

**PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG VITAMIN A TRONG MỘT SỐ LOẠI NGŨ CỐC
CHẾ BIẾN Ở THÀNH PHỐ HUẾ VÀ MỘT SỐ VÙNG LÂN CẬN BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

Đến tòa soạn 27 - 06 - 2016

Ngô Văn Tứ, Lê Thị Như Ngọc
Trường Đại học Sư phạm – Đại học Huế

SUMMARY

**DETERMINATION OF VITAMIN A CONTENTS OF PROCESSED CEREALS
IN HUE CITY AND NEARLY AREAS BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

In this paper, we report the result of research and development analytical methods of vitamin A in processed cereals by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector (RF). The research results show that the determination is measured at 348 nm/370 nm wavelength, reversed phase C18 column (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), at room temperature, mobile phase: MeOH: H₂O (90:10 by volume), 20 μ L sample injection volume, flow rate 0.8 mL/min. The highly sensitive method good repeatability (RSD% < 2%, n = 8), low detection limit, LOD = 0.003 ppm. Between the concentration of vitamin A and peak area with good linear correlation in the range 0.05 ÷ 10.00 ppm with $R^2 = 0.9998$. Results of quality control methods on real samples showed that the method has a good right to withdraw from the 96 ÷ 101%.

1. MỞ ĐẦU

Vitamin là một nhóm chất hữu cơ có phân tử lượng tương đối nhỏ và có bản chất hoá học rất khác nhau, là nhóm chất rất cần thiết cho hoạt động sống của các cơ thể sinh vật. Vitamin A rất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển xương ở trẻ em, cho sự nhìn thấy (cụ thể trong ánh sáng hoàng hôn), cho sự nguyên vẹn bề mặt biểu mô và niêm mạc. Thiếu vitamin A có thể gây ra bệnh quáng gà, khô mắt, nhuyễn giác mạc và có thể gây mù, đặc biệt ở trẻ em. Ngoài ra, vitamin A còn có tác dụng chống ung thư chống lão hóa. [1], [2]

Tuy nhiên do Vitamin A hòa tan trong mô mỡ, việc thải lượng dư thừa từ ăn uống là khó khăn hơn so với các vitamin tan trong nước. Do vậy quá liều có thể dẫn đến ngộ độc Vitamin A. Nó có thể gây buồn nôn, vàng da, dị ứng, chứng biếng ăn, nôn mửa, nhìn mờ, đau đầu, tổn thương cơ và bụng, uể oải và thay đổi tính tình. [1]

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về vitamin A[5] trong thực phẩm [8], trong sữa tươi [9], trứng, cà rốt, ngũ cốc ... bằng nhiều phương pháp phân tích công cụ khác nhau như quang phổ hấp thụ phân tử UV – Vis, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)... Nhưng ở Việt Nam việc nghiên cứu xác định hàm lượng vitamin A trong ngũ cốc còn hạn chế, vẫn chưa được quan tâm đúng mức.

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu xác định hàm lượng vitamin A trong các mẫu ngũ cốc chế biến bằng HPLC, từ đó đưa ra điều kiện thích hợp để tiến hành phân tích vitamin A trong các loại ngũ cốc chế biến trên địa bàn thành phố Huế và một số vùng lân cận.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thuốc thử

Tất cả hóa chất đều là loại tinh khiết phân tích của hãng Merck: etanol 95%, axit acrobic, axit axetic, THF Tetrahydrofuran, metanol, hexan.

THF- ethanol (50+50) – (50mL tetrahydrofuran và 50mL ethanol 95%.)

Kali hydroxit 50%: thêm từ từ 500g KOH bột viên vào 500ml nước chứa trong bình có thể tích 1L.

