

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN D₂ TỪ MỘT SỐ LOÀI NẤM LỚN Ở VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG SIÊU HIỆU NĂNG (UHPLC)

Hoàng Văn Trung, Nguyễn Văn Quốc, Hồ Xuân Thủy
Trường Đại học Vinh

Ngày nhận bài 24/4/2020, ngày nhận đăng 6/7/2020

Tóm tắt: Vitamin là những chất không sinh năng lượng nhưng không thể thiếu được đối với sự tồn tại và phát triển của cơ thể sống. Tất cả các quá trình sống gắn liền với sự trao đổi chất trong cơ thể có sự tham gia trực tiếp của vitamin. Trong bài báo này, chúng tôi đã khảo sát các điều kiện tối ưu, xác định hàm lượng vitamin D₂ bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UHPLC). Giới hạn phát hiện (LOD) là 0,0064 µg/g, giới hạn định lượng (LOQ) là 0,0195 µg/g. Độ lặp lại và độ thu hồi tốt phù hợp với yêu cầu đặt ra của AOAC. Quy trình phân tích đã được áp dụng để xác định hàm lượng vitamin D₂ trong một số loài nấm lớn ở vùng Bắc Trung Bộ với độ tin cậy cao. Kết quả phân tích thu được cho thấy hàm lượng vitamin D₂ trong các mẫu nấm từ 6,221-11,755 µg/g.

Từ khóa: *Ganoderma lucidum*; *Daldinia concentrica*; *Ganoderma applanatum*; *Ganoderma lobatum*; sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UHPLC); vitamin D₂.

1. Mở đầu

Vitamin D có vai trò quan trọng trong sự phát triển, hoàn thiện, duy trì sự ổn định của xương, răng, nó tham gia vào điều hòa chức năng của một số gen, ngoài ra còn tham gia một số chức năng như: bài tiết của insulin, hormon cận giáp, hệ miễn dịch, phát triển hệ sinh sản, giảm nguy cơ phát triển ung thư vú, đại tràng và tuyến tiền liệt. Thiếu vitamin D gây nên bệnh còi xương ở trẻ em, loãng xương và làm tăng nguy cơ gãy xương ở người cao tuổi, thai phụ có thể sinh con nhẹ cân, cùng sự tăng trưởng chậm của trẻ chào đời đủ tháng [1, 2]. Nhóm chất này gồm từ D₂ đến D₇, song quan trọng nhất là D₃ (Cholecalciferol) và D₂ (ergocalciferol).

Nấm là nguồn cung cấp vitamin D₂ tự nhiên. Hàm lượng vitamin D₂ trong nấm có thể tăng lên đáng kể nhờ chiếu xạ tia cực tím, khi đó ergocalciferol được hình thành từ ergosterol [3 - 6]. Các phân tích gần đây được tiến hành trên các loại nấm được lấy mẫu từ thị trường Mỹ cho thấy nồng độ vitamin D₂ từ 0,03 đến 63,2 mg/100g (1,2-2525 IU/100 g) trọng lượng tươi, với hàm lượng cao nhất trong nấm tiếp xúc với tia cực tím trong quá trình sản xuất [8]. Ergosterol cũng được tìm thấy trong nấm men và các loại nấm khác, do đó vitamin D₂ đã được sản xuất công nghiệp bằng cách chiếu xạ tia cực tím của nấm men [8].

Có nhiều phương pháp phân tích vitamin D₂ từ trước tới nay như phương pháp thử nghiệm sinh học, phương pháp quang phổ [2], phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [1]. Tuy nhiên, các tài liệu nghiên cứu cho thấy UHPLC là một điểm mới hiện nay cho phân tích các vitamin, nó được thông qua như là phương pháp chính thức nhờ khả năng phát hiện, tính chọn lọc cao. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu xác định vitamin D₂ từ một số loài nấm lớn ở Việt Nam bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UHPLC).

2. Thiết bị, hóa chất và nguyên vật liệu

2.1. Thiết bị

Hệ thống UHPLC Agilent 1290 Series với đầu dò DAD; Cột EC-C18 (100 × 2,1 mm, 2,7 μ m), của hãng Agilent; máy quang phổ UV - Vis 8453(Agilent); máy cất quay chân không IKA RV10 digital; máy siêu âm Ultrasonic LC 60H; đèn UV tổng hợp Extra (225 μ w/cm²); máy nghiền thực phẩm Vortex IKA-made in USA; cân phân tích độ chính xác 10⁻⁵ g; đầu lọc mẫu 0,22 μ m của Agilent.

