

**PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG VITAMIN D₂ TRONG NẤM
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)
VÀ ĐỊNH HƯỚNG LÀM GIÀU VITAMIN D₂ TRONG NẤM**

Đến tòa soạn 14-9-2016

Mai Thị Thanh Huyền, Đinh Thị Trường Giang

Khoa Hóa học – Trường Đại Học Vinh

SUMARY

**DETERMINATION OF VITAMIN D₂ IN MUSHROOMS BY HIGH-
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) AND
ENRICHMENT OF VITAMIN D₂ IN MUSHROOMS**

*An analytical procedure based on the use of high-performance liquid chromatography was applied for the determination of vitamin D₂ in mushrooms. The detection limit was 0,027ppm and quantification limit was 0,083ppm. The recovery of vitamin D₂ was 87%. The method is applicable for establishing data for some mushrooms. White BeechMushrooms (*Hypsizygus tessellatus*), king trumpet mushroom (*Pleurotus eryngii*), Enokitake (*Flammulina velutipes*) were irradiated with pulsed ultraviolet UV light. Irradiation of each side of the mushrooms for 6h, was found to be the optimum period of irradiation in this conversion. The highest vitamin D₂ content (43,5µg/100g mushroom) was observed in king trumpet mushroom irradiated with pulsed ultraviolet UV light at 6h.*

Keywords: *mushrooms, vitamin D₂, ergocalciferol, pulsed ultraviolet UV light, food analysis.*

1. MỞ ĐẦU

Vitamin D có vai trò quan trọng trong đời sống con người. Thiếu vitamin D gây nên bệnh còi xương ở trẻ em, loãng xương và làm tăng nguy cơ gãy xương ở người cao tuổi. Vitamin D là vitamin tan trong chất béo mà con người tạo ra trong da khi tiếp xúc với tia cực tím ($\lambda = 290-315\text{nm}$) hoặc được bổ sung qua

con đường ăn uống. Nhóm vitamin D gồm từ D₂ đến D₇, song quan trọng nhất là D₃ (cholecalciferol) và D₂ (ergocalciferol). Các nghiên cứu cho thấy ngoài các nguồn từ động vật như trứng, sữa, thịt, cá .v.v.. nấm cũng là một nguồn cung cấp vitamin D quan trọng [4].

Điều đặc biệt là sự hình thành vitamin

D ở nấm diễn ra trong ánh sáng mặt trời. Do đó các nghiên cứu cho thấy hàm lượng vitamin D trong nấm tự nhiên cao. Rõ ràng sự gia tăng hàm lượng vitamin D trong nấm sau khi thu hoạch nếu phơi dưới ánh nắng mặt trời hoặc chiếu đèn tử ngoại sẽ là những cơ sở khoa học định hướng để nâng cao hàm lượng vitamin D trong sản xuất và chế biến các sản phẩm từ nấm, khi mà việc nuôi trồng diễn ra trong điều kiện nuôi nghiêm ngặt ít ánh sáng, và việc sấy sản phẩm thường được thực hiện trong lò sấy.

Có nhiều phương pháp phân tích vitamin D như thử nghiệm sinh học, quang phổ[3], xét nghiệm miễn dịch [8] và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [1,2]. Trong các phương pháp kể trên, do có độ nhạy và tính chọn lọc cao, nên HPLC hiện là phương pháp thông dụng nhất trong nghiên cứu phân tích vitamin D. Chính vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xác định hàm lượng vitamin D₂ trong một số loại nấm nuôi trồng thu mua trên địa bàn thành phố Vinh, Nghệ An bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, đầu dò UV và bước đầu nghiên cứu làm giàu vitamin D₂ trong nấm dưới tác dụng của ánh sáng mặt trời và dưới tác dụng của đèn tử ngoại UVB.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống HPLC Agilent 1100 Series với đầu dò UV; cột tách phân tích Hypersil AA-ODS 2.1mm, máy quang phổ UV – Vis 8453(Agilent); máy cất quay chân không: IKA® RV10 digital; máy siêu âm Ultrasonic LC 60H; Đèn UVB Exo –Terra 200; máy nghiền thực phẩm, máy Vortex IKA- made in USA; cân phân tích độ chính xác ±0,01mg; đầu lọc mẫu 0,45µm của Agilent. Các dụng cụ như: bình định mức 5ml; 10ml; 100ml. Pipet 1ml; 2ml; 5ml; 10ml;

pipet tự động định mức 10µl, 100µl, 1000µl; bình đáy tròn 250ml, 500ml và các dụng cụ thủy tinh khác.