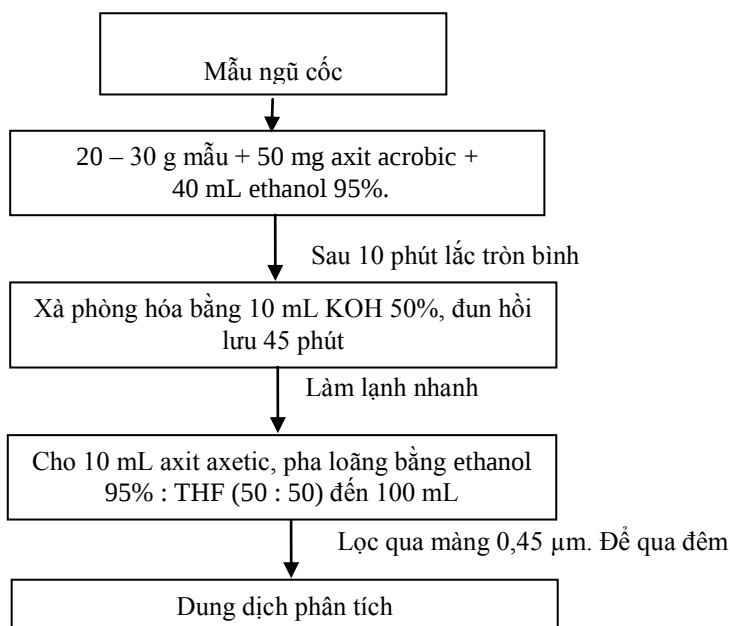
Chất chuẩn: Bộ y tế, viện kiểm nghiệm TPHCM, chất chuẩn đối chiếu: Retinyl palmitate $C_{20}H_{30}O$, số lô: QT 041:081111, hàm lượng: 1051600 IU/g

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Series 20A của hãng Shimadzu, Nhật Bản; cột sắc ký C18 (150 x 4,5 mm, 5 μ m) của hãng GL Sciences Inc, Nhật Bản.

Bộ lọc hút chân không của hãng Gast, Mỹ. Thiết bị lọc nước siêu sạch của hãng Barnstead International, USA. Tủ sấy của hãng Memmert. Màng lọc 0,45 μ m của hãng Sartorius Stedim, Đức.

2.2. Tiến trình phân tích

Xử lý mẫu theo AOAC 2001.13, được tóm tắt trong hình 2.1. Mẫu chuẩn và mẫu phân tích được xà phòng hóa bằng KOH trong nước, trung hòa, pha loãng chuyển đổi chất béo thành các axit béo và este retinol. [3]



Hình 2.1. Sơ đồ xử lý mẫu

Retinol được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector RF phát hiện ở bước sóng kích thích và phát xạ là 348 nm/470 nm, cột pha đảo C18.

Điều kiện sắc ký: nhiệt độ phòng, pha động là MeOH : H₂O (90: 10), thể tích tiêm mẫu 20 μ L, tốc độ dòng: 0,8 mL/phút, thời gian lưu 5,7 phút, ghi lại sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu phân tích.

Nồng độ vitamin được tính bằng cách so sánh diện tích pic của vitamin trong các mẫu phân tích với những mẫu tiêu chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Theo [4] để phát hiện và định lượng vitamin A sử dụng detector RF bước sóng kích thích và phát xạ được lựa chọn là (E_x/E_m) 348 nm/470 nm, chúng tôi cũng chọn bước sóng này để nghiên cứu.

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của pha động

Thành phần pha động được khảo sát bao gồm: methanol (MeOH): nước (H₂O). Chúng tôi tiến hành khảo sát các tỷ lệ pha động methanol : nước = (70:30); methanol : nước = (90:10); với dung dịch chuẩn vitamin A có nồng độ 5 ppm, tốc độ dòng 1 mL/phút; $V_{tiêm} = 20\mu$ L, kết quả thu được ở bảng 3.1