2.2. Hóa chất

Tất cả các hóa chất sử dụng đều có độ tinh khiết phân tích (PA): etanol 96⁰, KOH, NaOH. Các hóa chất: metanol, hexan, axetonitril, axit ascobic, dietyl ete thuộc loại tinh khiết phân tích dùng cho HPLC (Merck); chất chuẩn vitamin D₂ (100mg) của Supelco (Mỹ).

2.3. Nguyên vật liệu

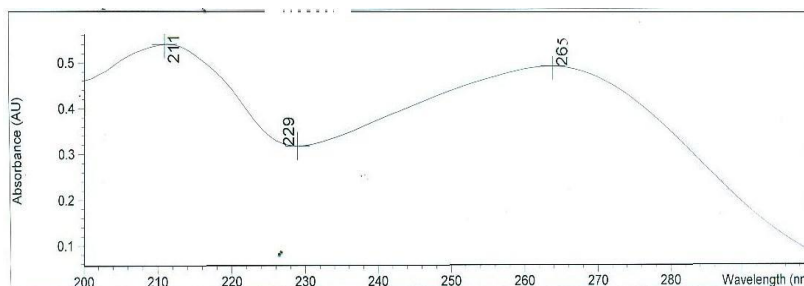
Các mẫu nấm VNTW660 (*Ganoderma lucidum*), VNTW661 (*Daldinia concentrica*), VNTW662 (*Ganoderma applanatum*), VNTW650 (*Ganoderma lobatum*) được thu hái ở Khu bảo tồn thiên nhiên Pù Huông, tỉnh Nghệ An vào tháng 8/2015. Mẫu khi lấy về được rửa sạch, để nơi thoáng mát hoặc sấy khô ở 40⁰C. Mẫu được định danh bởi PGS.TS Ngô Anh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Tiêu bản được lưu giữ tại Viện Công nghệ Hóa, Sinh và Môi trường, Trường Đại học Vinh.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Khảo sát các điều kiện tối ưu xác định vitamin D₂

3.1.1. Lựa chọn bước sóng tối ưu

Khảo sát phổ hấp thụ UV-VIS của dung dịch vitamin D₂. Sử dụng cuvet thạch anh và quy trình quét phổ tự động trong vùng bước sóng từ 190 nm đến 400 nm. Kết quả cho thấy vitamin D₂ có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 265 nm. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ được đo ở bước sóng 265 nm.



Hình 1: Phổ hấp thụ UV-VIS của vitamin D₂

3.1.2. Lựa chọn tỷ lệ pha động

Khảo sát hệ pha động MeOH:H₂O ở các tỷ lệ khác nhau 100/0; 90/10; 80/20; 70/30 và đo sắc ký với nồng độ vitamin D₂ 10ppm với cột C₁₈, chúng tôi lựa chọn pha động là MeOH 100% vì tại đó diện tích pic sắc ký lớn nhất, tín hiệu mạnh và độ lặp lại của phép đo tốt nhất.

3.1.3. Thời gian chiếu xạ

Hàm lượng vitamin D₂ trong 4 mẫu nấm chiếu xạ ở các thời gian khác nhau được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả khảo sát thời gian chiếu xạ

Mẫu nấm Thời gian	VNTW660 ($\mu\text{g/g}$)	VNTW661 ($\mu\text{g/g}$)	VNTW662 ($\mu\text{g/g}$)	VNTW650 ($\mu\text{g/g}$)
0h	3,385	5,856	4,553	1,594
3h	4,548	7,338	5,224	2,770
6h	2,157	3,494	3,101	2,250
12h	2,395	2,644	0,446	2,241

Từ kết quả trên bảng ta thấy hàm lượng vitamin D₂ trong các mẫu nấm tăng lớn nhất khi thời gian chiếu xạ là 3 giờ. Vì vậy chúng tôi chọn thời gian chiếu xạ cho các mẫu nấm phân tích là 3 giờ.

3.1.4. Điều kiện các thông số tối ưu cho quá trình sắc ký

Từ các kết quả nghiên cứu trên, có thể tóm tắt các thông số tối ưu cho quá trình chạy sắc ký như sau:

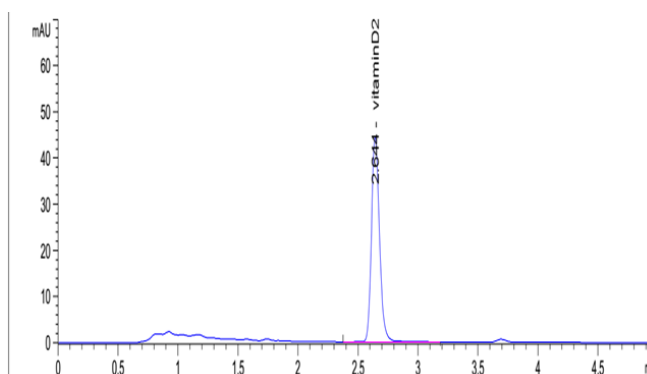
- Cột C18 (100 × 2,1 mm; 2,7 μm)
- Pha động 100% MeOH
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μl
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Bước sóng đầu dò DAD đo ở 265 nm
- Nhiệt độ cột: 30⁰C.

