

Ứng dụng phương pháp điện di mao quản trong kiểm soát chất lượng thực phẩm bổ sung amino axit mạch nhánh

Nguyễn Thanh Đàm, Vũ Minh Tuấn, Nguyễn Mạnh Huy,
Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt*

Phòng thí nghiệm trọng điểm về Công nghệ phân tích phục vụ Kiểm định môi trường và An toàn thực phẩm,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 28/6/2018; ngày chuyển phản biện 3/7/2018; ngày nhận phản biện 30/7/2018; ngày chấp nhận đăng 6/8/2018

Tóm tắt:

Các amino axit mạch nhánh (BCAA) gồm L-valine (Val), L-leucine (Leu) và L-isoleucine (Ile) là những amino axit thiết yếu, đóng vai trò quan trọng trong việc phát triển cơ bắp nên thường được bổ sung trong các loại thực phẩm dùng cho vận động viên, người tập thể hình. Nghiên cứu này trình bày việc ứng dụng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector đo độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) kết hợp với thiết kế thí nghiệm theo phương pháp mặt mục tiêu sử dụng mô hình lặp tâm (RSM-CCD) nhằm tối ưu hóa quy trình phân tích các BCAA trong thực phẩm bổ sung. Các điều kiện tối ưu được xác định bao gồm dung dịch điện ly nền (BGE) là dung dịch axit citric 1,11M, bổ sung polyethylene glycol (PEG) 2,32%, điện thế tách -16,9 kV và thời gian bơm mẫu 45 giây. Quá trình thẩm định quy trình được thực hiện thông qua việc xác định một loạt các thông số về giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), hệ số tương quan đường chuẩn (R²), độ đúng và độ chụm. Quy trình sau đó đã được áp dụng để phân tích 4 mẫu thật, kết quả cho thấy sự phù hợp tương đối tốt giữa hàm lượng BCAA đo được bằng CE-C⁴D với thông tin đưa ra từ nhà sản xuất.

Từ khóa: amino axit mạch nhánh, dinh dưỡng thể chất, điện di mao quản, kế hoạch hóa thực nghiệm.

Chỉ số phân loại: 2.4

Đặt vấn đề

Các amino axit mạch nhánh (BCAA) bao gồm L-valine (Val), L-leucine (Leu) và L-isoleucine (Ile) là các amino axit thiết yếu của cơ thể, thường được sử dụng nhiều trong sản xuất dược phẩm [1]. Trong lĩnh vực thực phẩm, các BCAA được sử dụng rộng rãi trong đồ uống thể thao và thực phẩm dinh dưỡng, bao gồm thực phẩm bổ sung dùng cho các vận động viên [2]. Trong thời gian gần đây, tại nước ta, xu hướng tập thể hình nhằm nâng cao sức khỏe và cải thiện vóc dáng đang rất phát triển, đặc biệt là trong giới trẻ. Với những lợi ích trong việc duy trì và xây dựng cơ bắp, các loại thực phẩm bổ sung BCAA cũng rất được ưu chuộng bởi những người tập thể hình. Rất nhiều sản phẩm bổ sung BCAA có mặt trên thị trường, bao gồm dạng viên nén, viên nang, dạng bột... Cùng với sự phát triển của thị trường tiêu thụ, các loại hàng giả, hàng nhái cũng bắt đầu xuất hiện. Bên cạnh đó, năng lực của người tiêu dùng trong nước chưa thật sự cao, công tác quản lý thị trường chưa thật sự tốt. Thực trạng này đặt ra yêu cầu cần thiết phải có các biện pháp nhằm kiểm soát chất lượng của

mặt hàng này. Việc xác minh hàng giả, hàng nhái, ngoài các biện pháp quản lý còn có thể được thực hiện thông qua xác định hàm lượng của các thành phần chính trong sản phẩm (như hàm lượng của Val, Leu và Ile). Tuy vậy, hiện nay trong nước chưa có các công bố về xác định hàm lượng các BCAA trong thực phẩm.

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu xác định hàm lượng của các amino axit trong thực phẩm nói chung và thực phẩm bổ sung nói riêng. Omar và cộng sự (2017) đã dùng thiết bị điện di mao quản (CE) kết hợp detector UV (CE-UV) để xác định 6 amino axit tự do (alanine, asparagine, glutamine, proline, serine và valine) trong thực phẩm với khoảng tuyến tính 2,5-40 mg/l [3]. Shigeki Akamatsu và cộng sự (2013) đã phân tích đồng thời 16 amino axit tự do (bao gồm valine, tổng leucine và isoleucine) trong thực phẩm chức năng sữa ong chúa với LOD từ 0,61-10,5 µg/g bằng CE ghép nối khối phổ (CE-MS) [4]. Dazhong Shen và cộng sự (2013) đã sử dụng CE kết hợp detector độ dẫn không tiếp xúc cộng hưởng vi phân (CE-DRC⁴D) để phân tích 10 amino axit (bao gồm

*Tác giả liên hệ: Email: vietph@vnu.edu.vn

Application of capillary electrophoresis in quality control of branched-chain amino acid supplements

Thanh Dam Nguyen, Minh Tuan Vu,
Manh Huy Nguyen, Hong Anh Duong, Hung Viet Pham*

VNU Key Laboratory of Analytical Technology for Environmental Quality and Food Safety Control (KLATEFOS), VNU University of Science, Vietnam National University (VNU), Hanoi