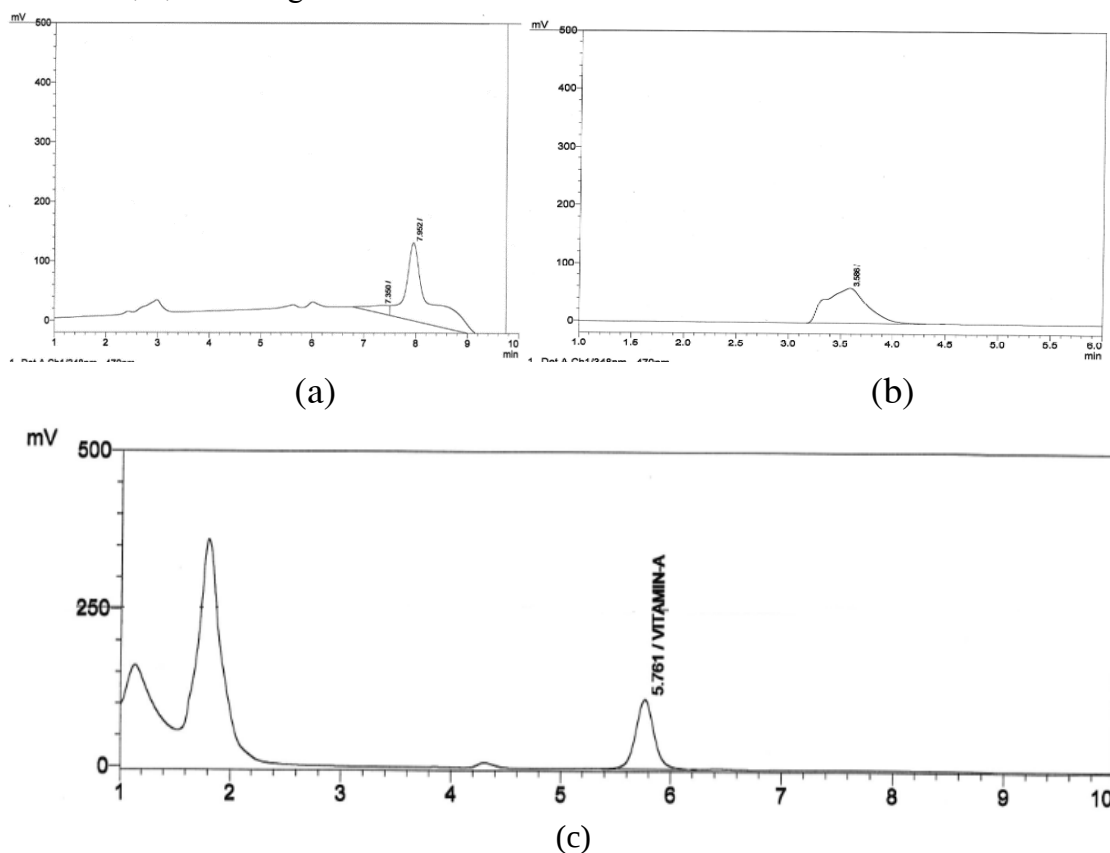
Bảng 3.1. Hệ số đối xứng peak với các tỷ lệ về dung môi pha động

Ký hiệu	Hệ dung môi	Tỷ lệ pha động	Hệ số đối xứng
(a)	Methanol : nước	70 : 30	1,600
(b)	Methanol : nước	90 : 10	1,118

Từ kết quả khảo sát cho phép chúng tôi chọn hệ dung môi pha động methanol : nước với tỉ lệ thể tích là 90 : 10

3.2. Khảo sát tốc độ dòng

Tiến hành khảo sát trên hệ dung môi pha động methanol : nước (90:10), với các tốc độ dòng 1,0 mL/phút; 0,8 mL/phút và 0,5 mL/phút. Kết quả được thể hiện qua các hình 3.1 a, b, c và bảng 3.2.



