98% cần sử dụng 6 lần chiết (với tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 5:1 v/w) hoặc 4 lần chiết (với tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 10:1 v/w). Kết quả chiết dầu bằng phương pháp chiết dung môi ở nhiệt độ thường và phương pháp chiết Soxhlet đưa ra hiệu suất chiết là như nhau, tuy nhiên chiết ở nhiệt độ thường tránh được quá trình phân hủy, oxy hóa của các acid béo chứa nối đôi liên hợp. Dầu hạt thô được làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn sử dụng silicagel làm pha tĩnh, thời gian tiếp xúc của chất phân tích với pha tĩnh không được quá dài để hạn chế khả năng tính xúc tác của silicagel làm biến đổi các chất phân tích. Các triacylglycerol được rửa giải khỏi chất cột chiết pha rắn bằng dung môi diclomethane. Hiệu suất thu hồi của dầu sau quá trình làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn là khoảng 88%

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng nguồn kinh phí hỗ trợ từ Chương trình Vườn ươm Sáng tạo Khoa học và Công nghệ Trẻ, được quản lý bởi Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ Trẻ - Thành Đoàn Thành phố Hồ Chí Minh và Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh, theo hợp đồng số "20/2021/HĐ-KHCNT-VƯ".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Holic R., Xu Y., Caldo K.M.P., Singer S.D., Field C.J., Weselake R.J., Chen G. - Bioactivity and biotechnological production of punicic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol. **102** (2018) 3537-3549.
2. Arao K., Wang Y.M., Inoue N., Hirata J., Cha J.Y., Nagao K., Yanagita T. - Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats. Lipids. Health. Dis. **3** (2004) 24.
3. Gao-Feng Yuan, Xiao-E Chen, Duo Li - Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review, Food Funct. **5** (2014) 1360-1368.
4. Hennessy A.A, Ross P.R, Fitzgerald G.F, Stanton C. - Sources and Bioactive Properties of Conjugated Dietary Fatty Acids, Lipids **51** (4) (2016), 377-97.
5. Chen J., Cao Y., Gao H., Yang L., Chen ZY. - Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. Chemistry and Physics of Lipids **150** (2) (2007) 136-142.
6. Kramer J.K.G., Fellner V., Dugan M.E.R., Sauer F.D., Mossoba M.M., Yurawecz M.P. - Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. Lipid **32** (11) (1997) 1219–1228.
7. Indelicato S., Bongiorno D, Pitonzo R. - Triacylglycerols in edible oils: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. J. Chromatogr A. **1515** (2017) 1-16.
8. Lerma-García M.J., Lusardi R., Chiavaro E., Cerretani L., Bendini A., Ramis-Ramos G., Simó-Alfonso E.F. - Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet–visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils. Journal of Chromatography A **1218** (42) (2011) 7521-7527.