2.2. Hóa chất

Các hóa chất: metanol, hexan, axit ascorbic thuộc loại tinh khiết phân tích dùng cho HPLC (Merck); etanol 96⁰, KOH, NaOH; dietyl ete tinh khiết PA (Trung Quốc); chất chuẩn vitamin D₂ 100mg của Supelco (Mỹ).

2.3. Chuẩn bị mẫu phân tích

5 mẫu nấm nuôi trồng bao gồm thủy tiên trắng (*Hypsizygus tessellatus*), đông cô (*Lentinula edodes*), đùi gà (*Pleurotus eryngii*), nấm sò (*Pleurotus ostreatus*) và mộc nhĩ (*Auricularia auricula-judae*) được thu mua trên địa bàn thành phố Vinh. Đối với các mẫu nấm thủy tiên trắng, đùi gà và đông cô đem phơi nắng và chiếu xạ sau khi rửa sạch, chia ra nhiều phần khác nhau và đem phơi dưới ánh nắng mặt trời hoặc đem chiếu trong phòng tối bằng đèn tử ngoại UVB Exo –Terra trong thời gian 2h, 6h, 24h và 48h. Tất cả các mẫu sau đó được bảo quản trong tủ đông trước khi đem phân tích.

Hỗn hợp gồm 5 g mẫu đã được nghiền nhỏ đồng nhất, 4ml natri ascorbat (17,5g ascorbic + 100 ml NaOH 1M), 50ml etanol, 4g KOH. Cho vào bình cầu và trộn đều bằng máy vortex trong 30 phút, chuyển vào máy siêu âm, gia nhiệt (70⁰C) và siêu âm trong vòng 30 phút. Mẫu sau khi xà phòng hoá được làm nguội ở nhiệt độ phòng, thêm 50ml nước cất để ion và chiết 3 lần với 50ml hỗn hợp dietyl ete : hexan(1:3 v/v). Dịch chiết thu được chiết lại bằng KOH 3% pha trong etanol 5% sau đó rửa bằng nước để ion đến trung tính. Dịch chiết đem vào cô quay chân không sau đó tái hòa tan trong dung môi pha động CH₃OH, phối hợp với siêu âm để quá trình hòa tan được triệt để. Dung dịch

thu được lọc qua đầu lọc cỡ 45 μ m sau đó đem phân tích [4].

2.4. Phương pháp phân tích

Hàm lượng vitamin D₂ được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò UV. Các điều kiện tối ưu của phép ghi đo HPLC, khoảng nồng độ làm việc và đường chuẩn xác định hàm lượng vitamin D₂ được nghiên cứu, xác lập và xây dựng. Việc đánh giá phương pháp được tiến hành qua tính toán giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại của phép đo và hiệu suất thu hồi.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát các điều kiện phân tích tối ưu trên HPLC

3.1.1. Lựa chọn bước sóng tối ưu

Khảo sát phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch vitamin D₂ ở nồng độ 10 ppm. Sử dụng cuvet thạch anh và quy trình quét phổ tự động trong vùng bước sóng từ 190 nm - 400 nm. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy vitamin D₂ có độ hấp thụ quang cực đại ở bước sóng $\lambda_{\max}$ 265 nm. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ được ghi đo trên máy HPLC sử dụng đầu dò UV ở bước sóng $\lambda_{\max}$ = 265nm.

3.1.2. Lựa chọn tỷ lệ pha động

Khảo sát hệ pha động MeOH: H₂O ở các tỷ lệ khác nhau 100/0; 95/5; 90/10; 70/30 và ghi đo sắc phổ đồ dung dịch vitamin D₂ nồng độ 10 ppm với cột Hypersil AA-ODS 2.1mm, tốc độ dòng giữ cố định 0,5ml/phút. Từ những kết quả thu được chúng tôi lựa chọn pha động là CH₃OH 100% vì tại đó diện tích pic sắc đồ là lớn nhất và độ lặp lại tốt nhất.

