

ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN B6 TRONG GIẤM CHUỐI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

DETERMINATION OF VITAMIN B6 IN BANANA VINEGAR
BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Nguyễn Mạnh Hà*, Trần Quang Hải, Nguyễn Thế Hữu,
Nguyễn Đức Hải, Nguyễn Thị Thoa, Nguyễn Quang Tùng

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã được thực hiện để định lượng vitamin B6 tan trong nước, một loại vitamin có trong giấm chuối. Phương pháp phân tích vitamin B6 bởi HPLC được thiết lập thông qua các điều kiện: Column: ZORBAX XDB-C18; Detector: UV-DAD (210nm); Thể tích tiêm mẫu: 30 μ L; Pha động: methanol/ phosphate buffer solution pH = 2,5 (Sodium 1-hexanesulfonate 0,05M) = 38:62; Tốc độ dòng: 0,6 mL/phút. Phương trình hồi quy tuyến tính với hệ số $R^2 = 0,9998$ và giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) tương ứng là 0,015; 0,047mg/L. Phương pháp đã được áp dụng để định lượng vitamin B6 nhằm kiểm soát chất lượng của giấm chuối trong quá trình lên men giấm.

Từ khóa: Vitamin B6, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, giấm chuối, giới hạn định lượng.

ABSTRACT

Research has been done to quantify the water-soluble vitamin B6, a vitamin found in banana vinegra. The analysis method of vitamin B6 by HPLC is established by the following conditions: Column: ZORBAX XDB-C18; Detector: UV-DAD (210nm); Sample injection volume: 30 μ L; Mobile phase: methanol/phosphate buffer solution pH = 2.5 (Sodium 1-hexanesulfonate 0.05M) = 38:62; Flow rate: 0.6mL/min. The calibration curve was experimentally defined with regression coefficient $R^2 = 0.9998$ and limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) were 0.015, 0.047mg/L, respectively. The method has been applied to quantify vitamin B6 in order to control the quality of banana vinegar during the vinegar fermentation.

Keywords: Vitamin B6, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), banana vinegar, limit of quantification.

Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: nmhacnh@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/10/2019

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 25/11/2019

Ngày chấp nhận đăng: 24/6/2020

1. MỞ ĐẦU

Giấm được sản xuất từ quá trình lên men từ rượu hoặc từ nhiều loại nguồn nguyên liệu khác như gạo, nho, táo, củ cải đường, khoai tây, và một số loại khác trái cây nhiệt đới như dứa, chà là, cam, bưởi, hoặc chuối [1]. Ngoài thành phần chính là axit axetic, giấm sản xuất từ hoa quả còn có

thêm thành phần các chất dinh dưỡng khác như axit hữu cơ mạch ngắn; các axit amin; vitamin B1, B2, B6, B12; các nguyên tố kim loại vi lượng tùy thuộc vào từng loại hoa quả. Với các thành phần chất dinh dưỡng phong phú, giấm đã được sử dụng nhiều trong đời sống con người. Trong thực phẩm, giấm được dùng làm chất điều vị, tạo hương và bảo quản. Trong y học, giấm có tác dụng điều hòa huyết áp [2], đái tháo đường [3], kích thích sự thèm ăn, tiêu hóa và hấp thụ canxi [4].

Quả chuối chín là một trong những loại quả phổ biến ở Việt Nam, với thành phần dinh dưỡng phong phú carbohydrat, đường, các khoáng chất kali, sắt, magie, kẽm, vitamin C. Chuối chín còn chứa hàm lượng cao vitamin B6 giúp chống nhiễm trùng và rất cần thiết cho việc tổng hợp heme trong cơ thể người [5]. Bởi vậy, chuối chín được xem là nguồn nguyên liệu chất lượng để sản xuất giấm chuối. Việc kiểm soát thành phần chất dinh dưỡng, khoáng chất, đặc biệt là vitamin B6 trong quá trình lên men giấm là cần thiết.

Các kỹ thuật định lượng vitamin B6 dựa trên các phương pháp như quang phổ UV-Vis [6], phương pháp điện hóa [7],... Phương pháp sử dụng phổ biến hiện nay là phương pháp HPLC pha đảo với các detector phát hiện huỳnh quang (FLD) và quang phổ diot mảng (UV-DAD) được dùng để định lượng vitamin B6 trong các đối tượng như ngũ cốc [8], thực phẩm nguồn gốc động vật, thực vật [9, 10], thực phẩm chức năng [11], dược phẩm [12]. Trong bài báo này, vitamin B6 trong giấm chuối được định lượng bằng phương pháp HPLC pha đảo sử dụng đầu dò UV-DAD nhằm đánh giá thành phần dinh dưỡng trong quá trình lên men giấm tại phòng thí nghiệm.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị

Các hóa chất sử dụng CH₃OH 99,99%, H₃PO₄ 85%, NaH₂PO₄ 99,99%, Sodium 1-hexanesulfonate monohydrate $\geq 99\%$, có nguồn gốc từ Merck (Đức). Chất chuẩn vitamin B6 được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Nước cất để ion tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội.