3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

3.2.1 Xây dựng đường chuẩn, xác định LOD, LOQ

Trước khi tiến hành phân tích với các mẫu nấm, tiến hành lập đường chuẩn cho vitamin D₂ có nồng độ từ 0,25 ppm - 100 ppm với các điều kiện tối ưu đã khảo sát ở trên. Kết quả khảo sát cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak tương ứng.

Phương trình đường chuẩn cho phép xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng vitamin D₂ lần lượt là 0,0064 $\mu\text{g/g}$ và 0,0195 $\mu\text{g/g}$.



Hình 2: Sắc ký đồ chuẩn vitamin D₂ nồng độ 20 ppm

Bảng 2: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Nồng độ (ppm)	0,25	0,5	5	10	20	100
Diện tích peak	10,311	52,197	261,186	513,050	1002,054	4762,750
Phương trình đường chuẩn:	$Y = 47.414X + 27.521$					$R^2 = 0.9999$
LOD ($\mu\text{g/g}$):	0,0064		LOQ ($\mu\text{g/g}$): 0,0195			

3.2.2. Đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi

Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi vitamin D₂ tại các nồng độ 5; 10; 20 ppm được trình bày trong Bảng 3 cho thấy tại các nồng độ khảo sát, RSD% của phương pháp nằm trong khoảng 0,72 - 1,03; độ thu hồi nằm trong khoảng 96,92 - 98,79%, phù hợp với yêu cầu của AOAC. Điều này chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại cao và độ thu hồi tốt.

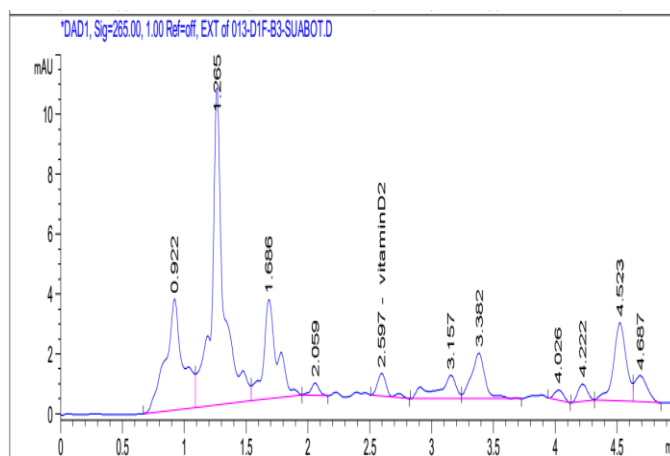
Bảng 3: Kết quả xác định độ lặp lại và độ thu hồi vitamin D₂

C ($\mu\text{g/ml}$)	5	10	20
RSD%	1,03	0,97	0,72
H%	96,92	98,14	98,79

3.3. Xác định hàm lượng vitamin D₂ trong mẫu nấm

Các mẫu nấm được nghiền nhỏ, đem chiếu xạ bằng đèn UV tổng hợp Extra trong vòng 3 giờ [3]. Cân 5 - 10g mẫu nấm + 4ml natri ascobat trong kiềm, 50ml etanol, 4 - 5 g KOH. Cho vào bình cầu và vortex trong 30 phút. Cho vào máy siêu âm, gia nhiệt (70⁰C) và siêu âm trong vòng 30 phút. Mẫu sau khi xạ phòng hoá được làm nguội ở nhiệt độ phòng, thêm 50ml nước cất đề ion và chiết 3 lần với 50ml hỗn hợp dietyl ete: hexan (1:3 v/v). Dịch chiết được chiết lại bằng dung dịch KOH 3% pha trong etanol 5%, sau đó được rửa bằng nước đề ion đến khi trung tính. Dịch chiết được đem cô quay chân không sau đó tái hòa tan trong dung môi pha động MeOH, phối hợp với siêu âm để quá trình hòa tan được triệt để. Dung dịch thu được được lọc qua đầu lọc cỡ 0,22 μm sau đó tiến hành đo lặp lại 3 lần trên hệ thống UHPLC và lấy giá trị trung bình.