Hình 3.1. Sắc ký đồ của hệ pha động methanol : nước=(90:10) với các tốc độ : a. 1,2 mL/ph; b. 0,5 mL/ph; c. 0,8 mL/ph

Bảng 3.2. Các thông số cơ bản ở tốc độ dòng khác nhau (n=5)

Tốc độ dòng (mL/phút)	1,2 (a)	0,8 (c)	0,5 (b)
Các thông số			
Thời gian lưu t_R	3,586	5,761	7,952
Hệ số đối xứng S_a	1,111	1,072	1,725

Từ các sắc đồ cho thấy, trường hợp (c) có pic phân tích xuất hiện ở khoảng thời gian không quá dài (5,7 phút), hiệu quả tách tốt, pic thu được cân đối, nhọn đẹp, có cường độ tín hiệu cao.

Qua kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách sắc ký, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện thích hợp để định lượng vitamin A bằng phương pháp HPLC với

cột C18, bước sóng kích thích và phát xạ 348 nm/470 nm, thể tích tiêm mẫu 20 µL, sử dụng hệ pha động methanol : nước = (90:10), tốc độ dòng 0,8 mL/phút để khảo sát các nội dung tiếp theo.

3.3. Tính tương thích của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm 6 lần mẫu vào hệ thống sắc ký HPLC ở điều kiện đã chọn và ghi diện tích pic thu được. Độ ổn định của hệ thống sắc ký được biểu thị bằng sai số tương đối (RSD%) của kết quả sau 6 lần tiêm mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Các thông số sắc ký của pic vitamin A

Hoạt chất	Lần đo	Thời gian lưu (t _R)	Diện tích pic	Hệ số đuôi
Vitamin A	1	5,790	1184794	1,041
	2	5,787	1191545	1,037
	3	5,804	1197186	1,038
	4	5,823	1203233	1,040
	5	5,836	1210824	1,035
	6	5,849	1217100	1,035
	TB RSD (%)	5,815 0,434	1200780 1,004	1,038 0,241

ĐKSK: Cột C18, Detector RF, bước sóng kích thích và phát hiện 348 nm/470 nm, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, dung môi pha động là MeOH : H₂O = 90 : 10, thể tích tiêm 20 µL.

Nhận xét:

- Thời gian lưu trung bình của pic vitamin A là 5,815 (RSD% = 0,434%) là khoảng thời gian thích hợp cho quá trình phân tích sắc ký.
- Diện tích trung bình của pic vitamin A là 1200780 (RSD% = 1,004%) Những kết quả trên cho thấy quy trình sắc ký mà chúng tôi xây dựng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định cho quá trình định lượng vitamin A. [5]

3.4. Thẩm định phương pháp xây dựng được

3.4.1. Khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng

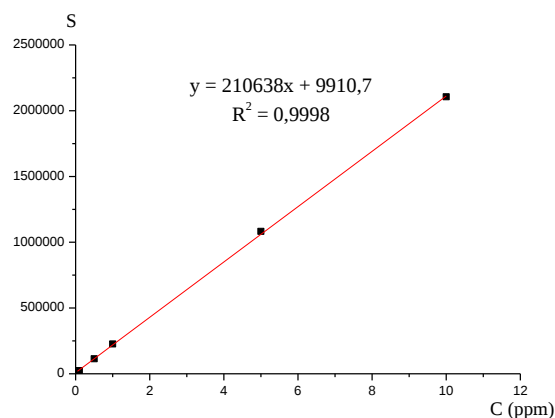
Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn vitamin A có nồng độ thay đổi trong khoảng 0,05 ÷ 10 ppm để khảo sát khoảng tuyến tính.

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ C (ppm)	0,05	0,1	0,5	1	5	10
Diện tích peak (S)	13174	23960	114074	226528	1082888	2105965

Từ kết quả thí nghiệm, xây dựng được khoảng tuyến tính như sau:

$$y = 210638x + 9910,7$$



Hình 3.2. Đường hồi qui tuyến tính.

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính giữa nồng độ các chất phân tích và diện tích pic có mối liên quan chặt chẽ, hệ số tương quan $R^2 = 0,9998$ trong khoảng nồng độ $0,05 \div 10$ ppm.

3.4.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp được xác định theo quy tắc 3σ và áp dụng hồi qui tuyến tính [10]. Đường hồi qui tuyến tính được xây dựng trong khoảng hẹp của nồng độ gần gốc tọa độ ($0,05 \div 1,00$ ppm). Kết quả được trình bày ở bảng 3.5

Bảng 3.5. Kết quả xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Nồng độ (ppm)	0,05	0,10	0,50	1,00
Diện tích peak	13174	23960	114074	226528
Phương trình hồi qui	$224797x + 1705,3$			

LOD = 0,003 ppm và LOQ = 0,099ppm

3.4.3. Xác định độ lặp lại của phương pháp

Để khẳng định khả năng áp dụng phương pháp HPLC vào phân tích hàm lượng vitamin A trong mẫu thực tế, cần đánh giá qua độ lặp lại và độ đúng.

Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp phân tích bằng cách tiến hành phân tích lặp lại 8 lần trên cùng một mẫu chất. Lấy 30 g mẫu ngũ cốc chế biến có hàm lượng 0,478 ppm/100g, tiến hành xử lý theo sơ đồ 2.1. Kết quả được trình bày ở bảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát độ lặp lại trên mẫu ngũ cốc

Diện tích	108333,875
Nồng độ (ppm)	0,467
RSD (%)	2,347
$\frac{1}{2}.RSD_{Horwitz}$	8,935

Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy: phương pháp đạt được độ lặp lại tốt qua 8 lần phân tích. Người ta thừa nhận, khi xác định những nồng độ C bất kỳ nếu đạt được RSD không vượt quá $0,5.RSD_{Horwitz}$ là đạt yêu cầu. ($RSD_{Horwitz}$ là độ lệch chuẩn tương đối tính

toán được từ phương trình Horwitz: $RSD_{Horwitz} = 2^{1-0,5\log C}$ với C là nồng độ biểu diễn bằng phân số [7], [10]. Như vậy, cỡ nồng độ 0,478 ppm nếu $RSD \leq 8,9\%$ là đạt yêu cầu.

3.4.4. *Xác định độ đúng của phương pháp*

Phương pháp HPLC cũng đạt độ đúng tốt khi phân tích mẫu thêm chuẩn với độ thu hồi từ $91 \div 100\%$.

Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Tiến hành thêm ở ba mức 0,400 ppm; 0,500 ppm; 0,600 ppm chất chuẩn vitamin A vào vào mẫu ngũ cốc chế biến có nồng độ ban đầu 0,478 ppm, ứng với mỗi mức thêm, làm 3 thí nghiệm đo kết quả ba lần lấy giá trị trung bình. Kết quả được trình bày trong bảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát độ đúng trên mẫu ngũ cốc chế biến (n=3)

Mẫu	Nồng độ ban đầu C ₀ (ppm)	Nồng độ thêm vào C ₁ (ppm)	Nồng độ tìm thấy C ₂ (ppm)	Tỷ lệ thu hồi Rev (%)	1/2.RSD _{Horwitz} (%)	Kiểm tra
1	0,478	0,400	0,886	100,90	9,18	Đạt
2		0,500	0,957	97,85	8,88	Đạt
3		0,600	1,035	96,01	8,64	Đạt

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy: phương pháp đạt được độ đúng tốt với độ thu hồi nằm trong khoảng từ 96% - 101%, thỏa mãn hàm Horwitz. Chứng tỏ phương pháp phân tích xây dựng là hoàn toàn phù hợp để định lượng vitamin A trong mẫu sữa. [10]

3.5. **Xác định hàm lượng vitamin A trong các mẫu ngũ cốc trên địa bàn thành phố Huế và các vùng lân cận**

Qua khảo sát 05 mẫu ngũ cốc chúng tôi thu được kết quả hàm lượng vitamin A được trình bày như trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả phân tích hàm lượng vitamin A trong 05 mẫu ngũ cốc chế biến.