Máy HPLC 1260 - Agilent Technologies (Mỹ) tại Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội.

2.2. Dung dịch đệm photphat pH = 2,5 chứa sodium 1-hexanesulfonate 0,05M

Dung dịch đệm phosphate pH = 2,5 chứa sodium 1-hexanesulfonate 0,05M được chuẩn bị như sau:

- Lấy 10mL natri 1-hexanesulfonate (dung dịch 0,5M) và 2,4g sodium dihydrogen phosphate khan, hòa tan trong nước cất để ion thành 1lít dung dịch 1

- Lấy 10mL natri 1-hexanesulfonate (dung dịch 0,5M) và 2,31g acid phosphoric 85% hòa tan trong nước cất để ion thành 1lít dung dịch 2

- Trộn dung dịch 1 với dung dịch 2 thu được dung dịch đệm phosphate pH = 2,5 chứa sodium 1-hexanesulfonate 0,05M. Đem lọc dung dịch qua bộ lọc chân không thủy tinh với màng lọc PTFE 0,45µm, dung dịch sử dụng cho pha động chạy HPLC.

2.3. Dung dịch chuẩn vitamin B6

Dung dịch gốc chuẩn vitamin B6 nồng độ (100mg/L) thu được bằng cách hòa tan 0,1g vitamin B6 trong nước cất để ion và bình định mức 100mL. Các dung dịch chuẩn làm việc (0,1 - 1 mg/L) được chuẩn bị từ dung dịch gốc bằng cách pha loãng và định mức bằng hỗn hợp dung dịch pha động.

2.4. Chuẩn bị mẫu phân tích

Mẫu phân tích được chuẩn bị như sau: 2mL giấm chuối, rồi định mức thành 10mL bằng hỗn hợp pha động, sau đó hỗn hợp được rung trong bể siêu âm 15 phút. Dung dịch được lọc qua đầu lọc PTFE 0,45µm trước khi được tiêm vào hệ thống HPLC.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

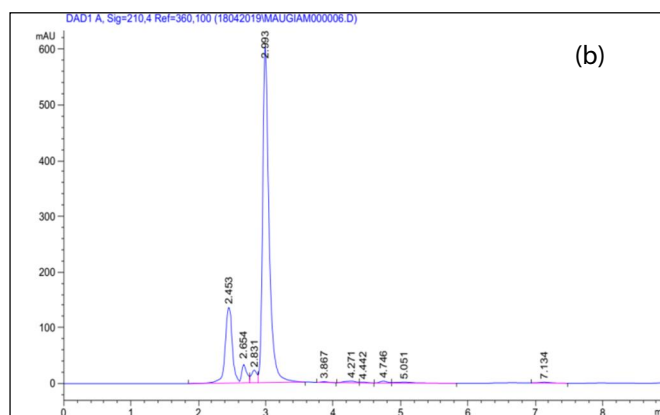
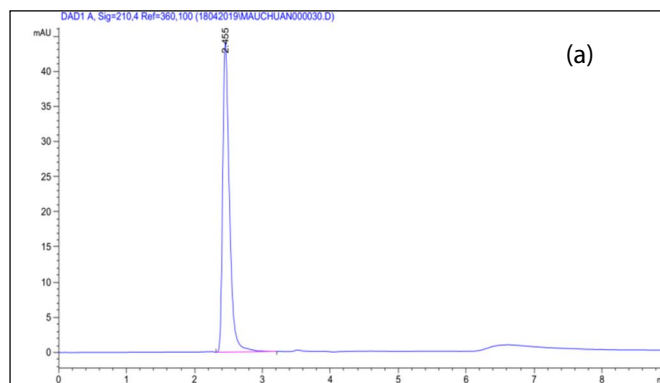
3.1. Kiểm tra phương pháp định lượng vitamin B6 bằng HPLC