9. Nguyen AV, Deineka VI, Deineka LA,Vu TNA - Comparison of Separation of Seed Oil Triglycerides Containing Isomeric Conjugated Octadecatrienoic Acid Moieties by Reversed-Phase HPLC. Separations **4** (4) (2017) 37.
10. Nguyen AV. Deineka V. Vu TNA. Deineka LA, Doan TLP. Kovalchukova O. - Thladiantha Seed Oils - New Source of Conjugated Fatty Acids: Characterization of Triacylglycerols and Fatty Acids. Journal of Oleo Science **69** (9) (2020) 993-1000.
11. Siraj M.S., Zakiuddin S.K. - Technologies for Oil Extraction: A Review. International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology **1** (2) (2016) 106-110.
12. Bhuiya M.M.K., Mohammad R., Masud K., Nanjappa A., Mofijur M. - Comparison of oil extraction between screw press and solvent (n-hexane) extraction technique from beauty leaf (*Calophyllum inophyllum* L.) feedstock. Industrial Crops and Products **144** (2020) 112024.
13. Hossein A., Jerry W. King, Ali E. Mohammad Y. - Supercritical fluid extraction of seed oils - A short review of current trends. Trends in Food Science & Technology **111** (2021) 249-260.
14. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. - Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. Polish J. Environ. Stud. **15** (2006) 677-690.
15. Nguyen V.A., Deineka V., Vu T.N.A., Deineka L., Doan T.L.P., Kovalchukova O. - Thladiantha seed oils - New source of conjugated fatty acids: characterization of triacylglycerols and fatty acids. Journal of Oleo Science. **69(9)** (2000) 993-1000.
16. Ruiz-Gutiérrez V, Pérez-Camino M.C. - Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds, J. Chromatogr. A. **885** (2000) 321-341.
17. Ishida BK, Turner C, Chapman MH, McKeon TA. - Fatty acid and carotenoid composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. J. Agric. Food Chem. **52** (2004) 274-279.
18. Yoshime LT, de Melo I.L.P., Sattler J.A.G., Bonifácio E., de Carvalho T, Mancini-Filho J. - Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seed oil as a naturally rich source of bioactive compounds for nutraceutical purposes. Nutrire. **41** (2016) 12.
19. Rüger R, Niehaus T, van Lenthe E, Heine T, Visscher L. - Vibrationally resolved UV/Vis spectroscopy with time-dependent density functional based tight binding. J. Chem. Phys. **145** *(*2016) 184107.
20. Hammond E.G., Lundberg W.O. - The alkali isomerization of a methyl docosahexaenoate and the spectral properties of conjugated fatty acids. The Journal of The American Oil Chemists' Society **30 (11)** (1953) 433-438.
21. Johnson A. R., Vitha M. F.- Chromatographic selectivity triangles. J. Chromatogr A. **1218** (4) (2011) 556-586.
22. Nguyen A. V., Deineka V. I., Pham L. Q., Doan P. L., Deineka L. A., Vu A. T. N., Dinh T. T. T. - Determination of triacylglycerols and fatty acid composition of momordica cochinchinensis seed oil and some other plants of this genus. Chemistry of Plant Raw Material **3** (2019) 53-60.

ABSTRACT

STUDY OF SAMPLE PREPARATION OF SEED OILS
WITH CONJUGATED FATTY ACIDS FOLLOWED BY HPLC

Vu Thi Ngoc Anh[1], Phan The Duy[2], Ngo Thi Tu Trinh[3], Nguyen Van Anh[2]*
[1]*Southern Branch of Vietnam-Russia Tropical Center*
[2]*Ho Chi Minh City University of Food Industry*
[3]*The Center for Young Science and Technology Development*
*Email: *anhnv@hufi.edu.vn*

Conjugated fatty acids have been shown to possess many valuable biological activities, including anticarcinogenic, antiatherogenic, anti-inflammatory, and antidiabetic effects and immune-modulating properties. However, these compounds are susceptible to external factors (temperature, light) and easily decomposed and oxidized during separation, extraction, and sample processing prior to analysis. In this work, a fast and efficient sample preparation procedure for analyzing triacylglycerol compositions containing conjugated fatty acids in seed oils was studied. The sample preparation procedure consists of three stages: the rapid determination of the presence of conjugated double fatty acids in seed oil using UV spectroscopy; solvent extraction of seed oil at room temperature; oil purification using solid phase extraction with silicagel as stationary phase. The results showed that the molecular absorption spectra of seed oil in n-hexanee in the wavelength range of 220-400 nm could be used to quickly detect the presence of fatty acid moieties, containing conjugated double bonds in oil. The seed oil was extracted at room temperature using three different solvents in polarity: n-hexane, dichloromethane, and acetone; and compared with the traditional Soxhlet extraction method. The seed oil was purified by solid phase extraction using silicagel as the stationary phase. The catalytic activity of silica gel with analytical compounds absorbed on the stationary phase of solid phase extraction columns was controlled and discussed.

Keywords: Sample preparation, solid phase extraction, seed oil, triacylglycerols, conjugated fatty acid.