TT	Tên mẫu	Kết quả	Hàm lượng trên bao bì
		Vitamin A (UI/100g)	Vitamin A (UI/100g)
1	Sữa và yến mạch	529,41 ± 11,46	379 - 568
2	Ngũ cốc dinh dưỡng diabet	1480,46 ± 20,59	1200
3	Nutifood	981,93 ± 3,87	820
4	Nestle	1681,55 ± 19,38	1610
5	Quasure light	1191,81 ± 18,14	1167

Nhận xét: Từ kết quả phân tích 05 mẫu ngũ cốc chế biến chúng tôi nhận thấy 100% sản phẩm ngũ cốc chế biến đều chứa vitamin A ở hàm lượng gần với hàm lượng ghi trên bao bì sản phẩm mà nhà sản xuất đã công bố. Hàm lượng vitamin A trong mẫu ngũ cốc từ 529 - 1681 UI/100g.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng phân tích hàm lượng vitamin A trong các mẫu ngũ cốc là phương pháp có độ nhạy cao, giới hạn định lượng (LOQ) và giới hạn phát hiện (theo quy tắc 3 σ) LOD = 0,003 ppm, LOQ = 0,099 ppm; giữa nồng độ vitamin A và diện tích pic có tương quan tuyến tính tốt trong khoảng 0,05 ÷ 10 ppm với $R^2 = 0,9998$.

Kết quả kiểm tra chất lượng của phương pháp trên mẫu thực tế cho thấy phương pháp đạt được độ lặp lại tốt với RSD% < 2%, n = 8, độ đúng tốt với độ thu hồi từ 96 ÷ 101%.

Có thể sử dụng quy trình phân tích này để xác định hàm lượng vitamin A trong các mẫu ngũ cốc. Kết quả phân tích 5 mẫu ngũ cốc có bổ sung vitamin A, chúng tôi nhận thấy 100% sản phẩm có hàm lượng vitamin A gần đúng hàm lượng ghi trên bao bì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phan Đình Châu, *Hóa dược và kỹ thuật tổng hợp 1*, NXB Khoa học và kỹ thuật.
- [2] Hóa dược - dược lý, *sách đào tạo dược sĩ trung học*, NXB Y học.
- [3] AOAC official method 2001.13, *Determination of Vitamin A (retinol) in Foods by Liquid Chromatography First Action 2001*.
- [4] Collins CA, Chow CK (1984), "Determination of vitamin A and vitamin A acetate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", <http://europepmc.org>, 1984 December 28.
- [5] Dennis Eriksen(2008), *Vitamin A determination by HPLC*, Code: 10002-01.
- [6] H. Faulkner, A. Hussein, M. Foran, and L. Sziarto, *A Survey of Vitamin A and D Contents of Fortified Fluid Milk in Ontario*, Laboratory Services Division, University of Guelph, Guelph, ON, Canada N1H 8J7, Journal of Dairy Science Vol. 83, No. 6, 2000
- [7] Horwitz W., Albert R., *The Concept of Uncertainty as Applied to Chemical Measurement*, Analyst 122, (1997), 615-617.
- [8] Jonathan W. Devries and Karlene R. Silvera (2002), *Determination of Vitamins A (Retinol) and E (alpha-Tocopherol) in Foods by Liquid Chromatography: Collaborative Study*.
- [9] Manuela Strobel, Felix Heinrich, Hans K. Biesalski (2000), *Improved method for rapid determination of vitamin A in small samples of breast milk by high-performance liquid chromatography*, Department of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, Fruwirthstrasse 12, D-70593 Stuttgart, Germany.
- [10] Miller J. C. and Miller J. N. (1988), *Statistics For Analytical Chemistry- second edition*, Ellis Horwood Limited, John Wiley and Sons, England.