Hàm lượng vitamin D₂ trong các mẫu thực phẩm được xác định với các điều kiện tối ưu và theo phương pháp đường chuẩn đã xây dựng ở mục 3.2.1. Các kết quả thu được được trình bày ở Bảng 4 và Hình 3.



Hình 3: Sắc ký đồ mẫu nấm VNTW660

Bảng 4: Hàm lượng vitamin D₂ trong một số mẫu nấm

	Mẫu nấm	Hàm lượng vitamin D ₂ (µg/g)
1	VNTW660 (<i>Ganoderma lucidum</i>)	10,885
2	VNTW661 (<i>Daldinia concentrica</i>)	6,221
3	VNTW662 (<i>Ganoderma applanatum</i>)	11,755
4	VNTW650 (<i>Ganoderma lobatum</i>)	10,385

Kết quả phân tích thu được cho thấy hàm lượng vitamin D₂ trong các mẫu nấm từ 6,221-11,755 µg/g.

4. Kết luận

Đã xác định được điều kiện tối ưu xác định vitamin D₂ bằng phương pháp UHPLC, cho giới hạn phát hiện (LOD) là 0,0064 µg/g, giới hạn định lượng (LOQ) là 0,0195 µg/g. Độ lặp lại thấp và độ thu hồi tốt phù hợp với yêu cầu của AOAC cho thấy phương pháp này là công cụ hữu hiệu để xác định vitamin D₂. Kết quả phân tích thu được cho thấy hàm lượng vitamin D₂ trong các mẫu nấm từ 6,221 - 11,755 µg/g, từ đó cho thấy hàm lượng vitamin D₂ trong các mẫu nấm lớn cao hơn so với các mẫu nuôi cấy và nấm ăn [3].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] AOAC 2002.05, *Determination of Cholecalciferol (Vitamin D3) in Selected Foods Liquid - Chromatography*, 2002.
- [2] Ashraf S., Husam S., Sufwan A., Emad S., Khaled E., Elsaid B., “Clinical, biochemical, and radiological manifestations of vitamin D deficiency in newborns presented with hypocalcemia”, *Ind. J. Endocrinol. Metabol.*, 17(4), 697-703, 2013.
- [3] Mai Thị Thanh Huyền, Đinh Thị Trường Giang, “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”, *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, Vol. 22, No. 3, 1-5, 2017.
- [4] Koyyalamudi S. R., Jeong S. C., Song C. H., Cho K. Y., Pang G, “Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation”, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 3351-3355, 2009.
- [5] Koyyalamudi S. R., Jeong S. C., Pang G., Teal A., Biggs T, “Concentration of vitamin D2 in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light”, *J. Food Comp. Anal.*, 24, 976-979, 2011.
- [6] Roberts J. S., Teichert A., McHugh T. H, “Vitamin D2 formation from postharvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage”, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4541-4544, 2008.
- [7] Teichmann A., Dutta P. C., Staffas A., Jagersta D. M, “Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effect of UV radiation”, *LWT-Food Sci. Technol.*, 40, 815-822, 2007.

- [8] Phillips K. M., Ruggio D. M., Horst R. L., Minor B., Simon R. R., Feeney M. J., Byrdwell W. C., Haytowitz D. B, “Vitamin D and sterol composition of ten types of mushrooms from retail suppliers in the United States”, *J. Agric. Food Chem*, 59, 7841-7853, 2011.
- [9] Sundar R. K., Jeong S., Pang G., Teal A. and Biggs T, “Concentration of vitamin D₂ in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) exposed to pulsed UV light”, *J. of Food Composition and Analysis*, 24, 976-979, 2011.

SUMMARY

DETERMINATION OF VITAMIN D₂ FROM HIGHER FUNGI IN VIETNAM BY ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC)

Vitamins are non-energy substances that are indispensable for the survival and development of organisms. All living processes associated with metabolism in the body are directly involved in the vitamin. In the present study, we determined optimal conditions to determine vitamin D₂ content by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC). The limit of detection (LOD) is 0.0064 µg/g, limit of quantification (LOQ) is 0.0195 µg/g. The precision and accuracy conforms to AOAC requirements. Thus, the method developed complies with international guides for the determination of vitamin D₂ from higher fungi in North Central Vietnam. The results of vitamin D₂ function analysis found in mushroom samples ranged from 6.221 - 11.755 µg/g.

Key words: North Central Vietnam; UHPLC; vitamin D₂.