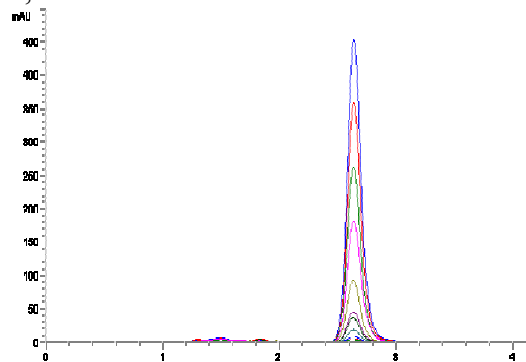
3.1.3. Lựa chọn tốc độ dòng và thể tích bơm

Những kết quả nghiên cứu lựa chọn tốc độ dòng và thể tích bơm với cột sắc ký

ở nhiệt độ 30⁰C cho thấy khi tốc độ dòng tối ưu là 0,5 ml/phút thì thể tích bơm 10 μ l là tốt nhất.

3.2. Xây dựng phương trình đường chuẩn

Tiến hành pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 0,4 – 50 ppm từ dung dịch chuẩn gốc vitamin D₂ 1000ppm. Tiến hành ghi sắc đồ với điều kiện đã khảo sát của các dung dịch chuẩn vừa pha. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy trong khoảng nồng độ trên có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic (hình 1) ở thời gian lưu t_r = 2,634.



Hình 1. Sắc đồ xếp chồng lên nhau của vitamin D₂ ở các nồng độ khác nhau.

Trong khoảng phụ thuộc tuyến tính chúng tôi đã tiến hành xây dựng đường chuẩn thể hiện sự phụ thuộc diện tích pic sắc đồ vào nồng độ vitamin D₂, phương trình đường chuẩn thu được:

$$Y = 77,31.C + 2,75; \quad R^2 = 0,9997.$$

Trong đó: Y là diện tích pic; C: nồng độ vitamin D₂

3.3. Đánh giá phương pháp phân tích

3.3.1. Độ lặp lại của phép đo trên dung dịch chuẩn

Để đánh giá độ lặp lại chúng tôi thực hiện ghi đo lặp lại liên tục 6 lần với một nồng độ chất chuẩn 20 ppm. Độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối theo nồng độ của mẫu là SD = 0,05 và RSD = 0,25%. Kết quả thu được cho thấy các phép ghi đo có độ lặp lại tốt.

3.3.2. Xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng(LOQ) của phương pháp

Các giá trị LOD và LOQ được xác định dựa theo phương trình đường chuẩn là $LOD = 0,027ppm$ và $LOQ = 0,083ppm$. Kết quả nghiên cứu thu được cho thấy phương pháp HPLC nghiên cứu xây dựng được có độ nhạy đạt yêu cầu để xác định chính xác hàm lượng vitamin D₂ trong nấm.

3.3.3. Xác định hiệu suất thu hồi

Hiệu suất thu hồi được xác định bằng cách tiến hành phân tích trên mẫu nấm thủy tiên trắng và mẫu có nạp thêm một lượng chất chuẩn chính xác. Tiến hành phân tích mẫu theo quy trình phân tích như trong mục 2.3. Kết quả thu được trong các mẫu có độ thu hồi trung bình là 87 % (nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp).

Bảng 1. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi vitamin D₂ trong mẫu nấm thủy tiên trắng

TT	Thể tích vitamin D ₂ 4ppm thêm chuẩn (ml)	Kết quả mẫu không thêm chuẩn (ppm)	Kết quả mẫu thêm chuẩn (ppm)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hiệu suất trung bình (%)
1	1,00 ml	0,12	0,79	83,8	87,1
2	1,00 ml		0,82	87,5	
3	1,00 ml		0,84	90,0	

3.4. Xác định hàm lượng vitamin D₂ trong một số mẫu nấm

3.4.1. Hàm lượng vitamin D₂ trong một số mẫu nấm

Các mẫu nấm sau khi được xử lý đem đi phân tích xác định hàm lượng vitamin D₂ trên máy HPLC với các điều kiện tối ưu như đã nghiên cứu và tính toán theo phương pháp đường chuẩn. Kết quả phân tích thu được cho thấy hàm lượng vitamin D₂ trong các loại

nấm khác nhau dao động khá lớn từ 2-14 µg/100g nấm (bảng 2)

Bảng 2. Hàm lượng vitamin D₂ trong một số mẫu nấm

TT	Mẫu nấm	Hàm lượng vitamin D ₂ (µg/100g nấm)	Hàm lượng vitamin D ₂ (IU / 100g nấm)
1	Nấm sò	8,5	340
2	Nấm đông cô	2,4	96
3	Nấm Đùi gà	13,4	536
4	Nấm Thủy tiên trắng	6	240
5	Mộc nhĩ	7	280

3.4.2. Khảo sát khả năng làm tăng vitamin D₂ trong nấm bằng đèn tử ngoại UVB.

Tiến hành phân tích khảo sát 3 mẫu nấm (đông cô, đùi gà và thủy tiên trắng) sau khi được chiếu bằng đèn tử ngoại UVB Exo –Terra trong thời gian khác nhau, kết quả cho thấy có sự gia tăng hàm lượng vitamin D₂ trong nấm sau khi chiếu bằng đèn UVB Exo –Terra, cao nhất tương ứng với thời gian chiếu đèn UVB là 6h. Sự gia tăng này được giải thích bởi quá trình tổng hợp vitamin D₂ trong nấm từ estogsterol (có hàm lượng đáng kể trong nấm) dưới tác dụng của tia UV (chủ yếu là nhờ tia UVB). Tuy nhiên khi phơi bằng ánh sáng mặt trời thì hàm lượng ít hơn so với chiếu bằng đèn tử ngoại (so sánh với mẫu nấm thủy tiên trắng) (bảng 3). Đồng thời thời gian quá dài thì hàm lượng có giảm đi, điều này có thể giải thích là có sự phân hủy hàm lượng vitamin D theo thời gian. Kết quả phân tích cho thấy có thể gia tăng hàm lượng vitamin D₂ trong nấm sau thu hoạch bằng chiếu tia tử ngoại thích hợp, từ đó góp phần tăng giá trị dinh dưỡng của sản phẩm.

Bảng 3. Hàm lượng vitamin D₂ trong một số mẫu nấm chiếu tia UV

TT	Mẫu nấm	Hàm lượng theo thời gian chiếu đèn UVB (µg / 100g nấm)			
		0h	2h	6h	24h
1	Nấm đông cô	2,4	5	25	26
2	Nấm Thủy tiên trắng	6	19	40,5	20
3	Nấm đùi gà	13,4	15,5	43,5	40
		Hàm lượng theo thời gian phơi nắng (µg / 100g nấm)			
			2h	6h	24h
4	Nấm Thủy tiên trắng		9,5	11,5	10

4. KẾT LUẬN

- Đã nghiên cứu xây dựng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, detector UV xác định vitamin D₂ trong nấm. Phương pháp nghiên cứu xây dựng được có độ nhạy, độ chính xác cao và độ lặp lại tốt. Hàm lượng vitamin D₂ trong 5 mẫu nấm dao động từ 2-14 µg/100g nấm.

- Đã nghiên cứu chiếu tia tử ngoại bước đầu cho thấy có sự hàm lượng vitamin D₂ trong nấm nuôi trồng. Kết quả cho thấy hàm lượng vitamin D₂ tăng lên rõ rệt sau khi chiếu tia UV (dao động từ 2-40,5 µg/100g nấm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC 2002.05. (2002) *Determination of Cholecalciferol (Vitamin D₃) in Selected Foods Liquid – Chromatography*.
2. Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia;

TCVN 8973-2011. (2011) *Thực phẩm. Xác định vitamin D bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Xác định cholecalciferol (D₃) hoặc Ergocalciferol (D₂)* - Hà nội, Việt nam.

3. Jette Jakobsen, Pia Knuthsen. (2014) *Stability of vitamin D in foodstuffs during cooking*. Food Chem., 148170-175.

4. Maximilian W., Ulrich K. and Ralf G.B. (2013) *Single-run analysis of vitamin photoproducts in oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) after UV-B treatment*. J. of Food

Composition and Analysis 31 266–274.

5. Sundar R.K., Jeong S., Pang G., Teal A. and Biggs T. (2011) *Concentration of vitamin D₂ in white button mushrooms (Agaricus bisporus) exposed to pulsed UV light*. J. of Food Composition and Analysis 24 976–979.

6. Ulrich K., Ralf G.B. (2014) *Dynamics of sterols and fatty acids during UV-B treatment of oyster mushroom*. Food Chemistry 149 10–14.

7. Viraj J.J., Perera Conrad O. (2006) *Ultraviolet irradiation: The generator of Vitamin D₂ in edible mushrooms*. Food Chemistry 95 638–643.

8. Wendy L Arneson et al. (2013) *Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Level, Lab Medicine*, 44 (1) 38.