3.1.1. Các điều kiện sắc ký

Tỉ lệ thành phần dung môi pha động có ảnh hưởng lớn đến quá trình rửa giải các chất mẫu ra khỏi cột. Tỉ lệ thành phần dung môi thay đổi dẫn đến làm thay đổi khả năng phân tách của các chất trong hỗn hợp. Theo tài liệu tham khảo [11, 12] và qua khảo sát sơ bộ, chúng tôi lựa chọn và tiến hành thực hiện HPLC ở các điều kiện sau:

- Pha động: Methanol/dung dịch đệm phosphate pH = 2,5 (sodium 1-hexanesulfonate 0,05M) = 38:62.
- Cột: ZORBAX XDB-C18.
- Tốc độ dòng: 0,6mL/phút.
- Detector: UV-DAD, bước sóng 210nm.
- Thể tích bơm mẫu: 30µL.
- Nhiệt độ cột: 30°C

Kết quả sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu giấm hình 1 cho thấy, thời gian lưu của vitamin B6 trên mẫu giấm (hình 1b) tương đương với mẫu chuẩn (hình 1a) khoảng 2,453 phút, đồng thời pic của vitamin B6 tách tương đối rõ ràng với các chất khác có trong mẫu giấm. Như vậy, các điều kiện sắc ký đã lựa chọn có thể dùng để định tính, định lượng vitamin B6 trong mẫu giấm.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của vitamin B6 trong mẫu chuẩn (a), mẫu giấm chuối (b)

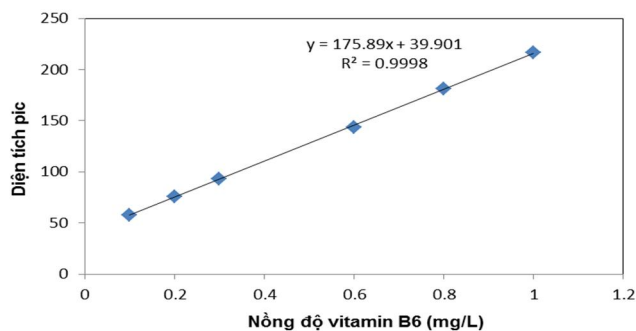
3.1.2. Đường chuẩn

Đường chuẩn được biểu diễn bằng đồ thị sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B6 thông qua các mẫu vitamin B6 chuẩn có nồng độ lần lượt là: 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; 0,8; 1mg/L. Từ kết quả trên hình 2 cho thấy:

Phương trình hồi quy là: $y = 175,89x + 39,901$ với hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9998$.

Trong đó: y là diện tích pic và x là nồng độ vitamin B6

Với hệ số tương quan tuyến tính $0,995 < R^2 = 0,9998 < 1$, cho thấy đường chuẩn đã xây dựng đạt độ tuyến tính cao trong khoảng nồng độ từ 0,1 - 1,0mg/L, hoàn toàn có thể sử dụng để xác định hàm lượng vitamin B6 có trong mẫu.



Hình 2. Đường chuẩn của Vitamin B6

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

LOD và LOQ được xác định dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính: $y = ax + b$ như sau:

Giới hạn phát hiện (LOD):

$$LOD = \frac{3,3 \times S_y}{a} \tag{1}$$

Giới hạn định lượng (LOQ):

$$LOQ = \frac{10 \times S_y}{a} \tag{2}$$

Trong đó: S_y : độ lệch chuẩn của tín hiệu

a: hệ số góc trong phương trình hồi quy

Kết quả xác định giới hạn phát hiện LOD = 0,015mg/L, giới hạn định lượng LOQ = 0,047mg/L (bảng 1).

Bảng 1. LOD, LOQ của phương pháp định lượng Vitamin B6

Chất	DAD (nm)	Độ lệch chuẩn (S_y)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Vitamin B6	210	0,826	0,015	0,047

3.1.4. Độ đúng

Độ đúng được xác định bằng cách định lượng mẫu chuẩn có nồng độ 0,2mg/L, đem phân tích mẫu chuẩn với 6 lần đo trong các điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả được trình bày ở bảng 2, cho thấy giá trị độ lệch chuẩn tương đối của mẫu chuẩn đạt RSD% = 1,6%, nên phương pháp phân tích đạt độ đúng theo AOAC.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đúng

Mẫu chuẩn	Nồng độ chuẩn thực tế (mg/L)	Nồng độ trung bình xác định được (mg/L)	RSD (%)
Vitamin B6	0,2	0,199	1,6

3.2. Hàm lượng vitamin B6 trong giấm chuối

Sau khi đánh giá phương pháp phân tích, tiến hành định lượng vitamin B6 trong một số mẫu giấm chuối được lấy từ các thời điểm khác nhau trong quá trình lên men. Đem phân tích mẫu trên hệ thống HPLC với các điều kiện đã chọn, từ diện tích pic và phương trình đường chuẩn xác định hàm lượng vitamin B6, kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả hàm lượng vitamin B6 trong một số mẫu giấm chuối

