

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN B1 VÀ B6
TRONG MỘT SỐ LOẠI NẤM LỚN Ở VÙNG BẮC TRUNG BỘ CỦA VIỆT NAM
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

Đến tòa soạn 16 - 6 - 2015

Đinh Thị Trường Giang

Đại học Vinh

SUMMARY

**RESEARCH TO DETERMINE THE AMOUNT OF VITAMINS B1 AND B6 IN
LARGE FUNGUS FROM NORTH CENTRAL REGION OF VIETNAM
BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)**

Measured parameters and optimum conditions to determine the content of vitamins B1 and B6 were researched including wavelength, flow rate and mobile phase. The linear range was from 0.5-5.0 ppm with B1 and was from 1.0- 5.0ppm with B6. The amount of vitamin B1 and B6 in large fungus has been determined by HPLC using the calibration curve. The detection limits for B1 and B6 obtained were 0.069ppm and 0.13ppm; the quantification limits for B1 and B6 were 0.232 ppm and 0.42 ppm, respectively. The relative standard deviations for the determination of three levels of concentration of the standard solution were less than 1%, whereas the relative standard deviations for the determination of sample were less than 2.5%. The recovery of vitamins B1 and B6 was 82.3% and 83.3%, respectively.

1. MỞ ĐẦU

Nấm lớn được chia ra nhiều chi, họ, loài, loại khác nhau trong đó có nhiều loại có thể sử dụng làm dược liệu như nấm linh chi, nấm thượng hoàng, nấm lỗ, nấm đen... Đặc biệt, nấm linh chi là loại thuốc quý có tác dụng bảo vệ gan, giải độc, tiêu đờm, lợi tiểu, bổ dạ dày; nấm thượng hoàng có thể ngăn ngừa các bệnh như rối loạn chức

năng, xuất hiện tiêu chảy và ung thư, ức chế kim hãm sự phát triển khối u. Thành phần hóa học và dược tính của mỗi loại nấm lớn khác nhau là khác nhau và cũng phụ thuộc vào vị trí địa lý, khí hậu của nơi nấm sinh trưởng. Ngoài những hợp chất có hoạt tính sinh học cao như các polisacarit, tritepenoit thì trong các loại nấm lớn nói chung, còn có các thành phần có giá trị

dinh dưỡng khác như các vitamin, axit amin, lipit[1]. Cho đến nay, nghiên cứu các loài nấm lớn ở vùng Bắc Trung bộ chủ yếu là điều tra đa dạng sinh học, mà chưa nghiên cứu về mặt hóa học, hoạt tính sinh học và các thành phần dinh dưỡng. Trong các công bố trước đây, chúng tôi đã tiến hành phân tích, đánh giá hàm lượng các nguyên tố vi lượng, trong công trình này, chúng tôi tiến hành phân tích, đánh giá hàm lượng các vitamin B1 (thiamin) và B6 (pyridoxan và các dạng của nó) trong các loại nấm lớn nhằm góp phần xác định, đánh giá thành phần dinh dưỡng của các loại nấm lớn ở vùng Bắc Trung Bộ nói riêng và Việt Nam nói chung.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thiết bị sắc ký Alliance, bơm 2690, detector huỳnh quang 2475 (Hãng Waters, Mỹ), cột C18 (250 4,6 mm, 5 μ m I.D); nồi cách thủy 06 chỗ (hãng Memmer); thiết bị lọc dung môi (hãng Gast - Mỹ); máy rung siêu âm (hãng Elma - Đức); máy li tâm 5702R, tốc độ tối đa 3000 vòng/phút (hãng Eppendorf - Mỹ); máy nghiền mẫu Retsch GM 200 (Đức), máy lắc vortex Velp (Ý). Cân phân tích có độ chính xác đến 0,0001 của Mettler Toledo (Đức), giấy lọc dung môi 47mm; 0,45 μ m. Các dụng cụ như: bình định mức 10ml, 100ml, 250ml; cốc có mỏ 100ml, 250ml; giấy lọc whatman.

2.2. Hóa chất

Các hóa chất: metanol, iso butanol, axit glycolic, axit axêtic, axit 1-heptansulfonic, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, HCl đ, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, NaOH, $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , H_3PO_4 đều

thuộc loại tinh khiết phân tích sử dụng cho HPLC.

Chất chuẩn B1 (thiamine hydrochloride, hãng Sigma - Mỹ) có độ tinh khiết cao hơn 99%; chất chuẩn B6 (pyridoxamin dihydrochlorua, hãng Sigma - Mỹ) có độ tinh khiết cao hơn 98%.

2.3. Chuẩn bị mẫu nấm phân tích

Mẫu nấm lớn sau khi thu hái về, đem rửa sạch, phơi khô tự nhiên, sau đó bảo quản trong túi nilon. Ký hiệu thứ tự MN 201-MN 211, tên khoa học các mẫu nấm tương ứng được ghi trong bảng 3.1. Dùng dao cắt phần mũ nấm thành từng miếng (không lấy phần cuống nấm) cỡ 3-5cm. Lấy mỗi mẫu khoảng 30g, nghiền mịn và trộn sao cho mẫu đồng nhất. Làm lạnh sơ bộ để tránh mẫu tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài và đưa đi phân tích ngay.

2.3.1 Xử lý mẫu nấm xác định vitamin B1

Cân 2 gam mẫu thử cho vào bình nón 250 ml, thêm khoảng 100ml dung dịch HCl 1N sao cho pH = 1. Thủy phân mẫu trong nồi cách thủy 1h kể từ lúc nước sôi. Sau khi thủy phân xong, để nguội, chỉnh pH đến khoảng 3,75 - 4,75 bằng dung dịch CH_3COONa 2,5N. Chuyển toàn bộ dung dịch này vào bình định mức 250ml và định mức vừa đủ tới vạch bằng nước cất. Lọc qua giấy lọc. Hút 1 ml dung dịch lọc vào bình định mức 10ml, thêm vào mỗi bình định mức 3 ml dung dịch NaOH 15% trong $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% đã pha ở trên. Lắc trên máy lắc 1 phút, thêm isobutanol đến vạch định mức và lắc 30 giây. Để yên trong bóng tối 20 phút để tách lớp. Tách chiết dung dịch trong để bơm vào HPLC[2]

2.3.2. Xử lý mẫu nấm xác định vitamin B6

Chúng tôi đã tiến hành xử lý các mẫu nấm lớn xác định vitamin B6 theo 2 quy trình:

Quy trình 1: Theo TCVN 9513: 2012 [3]. Cân 5 g mẫu đồng nhất cho vào bình nón 150ml, thêm 50ml HCl 0,1M (pH=1) làm nóng trong thiết bị áp lực 30 phút ở 120°C, sau đó làm nguội tới nhiệt độ phòng, chuyển sang bình định mức 100ml và pha loãng bằng nước đến vạch, lọc và ly tâm 50ml dung dịch mẫu đã xử lý bằng axit, chuyển lớp nổi phía trên sang chai thủy tinh đầy kín, được dung dịch chiết mẫu.

Quy trình 2: Với các ký hiệu 3 dạng tồn tại có thể chuyển hóa cho nhau của B6 là PN(Pyridoxine); PL(Pyridoxal); PM(Pyridoxamine). Nguyên tắc quá trình xử lý các mẫu nấm như sau: Bước 1: PM thực hiện phản ứng với axit glyoxylic tạo PL, Bước 2: PL bị khử quay trở lại PN bằng NaBH₄ trong dung dịch axit yếu.

Cân 5 gam mẫu đã được đồng hóa cho vào bình nón 50ml. Thêm 2ml dung dịch natriacetat 0,625M; 2,5ml axit glyoxylic 1M và 0,8ml sắt (II) sulfate 10g/l. Lắc qua đêm trên máy lắc ngang (ít nhất 12h) ở 37°C. Để nguội, chuyển vào bình định mức 50ml và định mức đến vạch bằng nước cất, lọc qua giấy lọc. Dịch lọc sau khi lọc, thêm tiếp 4,5ml dung dịch NaBH₄ 0,1M và 0,5 ml axit acetic tinh khiết. Lắc nhẹ 30 giây. Sau khi sủi hết bọt, lọc qua màng lọc 0,45µm, bơm vào HPLC [4].

2.4. Phương pháp phân tích

Hàm lượng vitamin B1 và B6 trong các mẫu nấm lớn đã được chúng tôi nghiên cứu xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng

hiệu năng cao (HPLC), detector huỳnh quang. Những điều kiện và thông số cần thiết cho phép ghi đo HPLC tối ưu, khoảng nồng độ tuyến tính và đường chuẩn xác định hàm lượng B1 và B6 đã được nghiên cứu, xác lập và xây dựng. Đánh giá phương pháp đã được tiến hành thông qua tính toán giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại của phép ghi đo và hiệu suất thu hồi.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu các điều kiện phân tích tối ưu

3.1.1. Nghiên cứu lựa chọn bước sóng kích thích và phát xạ

Thực hiện các phép đo sử dụng detector huỳnh quang, cần lựa chọn các bước sóng kích thích tối ưu để các chất phân tích phát ra bức xạ huỳnh quang tối ưu tương ứng. Bằng cách thay đổi các bước sóng kích thích và phát xạ của phép đo vitamin B1, B6 chúng tôi đã lựa chọn được bước sóng kích thích $\lambda_{kt} = 365\text{nm}$, bước sóng phát xạ huỳnh quang $\lambda_{px} = 435\text{nm}$ đối với B1 và bước sóng kích thích $\lambda_{kt} = 290\text{nm}$, bước sóng phát xạ huỳnh quang $\lambda_{px} = 395\text{nm}$ với vitamin B6.

3.1.2. Nghiên cứu lựa chọn pha động và tỷ lệ pha động

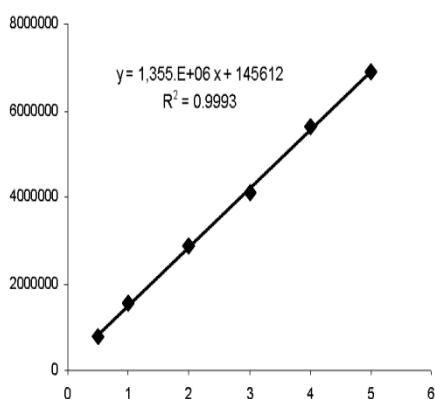
Các phép nghiên cứu được thực hiện với dung dịch chuẩn vitamin B1, B6 đều có nồng độ 2ppm, cột sắc ký lựa chọn là cột C18. Bằng cách lựa chọn một số hệ dung môi có độ phân cực tương đương với dung môi metanol (metanol, metanol: KH₂PO₄, metanol: acetonitrin, metanol: H₃PO₄+ axit 1- heptane sulfonic), thay đổi tỷ lệ pha

động và đo sắc ký. Lựa chọn pha động và tỷ lệ pha động tối ưu khi tại đó thu nhận được diện tích pic sắc lý lớn nhất và độ lặp lại của các phép đo tốt nhất. Chúng tôi đã lựa chọn pha động để xác định vitamin B1 là mêtanol; vitamin B6 là hệ mêtanol: H₃PO₄ 0,01M trong axit 1- heptane sulfonic 0,05% (w/v) pH=2,5 theo tỷ lệ 26:74.

3.1.3. Nghiên cứu lựa chọn tốc độ dòng

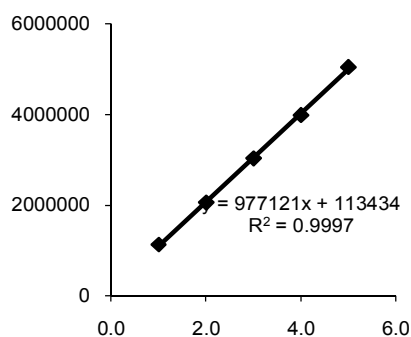
Các phép nghiên cứu được thực hiện trên dung dịch chuẩn vitamin B1, B6 nồng độ 2ppm. Thay đổi tốc độ dòng từ 0,8-1,3ml/phút đối với cả 2 phép phân tích B1, B6. Tốc độ dòng tối ưu được lựa chọn đều là 1,0ml/phút vì tại đó diện tích pic sắc ký lớn nhất và độ lặp các phép đo tốt nhất.

3.2. Nghiên cứu khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn xác định vitamin B1, B6



Hình 3.1. Đường chuẩn xác định vitamin B1

Tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn vitamin B1 có nồng độ 0,2-6,5 ppm từ dung dịch chuẩn gốc thiamin clorua hydroclorua 100 ppm trong HCl 1N và dãy dung dịch chuẩn vitamin B6 có nồng độ 0,2-6,5ppm từ dung dịch chuẩn gốc B6 500 ppm pyidoxamin đihidroclorua trong nước cất, tiến hành ghi đo sắc đồ các dung dịch chuẩn vừa pha. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy khoảng nồng độ tuyến tính đạt được cho phép đo HPLC với vitamin B1 là từ 0,5-5 ppm và vitamin B6 là từ 1,0-5,0 ppm. Trong khoảng tuyến tính thu được chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn thể hiện sự phụ thuộc diện tích pic sắc ký vào nồng độ của vitamin B1, B6 như ở hình 3.1; 3.2



Hình 3.2. Đường chuẩn xác định Vitamin B6

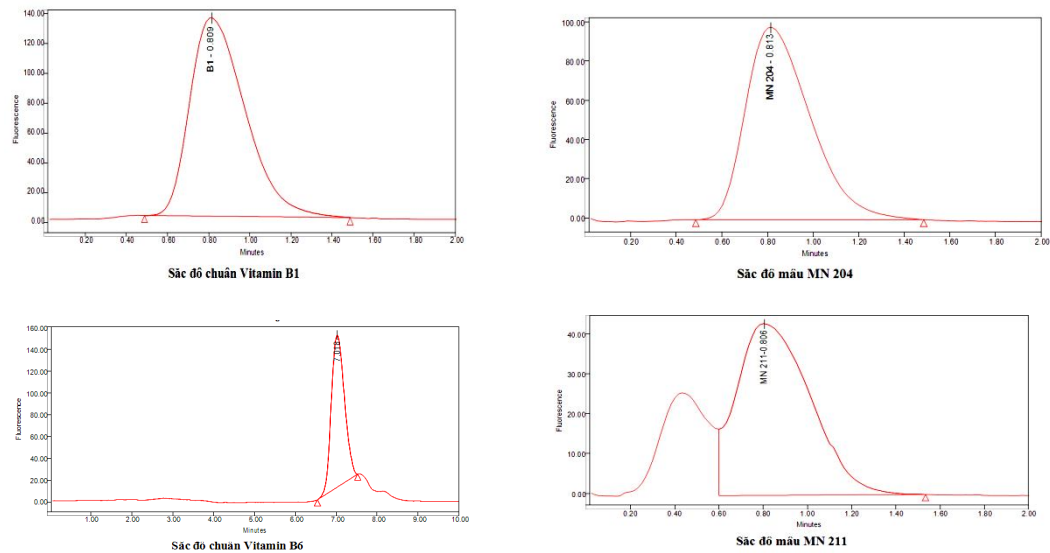
3.3. Xác định hàm lượng B1, B6 trong các mẫu nấm lớn

Hàm lượng B1 và B6 trong các mẫu nấm được xác định với các điều kiện như ghi ở

mục 3.1, theo phương pháp đường chuẩn trình bày ở mục 3.2. Hàm lượng B1 và B6 là giá trị trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm song song và được ghi lại ở bảng 3.1 và hình 3.3

Bảng 3.1. Hàm lượng vitamin B1, B6 trong các mẫu nấm thực

STT	Ký hiệu mẫu	Tên khoa học của nấm lớn	Hàm lượng TB của vitamin B1 (mg/kg)	Hàm lượng TB của vitamin B6 (mg/kg)	
				Theo quy trình xử lý mẫu 1	Theo quy trình xử lý mẫu 2
1	MN201	Hexagonia apiaria (Nấm lỗ)	3,4954	KPH	KPH
2	MN202	Ganodema applanatum (linh chi)	2,5355	KPH	KPH
3	MN203	Ganoderma lucidum (linh chi)	3,3234	KPH	KPH
4	MN204	Ganoderma philippii (linh chi)	2,9103	KPH	KPH
5	MN205	Phellinusmelanodermus (thượng hoàng)	0,9194	KPH	KPH
6	MN206	Ganoderma triangulatum (linh chi)	1,7056	KPH	KPH
7	MN207	Nigrofomes melanporus (nấm đen)	1,4382	KPH	KPH
8	MN209	Ganoderma fulvellum (linh chi)	2,8457	KPH	KPH
9	MN210	Phellinus setulosus (thượng hoàng)	0,8144	KPH	KPH
10	MN211	Ganoderma lobatum (linh chi)	1,2553	KPH	KPH



Hình 3.3. Sắc ký đồ của một số mẫu chuẩn và mẫu nấm lớn

Kết quả phân tích thu được cho thấy trong khi hàm lượng B1 trong tất cả 10 mẫu nấm lớn đều lớn, dao động từ 0,8144 đến 3,4954 mg/kg thì hàm lượng B6 trong 10

mẫu nấm lớn đều nằm dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp.

3.4. Đánh giá phương pháp phân tích

3.4.1. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOD)

Căn cứ vào kết quả xây dựng đường chuẩn xác định vitamin B1 có độ lệch chuẩn $S_{Y1}=31468$ và phương trình đường chuẩn của vitamin B1 là $Y = AX+B = 1,355.10^6x + 145612$

Tính toán LOD, LOQ của vitamin B1 theo quy tắc 3 σ thu được: $LOD_{B1} = (3S_{Y1})/A = 0,069ppm$; $LOQ_{B1} = (10S_{Y1})/A = 0,232ppm$
Căn cứ vào kết quả xây dựng đường chuẩn xác định vitamin B6 có độ lệch chuẩn $S_{Y2}=41114$ và phương trình đường chuẩn của vitamin B6 là $Y = AX+B = 977121x + 113434$.

Bảng 3.2. Kết quả tính toán độ lặp lại của phép ghi đo trên dung dịch chuẩn vitamin B1, B6

Vitamin	B1			B6		
Nồng độ chuẩn bị (ppm)	1,000	3,000	5,000	1,000	3,000	5,000
Nồng độ TB phát hiện	1,0066	3,0252	5,0142	1,0096	3,0088	5,0128
$S_{td}\%$	0,533	0,923	0,168	0,648	0,223	0,244

Dựa vào giá trị độ lệch chuẩn tương đối rất nhỏ, chứng tỏ các phép đo trên có độ lặp lại tốt.

3.4.3. Độ lặp lại trên các mẫu nấm lớn
Lấy 3 mẫu nấm song song 202-1, 202-2, 202-3, tiến hành phân tích như mục 3.3, xác

Tính toán LOD, LOQ của vitamin B6 theo quy tắc 3 σ như vitamin B1 được các giá trị $LOD_{B6}= 0,13ppm$, $LOQ_{B6}= 0,42ppm$.

3.4.2. Độ lặp lại của phép ghi đo trên các dung dịch chuẩn B1, B6

Phép đánh giá được tiến hành ở 3 giá trị nồng độ đầu, nằm giữa và cuối khoảng tuyến tính, tiến hành đo lặp lại 5 lần tại mỗi giá trị nồng độ. Độ lặp lại thể hiện qua độ lệch chuẩn tương đối $S_{td}\%$ Kết quả phân tích và tính toán được thể hiện ở bảng 3.2.

định vitamin B1, B6, kết quả được thể hiện ở bảng 3.3.

Bảng 3.3 Kết quả phân tích độ lặp lại trên các mẫu thử song song

Mẫu	201-1	201-2	201-3	Trung bình	$S_{td}\%$
Vitamin B1(mg/kg)	2,567	2,548	2,491	2,535	2,2091
Vitamin B6 (mg/kg)	KPH	KPH	KPH	KPH	

Từ giá trị phân tích, tính toán thể hiện ở bảng 3.3 cho thấy phép phân tích HPLC xác định vitamin B1, B6 có độ lặp lại cao vì giá trị $S_{td}\%$ bé.

3.4.4. Hiệu suất thu hồi

Để đánh giá độ đúng của phương pháp phân tích, chúng tôi tiến hành thực nghiệm và tính toán hiệu suất thu hồi qua việc phân tích mẫu thử là mẫu nấm MN201 và mẫu

nấm có thêm chuẩn một lượng chính xác B1 hay B6. Tiến hành phân tích bằng HPLC 2 loại mẫu trên theo quy trình phân tích như mục 3.3. Kết quả phân tích và tính toán cho thấy:

Hàm lượng B1 trong mẫu thử là 2,5355 mg/kg, thêm chuẩn là 2,5205mg/kg, hàm lượng phân tích được bằng HPLC là

4,6812mg/kg, hiệu suất thu hồi $H = 92,59\%$ với $S_{td} = 0,691\%$.

Hàm lượng B6 trong mẫu thử là 0,000mg/kg, thêm chuẩn là 2,8358mg/kg, hàm lượng phân tích được bằng HPLC là 2,3622mg/kg, hiệu suất thu hồi $H = 83,3\%$ với $S_{td} = 1,112\%$.

Từ kết quả tính toán hiệu suất thu hồi và theo AOAC, với ngưỡng hàm lượng ppm, hiệu suất thu hồi từ 80-120%, nhận thấy rằng phép phân tích HPLC với vitamin B1, B6 có hiệu suất thu hồi thỏa mãn với độ lệch chuẩn tương đối thấp, nên phép phân tích có độ đúng tốt.

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu lựa chọn được các điều kiện phân tích tối ưu cho phép ghi đo HPLC để xác định vitamin B1, B6 như các bước sóng kích thích và phát xạ, tốc độ dòng, pha động, tỷ lệ pha động. Đã tiến hành nghiên cứu khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn xác định vitamin B1, B6. Đã tiến hành xử lý 10 mẫu nấm lớn và xác định hàm lượng vitamin B1 và B6 trong các mẫu nấm bằng phương pháp HPLC. Đã tiến hành đánh giá phương pháp phân tích qua

thực nghiệm và tính toán độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, hiệu suất thu hồi. Kết quả tính toán cho thấy độ lặp lại tốt (độ lệch chuẩn tương đối đều bé hơn 0,25%), giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp (ngưỡng ppm), hiệu suất thu hồi cao (đều lớn hơn 80%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. P. Z. Furlani, H. T. Godoy (2008) "*Analytical, Nutritional and Clinical Methods Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms*", Food Chemistry, 106, 816-819.
- [2]. AOAC 941.15: "*Vitamin B1 (Thiamine)*".
- [3]. TCVN 9513 :2012 - "*Thực phẩm-xác định B6 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*"
- [4]. Hung Khiem Trang, (2013) "*Development of HPLC method for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical and fortified food products*", A thesis, Tiger prints, Clemson University, pp.1745.