Received 28 June 2018; accepted 6 August 2018

Abstract:

Branched-chain amino acids (BCAAs) including L-valine (Val), L-leucine (Leu) and L-isoleucine (Ile) are essential amino acids, which play an important role in muscle development, and are often added in food for athletes or bodybuilders. This study presents the application of capillary electrophoresis using a contactless conductivity detector (CE-C⁴D) combined with the experimental design using the response surface methodology with central composite design (RSM-CCD) to optimize the analytical process of BCAAs in food supplements. The optimum conditions to be determined include the background electrolyte (BGE) as 1.11M citric acid solution added with 2.32% of PEG (m/v), -16.9 kV of applied voltage, and 45 seconds of injection time. Method validation is performed by defining limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity (R²), trueness, and precision. The procedure was used to analyse four of real samples, which showed a quite good fit between the BCAAs content measured with CE-C⁴D and the information provided by the manufacturers.

Keywords: branched-chain amino acids, capillary electrophoresis, design of experiments, physical nutrition.

Classification number: 2.4

valine và leucine) với LOD từ 0,1-0,4 μM [5]. Trong các nghiên cứu trên, chi nghiên cứu của Akamatsu bao gồm cả 3 amino axit mạch ngắn, trong đó không phân biệt leucine và isoleucine, kết quả đưa ra dưới dạng hàm lượng tổng của 2 amino axit này. Để tách biệt leucine và isoleucine, Ting Wang và cộng sự (2015) đã thực hiện dẫn xuất hoá bằng n-propyl clorofomat sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ 2 lần (HPLC-MS/MS) [6]. Đây là biện pháp tốn kém và khó thực hiện, yêu cầu trang thiết bị đắt tiền cũng như kỹ thuật cao.

Bên cạnh các phương pháp sắc ký truyền thống vốn có chi phí cao, CE với các ưu điểm như “xanh” hơn (ít sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại), chi phí thấp hơn là một phương pháp nhiều tiềm năng trong phân tích thực phẩm nói chung và kiểm soát chất lượng thực phẩm bổ sung BCAA nói riêng. Ứng dụng CE trong phân tích hàm lượng các BCAA, thông qua đó kiểm soát chất lượng mặt hàng thực phẩm bổ sung BCAA là một hướng đi mới, thiết thực và khả thi. Bài báo này trình bày những kết quả đạt được khi sử dụng CE-C⁴D kết hợp với kế hoạch hóa thực nghiệm theo phương pháp mặt mục tiêu sử dụng mô hình lặp tâm (RSM-CCD) để phát triển quy trình phân tích kiểm định hàm lượng BCAA trong thực phẩm bổ sung.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất

Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều có độ tinh khiết phân tích và được đặt mua từ Sigma-Aldrich, Đức hoặc Tokyo Chemical Industry, Nhật Bản, ngoại trừ axit lactic (Lac) từ Guangdong, Trung Quốc. Dung dịch chuẩn gốc riêng lẻ nồng độ 1000 mg/l của L-Valine (Val), L-Leucine (Leu) và L-Isoleucine (Ile) được sử dụng để pha chế các dung dịch chuẩn hỗn hợp các chất phân tích. Các hóa chất được sử dụng để chuẩn bị các dung dịch điện ly nền (BGE) bao gồm: axit acetic, axit lactic, axit citric, axit succinic và polyethylene glycol (PEG) 10000.

Thiết bị

Hệ điện di mao quản một kênh vận hành bằng tay được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm. Thiết bị này bao gồm một nguồn cao thế ± 30 kV (Spellman, Anh), bộ ghi dữ liệu e-corder (eDAQ, Úc) và detector C⁴D (eDAQ, Úc). Mao quản sử dụng trên thiết bị là mao quản silica nóng chảy (BGB Analytik AG, Switzerland) có đường kính trong 25 μm , chiều dài tổng 60 cm và chiều dài hiệu dụng là 49 cm. Trước khi sử dụng lần đầu hoặc khi có sự thay đổi về BGE, mao quản được xử lý bằng cách đẩy dung dịch NaOH 1M đi qua trong 10 phút, sau đó tới nước deion và cuối cùng là dung dịch BGE. Nước deion được tạo ra từ thiết bị Simplicity UV (Millipore, USA) được sử dụng để pha chế mọi dung dịch và pha loãng mẫu.

Lấy mẫu và xử lý mẫu

Trong nghiên cứu này, 4 sản phẩm thực phẩm bổ sung BCAA dạng bột đã được thu thập từ các cửa hàng chuyên cung cấp các sản phẩm cho người tập gym trên địa bàn thành phố Hà Nội. Các sản phẩm được ký hiệu như sau: M1 (Xtend BCAA 30 servings), M2 (Xtend Go BCAA 30 servings), M3 (On-Gold Standard BCAA 30 servings) và M4 (USN BCAA 30 servings). Từ mỗi sản phẩm này, lấy chính xác 0,5 gam mẫu, chuyển vào bình định mức 50 ml, thêm nước deion đến vạch và lắc kỹ. Pha loãng (125 lần) dung dịch thu được này với nước deion và lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,2 μm . Sau đó, 1 ml dung dịch sau khi lọc được sử dụng để bơm vào hệ CE-C⁴D. Để tránh sai số có thể mắc phải do sự trộn lẫn không đồng đều của sản phẩm (khối lượng cả sản phẩm khá lớn, còn khối lượng lấy mẫu tương đối nhỏ), mỗi sản phẩm được lấy mẫu 3 lần, mỗi lần được phân tích lặp 3 lần, kết quả thu được là giá trị trung bình giữa các lần lặp khác nhau. Dung dịch sau khi hòa tan (nhưng chưa pha loãng) của lần lấy mẫu đầu tiên đối với mỗi sản phẩm (ký hiệu là M1.1, M2.1, M3.1 và M4.1 tương ứng) được phân tích đồng thời bằng phương pháp CE-C⁴D và HPLC-DAD.

Khảo sát điều kiện phân tích ban đầu

Trước khi tiến hành tối ưu hóa bằng mô hình RSM-CCD, các khảo sát ban đầu được thực hiện bằng cách tối ưu từng nhân tố đơn lẻ nhằm xác định điểm ở tâm của mô hình cũng như khoảng biến thiên của các yếu tố cho phù hợp. Các điều kiện được khảo sát bao gồm: thành phần của BGE, nồng độ BGE, điện thế tách và thời gian bơm mẫu. Đối với thành phần BGE, 3 dung dịch axit ở hai nồng độ 0,5M và 1,0M đã được khảo sát, bao gồm: axit lactic, axit succinic và axit citric, mỗi dung dịch axit được bổ sung PEG nồng độ 2% (m/v) nhằm loại bỏ tương tác của nhóm silanol (-Si-OH) trên thành trong của mao quản với các amino axit.

Sau khi lựa chọn được thành phần BGE phù hợp, các yếu tố nồng độ axit (0,1÷1,5M), nồng độ chất hỗ trợ PEG (1÷4%), điện thế tách (-12÷-18 kV) và thời gian bơm mẫu (10÷60 giây) được khảo sát lần lượt nhằm tìm ra điều kiện phân tích tối ưu ban đầu. Các thông số được sử dụng để đánh giá các điều kiện phân tích bao gồm điện tích các peak và độ phân giải giữa hai peak cạnh nhau là Ile và Leu.

Tối ưu hóa điều kiện phân tích dựa trên RSM-CCD

Điều kiện phân tích tối ưu được xác định một cách chính xác hơn bằng cách sử dụng mô hình RSM-CCD với điểm ở tâm là điều kiện ban đầu đã tìm được. Mô hình xem xét sự ảnh hưởng của bốn yếu tố ảnh hưởng: nồng độ BGE (0,5÷1,5M), nồng độ PEG (1÷3%), điện thế tách

(-14÷-18 kV) và thời gian bơm mẫu (40÷60 giây); mỗi yếu tố được chia làm 5 mức độ (-2, -1, 0, +1, và +2). Theo đó, có tất cả 30 thí nghiệm cần tiến hành, bao gồm 16 thí nghiệm thuộc thiết kế yếu tố toàn phần, 8 thí nghiệm ở trục và 6 thí nghiệm ở tâm. Hàm mục tiêu được lựa chọn là độ phân giải giữa hai peak Ile và Leu với kỳ vọng độ phân giải càng lớn càng tốt. Bên cạnh đó, thời gian phân tích (tính theo thời gian xuất hiện của peak cuối cùng, Leu) cũng được sử dụng như một hàm mục tiêu thứ hai (tầm quan trọng thấp hơn) với yêu cầu thời gian di chuyển của Leu nằm trong khoảng 900-1200 giây.

Kết quả thu được từ mô hình được đánh giá thông qua p-value hoặc F-value đối với các kiểm định F-test và Lack of fit test, đồng thời giá trị của các hàm mục tiêu tại điều kiện phân tích tối ưu mà mô hình dự đoán cũng được kiểm tra để đảm bảo sự dự đoán của mô hình là phù hợp với thực tế.

Thẩm định phương pháp

Phương pháp phân tích được đánh giá thông qua một loạt các thông số: giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ tuyến tính (R^2), khoảng tuyến tính, độ đúng và độ chụm. Độ tuyến tính và khoảng tuyến tính được đánh giá thông qua đường chuẩn thu được khi phân tích lặp lại ba lần đối với ba chất phân tích ở 5 mức nồng độ 5; 10; 15; 20 và 25 mg/l. Độ chụm được xác định bằng độ lặp lại (trong ngày) và độ tái lặp (giữa các ngày khác nhau) dưới dạng độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích peak và thời gian di chuyển. Độ lặp lại (n=10) thu được từ kết quả phân tích trong một ngày dưới các điều kiện tối ưu, sử dụng dung dịch chuẩn nồng độ 10 mg/l của mỗi chất phân tích. Độ tái lặp được xác định với cùng dung dịch nhưng được thực hiện trong 10 ngày liên tiếp. Độ đúng được xác định thông qua hiệu suất thu hồi (trên nền nước deion và nền mẫu thật) ở hai mức nồng độ 7,5 và 17,5 mg/l, đồng thời so sánh kết quả phân tích của một số mẫu trên CE-C⁴D với phương pháp HPLC-DAD. Các mẫu này được chuẩn bị như đã đề cập trong phần xử lý mẫu.

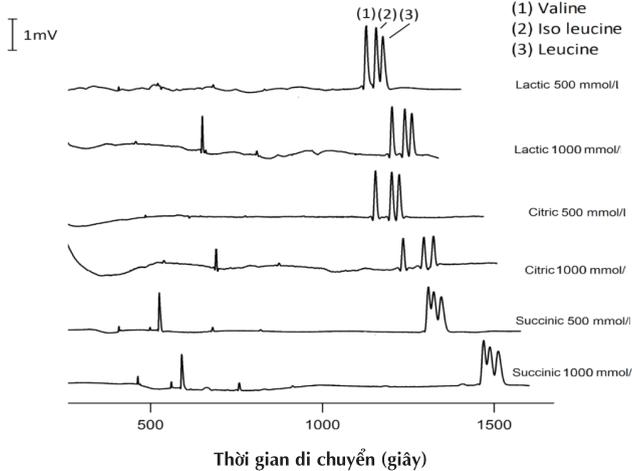
Kết quả và bàn luận

Kết quả khảo sát điều kiện phân tích ban đầu

Kết quả khảo sát thành phần BGE:

Trong dung dịch trung tính, các BCAA (có điểm đẳng điện pI~6,0) tồn tại chủ yếu dưới dạng muối nội không mang điện. Để có thể phân tích được bằng CE-C⁴D, điều kiện tiên quyết là cần chuyển các BCAA này về dưới dạng cation (pH < pK_{a1} ~ 2,4) hoặc dạng anion (pH > pK_{a2} ~ 9,6). Tuy nhiên, việc phân tích trong điều kiện pH cao sẽ gặp nhiều khó khăn do dòng điện di thẩm thấu (EOF) khá lớn,

làm cản trở sự di chuyển của các anion cần phân tích. Vì vậy, trong nghiên cứu này, các BGE có môi trường axit được sử dụng, bao gồm axit lactic, axit succinic và axit citric, trong đó mỗi loại BGE được khảo sát ở hai nồng độ 0,5M và 1,0M. Để hạn chế tương tác của các amino axit với nhóm silanol (-Si-OH) trên bề mặt thành mao quản, mỗi dung dịch axit được bổ sung PEG nồng độ 2% (m/v). Các điều kiện phân tích khác được giữ cố định, bao gồm: điện thế tách -15 kV, thời gian bơm mẫu 30 giây.

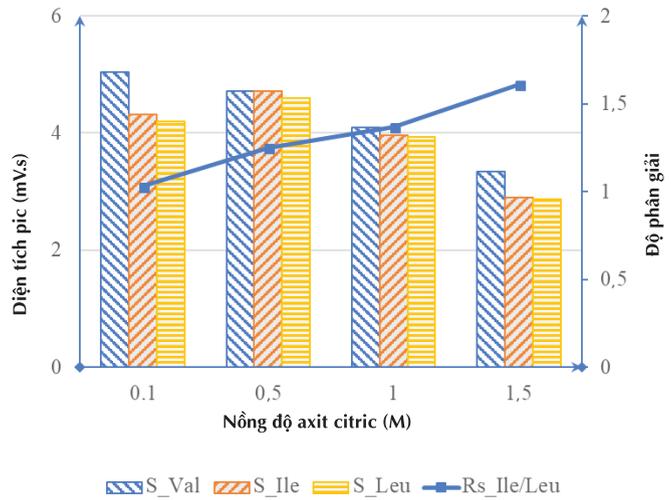


Hình 1. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần BGE tới sự phân tách của các chất phân tích.

Kết quả thu được cho thấy, việc sử dụng các BGE có môi trường axit là thích hợp khi tất cả các dung dịch axit được khảo sát đều cho tín hiệu của cả ba đối tượng phân tích (hình 1). BGE với thành phần axit lactic cho diện tích peak lớn nhất nhưng độ phân giải giữa hai peak Ile và Leu lại nhỏ nhất. Trong hai axit còn lại, axit citric cho độ phân giải giữa Ile/Leu lớn hơn ở cả hai nồng độ, do đó, axit citric được lựa chọn làm BGE để phân tích các BCAA.

Kết quả khảo sát nồng độ BGE:

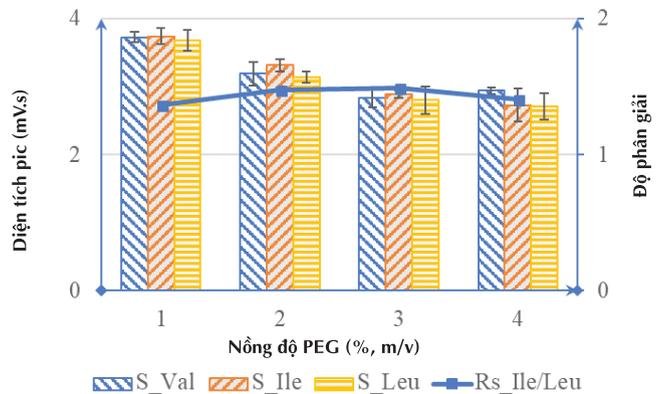
Nồng độ axit citric trong BGE sau đó được tiến hành khảo sát trong khoảng 0,1-1,5M nhằm xác định nồng độ BGE thích hợp nhất. Các điều kiện khác được giữ cố định như trong thí nghiệm khảo sát về thành phần BGE. Hình 2 thể hiện sự biến đổi diện tích peak của các chất phân tích và độ phân giải giữa Ile/Leu khi thay đổi nồng độ axit citric. Ở nồng độ citric cao hơn, sự tách chất diễn ra tốt hơn và độ phân giải giữa Ile/Leu tăng lên, mặc dù sự thay đổi này là không lớn. Ngược lại, khi tăng nồng độ axit citric, diện tích peak có xu hướng giảm dần và giảm khá nhanh khi nồng độ thay đổi từ 1,0M tới 1,5M. Lý do của sự biến đổi này là bởi ở nồng độ lớn, độ dẫn của BGE cao, làm cho sự chênh lệch tín hiệu giữa chất phân tích và nền giảm xuống. Vì vậy, nồng độ 1,0M của axit citric được lựa chọn là điều kiện thích hợp vì ở điều kiện này, cả diện tích peak (4 mV.s) và độ phân giải đều khá tốt (1,4) khi so với các điều kiện còn lại.



Hình 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng nồng độ BGE tới diện tích peak và độ phân giải. Ký hiệu trong hình: S_Val, S_Ile, S_Leu lần lượt là diện tích của các peak Valine, Isoleucine và Leucine; Rs_Ile/Leu là độ phân giải giữa hai peak Isoleucine và Leucine.

Kết quả khảo sát nồng độ PEG:

Các amino axit nói chung và các BCAA nói riêng có khả năng tạo liên kết hydro với nhóm -Si-OH tự do ở thành trong của mao quản, làm cản trở khả năng tách chất trong CE. Nghiên cứu này sử dụng PEG nhằm loại bỏ ảnh hưởng nêu trên của nhóm silanol. Nồng độ PEG (m/v) được khảo sát trong khoảng 1-4 %, các điều kiện phân tích khác được giữ không đổi như trong khảo sát nồng độ BGE. Kết quả trên hình 3 cho thấy, nồng độ PEG ảnh hưởng tới cả độ lớn của diện tích peak lẫn độ phân giải giữa Ile/Leu. Diện tích peak của cả ba chất đều tăng khi tăng nồng độ PEG từ 1% lên 2%, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng PEG. Xu hướng này cũng diễn ra đối với độ

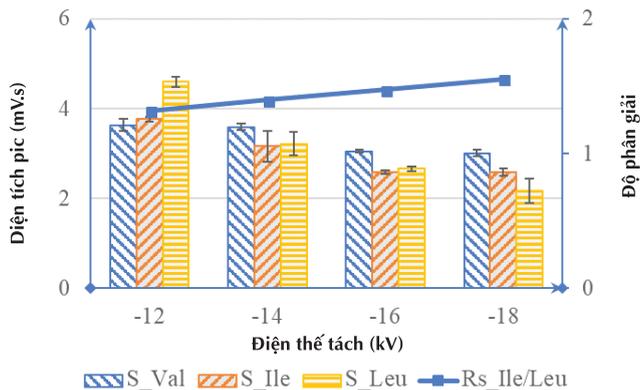


Hình 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ PEG tới diện tích peak và độ phân giải. Ký hiệu trong hình: S_Val, S_Ile, S_Leu lần lượt là diện tích của các peak Valine, Isoleucine và Leucine; Rs_Ile/Leu là độ phân giải giữa hai peak Isoleucine và Leucine.

phân giải giữa Ile/Leu. Bên cạnh đó, sự có mặt của PEG còn làm tăng độ nhớt của BGE và làm giảm cường độ của dòng EOF, dẫn đến thời gian di chuyển của các chất phân tích tăng lên. Tương tự với thí nghiệm khảo sát nồng độ axit citric, điều kiện PEG 2% được lựa chọn do đáp ứng được cả về diện tích peak và độ phân giải, đồng thời thời gian phân tích không quá dài.

Kết quả khảo sát điện thế tách:

Điện thế tách và thời gian bơm mẫu là hai thông số hoạt động của thiết bị đóng vai trò quan trọng đối với sự phân tách chất trong CE và cần được khảo sát một cách đầy đủ. Ở điện thế tách có độ lớn dưới 12 kV, thời gian phân tích thường khá dài, trong khi đó, độ lớn điện thế tách cao trên 18 kV có thể thiếu ổn định và gây ra nhiều nền lớn. Trong nghiên cứu này, điện thế tách được khảo sát trong khoảng -12 kV tới -18 kV nhằm hạn chế những ảnh hưởng trên, các điều kiện khác được giữ cố định. Theo xu hướng chung, khi tăng điện thế tách, độ linh động của các ion lớn hơn, chúng di chuyển nhanh hơn, kéo theo đó là thời gian di chuyển ngắn hơn, diện tích peak giảm xuống và độ phân giải tăng lên. Các sự biến đổi này có thể thấy được trên hình 4. Mặc dù điện thế -18 kV có độ phân giải lớn nhất giữa hai peak cạnh nhau là Ile và Leu, nhưng điều kiện -16 kV được lựa chọn do có độ phân giải khá tốt (1,4) đồng thời đường nền ổn định hơn.



Hình 4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của điện thế tách tới diện tích peak và độ phân giải. Ký hiệu trong hình: S_Val, S_Ile, S_Leu lần lượt là diện tích của các peak Valine, Isoleucine và Leucine; Rs_Ile/Leu là độ phân giải giữa hai peak Isoleucine và Leucine.

Kết quả khảo sát thời gian bơm mẫu:

Thời gian bơm mẫu là yếu tố cuối cùng được khảo sát và được thay đổi từ 10-60 giây. Khi tăng thời gian bơm mẫu, lượng mẫu đi vào mao quản lớn hơn và diện tích peak tăng lên, góp phần đạt được LOD tốt hơn. Tuy nhiên, khi lượng chất phân tích lớn, quá trình khuếch tán trong dung dịch diễn ra nhanh hơn, chân peak thường dẫn rộng hơn và làm giảm độ phân giải cũng như tính tuyến

tính. Giữa thời gian bơm mẫu 50 giây và 60 giây, sự thay đổi về diện tích các peak cũng như độ phân giải giữa Ile/Leu không nhiều, cho thấy lượng mẫu được bơm vào mao quản đã gần bão hòa. Vì vậy, giá trị 50 giây được lựa chọn làm điều kiện thời gian bơm mẫu.

Kết quả từ kế hoạch hóa thực nghiệm

Sau khi xác định được điều kiện phân tích ban đầu, việc tối ưu hóa được tiến hành bằng kế hoạch hóa thực nghiệm với mô hình RSM-CCD nhằm đạt được điều kiện phân tích chính xác hơn. Điều kiện phân tích được tìm thấy ban đầu (BGE là axit citric 1,0M bổ sung PEG 2%, điện thế tách -16 kV và thời gian bơm mẫu 50 giây) được sử dụng làm tâm của mô hình. Đồng thời, qua các khảo sát trên, khoảng biến đổi của các yếu tố ảnh hưởng cũng được xác định: nồng độ axit citric (X_1) 0,5÷1,5M; nồng độ PEG (X_2) 1,0÷3,0%; điện thế tách (X_3) -14÷-18 kV và thời gian bơm mẫu (X_4) 40÷60 giây. Mục tiêu được lựa chọn là độ phân giải giữa hai peak gần nhau Ile và Leu (Y_1) với kỳ vọng giá trị của Y_1 càng lớn càng tốt. Ngoài ra, để đáp ứng nhu cầu phân tích trong thực tế, thời gian phân tích không nên quá dài (<20 phút, tương đương với 1200 giây). Mặt khác, quá trình khảo sát ban đầu cũng cho thấy, thời gian di chuyển của peak cuối cùng (Leu) thường lớn hơn 900 giây. Vì vậy, để đảm bảo độ chính xác cho mô hình, thời gian di chuyển của Leu được lựa chọn làm mục tiêu thứ hai (Y_2) với kỳ vọng độ lớn của Y_2 nằm trong khoảng 900-1200 giây (bảng 1).

Bảng 1. Các yếu tố ảnh hưởng trong mô hình và các mức nghiên cứu tương ứng.

Yếu tố ảnh hưởng	Ký hiệu	Đơn vị	Mức nghiên cứu				
			-2 (- α)	-1	0	+1	+2 (+ α)
Nồng độ axit citric	X_1	mol/l	0,5	0,75	1	1,25	1,5
Nồng độ PEG	X_2	%	1	1,5	2	2,5	3
Điện thế tách	X_3	kV	-14	-15	-16	-17	-18
Thời gian bơm mẫu	X_4	s	40	45	50	55	60

Mô hình dự đoán đối với các hàm mục tiêu đều có độ tin cậy thống kê cao khi các giá trị p-value của mô hình cho Y_1 và Y_2 đều nhỏ hơn 0,0001, đồng thời giá trị p-value cho phép thử lack-of-fit đều lớn hơn 0,1. Kết quả cũng cho thấy mối liên hệ giữa hàm mục tiêu và các yếu tố ảnh hưởng là các phương trình tuyến tính bậc nhất, trong đó, BGE có ảnh hưởng tới cả độ phân giải và thời gian di chuyển (thể hiện thông qua sự có mặt của nồng độ axit citric (X_1) và nồng độ PEG (X_2) trong phương trình). Các sự ảnh hưởng này đều có tác động dương, khi tăng nồng độ PEG thì độ phân giải và thời gian di chuyển cũng tăng lên. Ngược lại, tăng thời gian bơm mẫu (X_4) sẽ làm giảm

độ phân giải (Y_1), còn tăng độ lớn điện thế tách (X_3) sẽ làm giảm thời gian di chuyển. Điều này là phù hợp với các phân tích ở trên. Bên cạnh đó, điện thế tách không có mặt trong phương trình hàm mục tiêu của độ phân giải (Y_1), còn thời gian bơm mẫu có mặt trong phương trình của thời gian di chuyển (Y_2). Sự không ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu tới thời gian di chuyển là dễ hiểu, trong khi sự vắng mặt của điện thế tách trong phương trình của Y_2 có thể lý giải là do sự thay đổi điện thế tách gây ra sự thay đổi về cả khoảng cách giữa các peak lẫn độ rộng của từng peak. Sự ảnh hưởng đồng thời theo cùng một chiều hướng này (tăng độ lớn của điện thế tách làm giảm khoảng cách peak cũng như thu hẹp chân peak) có thể dẫn tới sự ít thay đổi của độ phân giải. Các phương trình của hàm mục tiêu được mô hình đưa ra như sau:

$$Y_1 = 1,211 + 0,259X_1 + 0,080X_2 - 0,004X_4$$

$$Y_2 = 2347,7 + 335,5X_1 + 38,1X_2 + 95,2X_3$$

Từ các điều kiện trên, thu được các kết quả tối ưu từ mô hình như sau: nồng độ axit citric 1,11M, nồng độ PEG 2,32%, điện thế tách -16,9 kV và thời gian bơm mẫu 45 giây.

Thẩm định quy trình phân tích

Sau khi xác định được các điều kiện phân tích tối ưu, quy trình sẽ được thẩm định thông qua một loạt thông số bao gồm: LOD, LOQ, khoảng đường chuẩn và hệ số tuyến tính của đường chuẩn, độ lặp lại và độ tái lập của diện tích peak và thời gian di chuyển cũng như hiệu suất thu hồi trên các nền mẫu khác nhau. Bảng 2 trình bày các kết quả thu được khi đánh giá quy trình phân tích. LOD

Bảng 2. Kết quả thẩm định quy trình phân tích qua các thông số thống kê.

Chất phân tích	Val	Ile	Leu
LOD (mg/l)	1,2	1,0	0,82
LOQ (mg/l)	4,1	3,4	2,7
Khoảng đường chuẩn (mg/l)	5÷25	5÷25	5÷25
R ²	0,996	0,997	0,991
Độ lặp lại (10 mg/l, n=10)			
RSD ^a (%)	3,3	3,5	4,0
RSD ^b (%)	0,5	0,5	0,4
Độ tái lập (10 mg/l, n=10)			
RSD ^a (%)	7,4	5,6	6,8
RSD ^b (%)	1,8	2,1	1,6
H%	94÷99	91÷103	93÷102

RSD^a: độ lệch chuẩn tương đối về diện tích peak; RSD^b: độ lệch chuẩn tương đối về thời gian di chuyển.

của phương pháp nằm trong khoảng từ 0,82÷1,2 mg/l, đáp ứng được yêu cầu kiểm soát chất lượng thực phẩm bổ sung BCAA do hàm lượng các amino axit trong các mẫu thực tế đều rất cao, khoảng 100 mg/g - tương đương với khoảng 8 mg/l sau khi xử lý mẫu. Đường chuẩn thu được dựa trên 5 điểm chuẩn trong khoảng 5÷25 mg/l với hệ số tương quan R² khá tốt, lớn hơn 0,991. Phương pháp cũng cho thấy độ chụm tốt khi RSD đối với các thử nghiệm về độ lặp lại và độ tái lập đều tốt, nhỏ hơn 8% đối với diện tích peak và nhỏ hơn 3% đối với thời gian di chuyển.

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi (trên nền nước deion và nền mẫu thật) cũng như so sánh với các kết quả thu được khi phân tích đối chứng cùng một dung dịch bằng phương pháp HPLC-DAD. Hiệu suất thu hồi trên cả hai nền mẫu đối với tất cả các chất phân tích đều tốt, nằm trong khoảng 90-110%. Bên cạnh đó, kết quả đối chứng về hàm lượng các BCAA trong 4 mẫu thực giữa hai phương pháp CE-C⁴D và HPLC-DAD khá tốt khi độ lệch giữa hai phương pháp chỉ nằm trong khoảng 10%, trừ nồng độ Val và Leu trong mẫu M1.1 sai khác lần lượt là 11,2% và 13,8% (bảng 3). Sự sai khác này là có thể chấp nhận được và cho thấy phương pháp CE-C⁴D đã phát triển hoàn toàn có khả năng thay thế HPLC-DAD với mục tiêu phân tích BCAA trong thực phẩm bổ sung.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp thông qua phân tích đối chứng bằng HPLC.

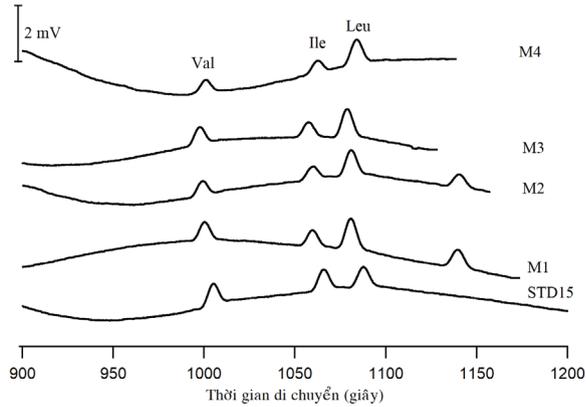
Mẫu	Hàm lượng Val đo được (mg/l)			Hàm lượng Ile đo được (mg/l)			Hàm lượng Leu đo được (mg/l)		
	CE-C ⁴ D	HPLC-DAD	Sai khác ^a	CE-C ⁴ D	HPLC-DAD	Sai khác ^a	CE-C ⁴ D	HPLC-DAD	Sai khác ^a
M1.1	1491	1341	11,2	1385	1272	8,9	2819	2477	13,8
M2.1	1308	1345	-2,8	1285	1440	-10,8	2465	2521	-2,2
M3.1	1502	1387	8,3	1392	1453	-4,2	2684	2866	-6,4
M4.1	1157	1188	-2,6	1199	1328	-9,8	2355	2591	-9,1

a: tính theo công thức (giá trị đo được theo CE - giá trị đo được theo HPLC)/giá trị đo được theo HPLC * 100 (%).

Kết quả phân tích mẫu thực (hình 5)

Trong nghiên cứu này, 4 mẫu thực thuộc các nhãn hiệu khác nhau đã được đặt mua từ các cửa hàng chuyên cung cấp các sản phẩm thực phẩm bổ sung cho người tập thể hình (bảng 4). Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng theo công bố của nhà sản xuất khá phù hợp với giá trị đo được trong thực tế bằng CE-C⁴D với sự sai khác nhỏ hơn 10%, ngoại trừ hàm lượng Val trong mẫu M1 (16%) và mẫu M2 (18%). Điều này cho thấy thông tin về hàm lượng BCAA của các nhà cung cấp trong nghiên cứu tương đối đáng tin cậy. Ngoài ra, mặc dù chưa thật sự rõ ràng nhưng

đường như các nhà sản xuất có xu hướng bổ sung nhiều BCAA hơn khi hàm lượng BCAA xác định được của 3/4 mẫu đều lớn hơn với hàm lượng ghi trên nhãn. Các kết quả thu được này cũng khẳng định khả năng ứng dụng của phương pháp CE-C⁴D trong phân tích đối tượng thực phẩm bổ sung.



Hình 5. Điện di đồ phân tích mẫu chuẩn (15 mg/l) và 4 mẫu thực.

Bảng 4. Kết quả phân tích mẫu thật.

Mẫu	Hàm lượng Val			Hàm lượng Ile			Hàm lượng Leu		
	Ghi trên nhãn ^a	Đo được bằng CE-C ⁴ D ^a	Sai khác ^b	Ghi trên nhãn ^a	Đo được bằng CE-C ⁴ D ^a	Sai khác ^b	Ghi trên nhãn ^a	Đo được bằng CE-C ⁴ D ^a	Sai khác ^b
M1	1750	2033±95	16	1750	1819±76	3,9	3500	3778±166	7,9
M2	1750	1905±96	8,9	1750	1843±92	5,3	3500	3671±198	4,9
M3	1250	1481±78	18	1250	1365±67	9,2	2500	2681±86	7,2
M4	1250	1216±59	-2,7	1250	1199±95	-4,1	2500	2514±116	0,5

a: tính theo mg chất/1 liều dùng (khối lượng 1 liều dùng đối với từng mẫu: M1: 13,26 gam; M2: 14,6 gam; M3: 10 gam; M4: 11 gam).

b: tính theo công thức (giá trị đo được theo CE - giá trị trên nhãn)/giá trị trên nhãn * 100 (%).

Kết luận

Bằng phương pháp CE-C⁴D kết hợp với việc kế hoạch hóa thực nghiệm theo mô hình RSM-CCD, nghiên cứu đã xây dựng được quy trình phân tích đồng thời các BCAA trong thực phẩm bổ sung. Quy trình đã được áp dụng trong thực tế để kiểm tra chất lượng sản phẩm thực phẩm bổ sung BCAA hiện có trên thị trường, đồng thời tiến

hành phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC. Các kết quả thu được cho thấy phương pháp CE-C⁴D có độ tin cậy tốt, thời gian phân tích tương đối ngắn mà không cần quá trình xử lý mẫu bằng dẫn xuất hóa phức tạp. Dựa trên những cơ sở này, phương pháp CE-C⁴D có thể được ứng dụng nhằm góp phần kiểm soát chất lượng thực phẩm bổ sung BCAA nói riêng và các loại thực phẩm bổ sung nói chung trên thị trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua đề tài mã số TN.17.22. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.Y. Piñer, R. Bauza, L. Arce (2011), “Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications”, *Electrophoresis*, **32(11)**, pp.1379-1393.
- [2] G. Bajotto, Y. Sato, et al. (2011), “Effect of BCAA supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles”, *European Journal of Applied Physiology*, **111**, pp.1815-1828.
- [3] Mei Musa Ali Omar, Abdalla Ahmed Elbashir, Oliver J. Schmitz (2017), “Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food”, *Food Chemistry*, **214**, pp.300-307.
- [4] Shigeki Akamatsu, Takao Mitsuhashi (2013), “Development of a simple analytical method using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for product identification and simultaneous determination of free amino acids in dietary supplements containing royal jelly”, *Journal of Food Composition and Analysis*, **30(1)**, pp.47-51.
- [5] Dazhong Shen, Yaolong Li, Zhenli Zhang, Ping Zhang, Qi Kang (2013), “Determination of amino acids by capillary electrophoresis with differential resonant contactless conductivity detector”, *Talanta*, **104**, pp.39-43.
- [6] Ting Wang, Huiru Xie, Xu Chen, Xuehua Jiang, Ling Wang (2015), “Simultaneous determination of leucine, isoleucine and valine in Beagle dog plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **114**, pp.426-432.