Mẫu	Diện tích pic	Hàm lượng vitamin B6 tính theo đường chuẩn (mg/L)	Hàm lượng vitamin B6 trong giấm chuối (mg/L)
1	98,816	0,335	1,675
2	112,534	0,413	2,065
3	115,820	0,432	2,160
4	94,067	0,308	1,540
5	55,373	0,088	0,440

Các kết quả cho thấy, các mẫu phân tích đều lớn hơn giới hạn định lượng (LOQ) tính theo đường chuẩn và các mẫu đều xuất hiện sự có mặt của vitamin B6 với hàm lượng từ 0,044 - 2,160mg/L.

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu lựa chọn các điều kiện thích hợp cho phép đo HPLC xác định hàm lượng vitamin B6 với detector UV-DAD bước sóng 210nm, cột ZORBAX XDB-C18. Khoảng

tuyến tính đường chuẩn từ 0,1 - 1,0mg/L, hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9998$, giới hạn định lượng LOQ = 0,047mg/L. Đã định lượng vitamin B6 trong một số mẫu giấm chuối bằng phương pháp đã xây dựng nhằm kiểm soát chất lượng giấm trong quá trình lên men.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Ould El., Hadj M. D., Sebihi A. H., Siboukeur O., 2001. *Qualité hygiénique et caractéristiques physico-chimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette de Ouargla*. Revue des Energies Renouvelables - Production et Valorisation-Biomasse, 87-92.

[2]. Kondo S., Tayama K., 2001. *Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry, 65, 2690-4.

[3]. Ostman E., Granfeldt Y., Persson L., Bjorck I., 2005. *Vinegar supplementation lowers glucose and insulin responses and increases satiety after a bread meal in healthy subjects*. European Journal of Clinical Nutrition, 59, 983-8.

[4]. B. Ndoye, S. Lebecque, R. Dubois-Dauphin, L. Tounkara, A.T. Guiro, C. Kere, B. Diawara, P. Thonart, 2006. *Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar*. Enzyme and Microbial Technology, 39, 916-923.

[5]. Pooja Saha, Soumitra Banerjee, 2013. *Optimization of process parameters for vinegar production using banana fermentation*. International Journal of Research in Engineering and Technology, 02, 501-514.

[6]. Mohamed AM, Mohamed HA, Abdel-Latif NM, Mohamed MR, 2011. *Spectrofluorimetric determination of some water-soluble vitamins*. J AOAC Int 94(6), 1758-69.

[7]. Solange M. Cottica, Jorge Nozaki, Helena S. Nakatani, Claudio C. Oliveira, Nilson E. de Souza, Jesui V. Visentainer, 2009. *Voltammetric determination of pyridoxine (vitamin B6) in drugs using a glassy carbon electrode modified with chromium(III) hexacyanoferrate(II)*. J. Braz. Chem. Soc, 20 (3), 496-501.

[8]. Suh JH, Yang DH, Lee BK, Eom HY, Kim U, Kim J, et al, 2001. *Simultaneous determination of B groupe vitamins in supplemented food products by high performance liquid chromatography-diode array detection*. J Bull Korean Chem Soc, 32(8), 2648-56.

[9]. Đinh Thị Trường Giang, 2015. *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)*. Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học - Tập 20, số 3, 324-330.

[10]. Tapan Seal, Kausik Chaudhuri, Basundhara Pillai, 2018. *A rapid high-performance liquid chromatography method for the simultaneous estimation of water-soluble vitamin in ten wild edible plants consumed by the tribal people of North-eastern Region in India*. Phcog Mag, 14, 72-77.

[11]. Seon Hee Kim, Jae-Hyun Kim, Hwa Jung Lee, Jae Myoung Oh, Sung Hye Lee, Kyeong Nyeo Bahn, Il Won Seo, Young Joo Lee, Jin Hee Lee, Tae Seok Kang, 2015. *Simultaneous Determination of Water Soluble Vitamins B Group in Health Functional Foods etc. by HPLC*. Journal of Food Hygiene and Safety, 30 (2), 143-149.

[12]. *Dược điển Việt Nam V, tập 1*. NXB Y học, trang 812-813, 2017.

AUTHORS INFORMATION

Nguyen Manh Ha, Tran Quang Hai, Nguyen The Huu, Nguyen Duc Hai, Nguyen Thi Thoa, Nguyen Quang Tung
Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry