

XÁC ĐỊNH VITAMIN C TRONG SÚP LƠ XANH VÀ NƯỚC CAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

DETERMINATION OF VITAMIN C IN BROCCOLI, ORANGE JUICE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyễn Mạnh Hà^{1*}, Phạm Thị Mai Hương¹,
Trần Quang Hải¹, Nguyễn Thị Thu Phương¹,
Nguyễn Thị Thoa¹, Đào Thu Hà¹, Vũ Thị Trang¹

DOI: <http://doi.org/10.57001/huih5804.2024.141>

TÓM TẮT

Phương pháp phân tích hàm lượng vitamin C (bao gồm tổng axit L-ascorbic và L-dehydroascorbic) trong súp lơ xanh và nước cam đã được đánh giá. Sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phát hiện axit ascorbic, các mẫu được chiết xuất bằng axit metaphosphoric 20g/L. Kết quả cho thấy, các giá trị sử dụng của phương pháp được thực hiện trên các nền mẫu súp lơ xanh, nước cam lần lượt là: độ thu hồi đạt 87,6 - 105,4%, 88,3 - 97,7%; giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) đạt 4,31mg/100g, 3,24mg/100g; độ lệch chuẩn tương đối của độ lặp lại 7,72%, 3,98%. Việc sử dụng kỹ thuật chiết vitamin C và định lượng bằng HPLC là phương pháp phân tích hoàn toàn phù hợp.

Từ khóa: Vitamin C, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), súp lơ xanh, nước cam, giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL).

ABSTRACT

An analysis method of vitamin C, including L-ascorbic and dehydroascorbic, in broccoli and orange juice was investigated. The sample was extracted using meta-phosphoric acid 20g/L, analyzed on a high-performance liquid chromatography (HPLC) system, and performed by AOAC techniques. The limit of detection (LOD) was determined at 4.31mg/100g with broccoli and 3.24mg/100g with orange juice. The efficiency of recovery was found at 87.6 - 105.4% with broccoli, and at 88.3 - 97.7% with orange juice. Consequently, the vitamin C extraction using meta-phosphoric acid and the detection by HPLC is a highly stable, efficient method.

Keywords: Vitamin C, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), broccoli, orange juice, Method Detection Limit (MDL)

¹Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

*Email: nmhacnh@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/02/2024

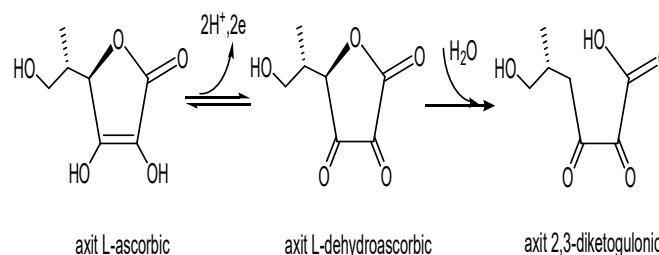
Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 03/4/2024

Ngày chấp nhận đăng: 25/4/2024

1. MỞ ĐẦU

Vitamin C là một trong những loại vitamin quan trọng nhất đối với dinh dưỡng của con người, chúng được cung cấp bởi các loại trái cây và thực vật. Axit L-ascorbic là dạng

tồn tại chính của vitamin C. Axit L-ascorbic bị oxy hóa thuận nghịch để tạo thành axit L-dehydroascorbic. Quá trình oxy hóa tiếp tục tạo ra axit diketogulonic (hình 1) [1]. Axit L-ascorbic là một loại chất chống oxy hóa và là đồng yếu tố cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp collagen, chuyển hóa carnitine, catecholamine, hấp thụ sắt trong chế độ ăn uống và có vai trò trong việc chống lại stress [2].



Hình 1. Quá trình oxy hóa L-ascorbic

Nguồn vitamin C cung cấp cho con người là từ trái cây và rau quả, có thể kể đến như cam, quýt, súp lơ, ổi,... Việc xác định chính xác hàm lượng vitamin C là rất quan trọng và quan trọng hơn cả phải hiểu được mối quan hệ của chế độ ăn uống với sức khỏe con người. Có nhiều phương pháp xác định hàm lượng vitamin C như phương pháp chuẩn độ [3], phương pháp đo quang [4]. Tuy nhiên, việc sử dụng các phương pháp này không đánh giá được chính xác sự hiện diện của các chất khác có trong trái cây, rau quả cũng có thể tham gia các phản ứng chuẩn độ hoặc sự tồn tại ở dạng khử của vitamin C. Đến nay, phương pháp được sử dụng có tính chính xác, độ nhạy, độ chọn lọc cao là sắc ký lỏng hiệu năng cao. Các nghiên cứu chỉ ra rằng việc sử dụng sắc ký lỏng pha đảo thường cho hiệu quả cao và phổ biến nhất trong phân tích vitamin C [5-7]. Việc xử lý mẫu là bước quan trọng đầu tiên trong phân tích vitamin C bằng HPLC. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, việc dùng Axit meta photphoric là thuốc thử phổ biến nhất, đảm nhiệm vai trò là chất chiết, chất ổn định... [6-9].

Kỹ thuật chiết xuất vitamin C trong mẫu bằng axit metaphosphoric và sử dụng phương pháp HPLC để định

lượng vitamin C trong súp lơ xanh, nước cam cùng với việc xác nhận các giá trị sử dụng bao gồm giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ thu hồi, độ lặp lại đã được thực hiện trong nghiên cứu này dựa trên tiêu chuẩn EN 14130 : 2003.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị

Các hóa chất được dùng trong nghiên cứu: Axit L-ascorbic ($C_6H_8O_6$) $\geq 99,7\%$, Merck. Axit metaphosphoric (H_3PO_3)_n, Merck. Trinatri phosphat ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$) $\geq 98,0\%$, Trung Quốc. Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) $\geq 99,0\%$, Trung Quốc. L- cystein ($C_3H_7NO_2S$), Merck. N-cestyl-N,N,N-trimethylamoni bromua ($C_{19}H_{42}BrN$) $\geq 99,0\%$, Merck. Metanol dùng cho HPLC, (CH_3OH) $\geq 99,0\%$, Merck. Nước để ion tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ Hóa - Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội.

Dung dịch chuẩn gốc axit ascorbic, 1000mg/L: Hòa tan 100mg axit ascorbic trong 100ml dung dịch axit metaphosphoric 20g/L, dung dịch chuẩn sử dụng trong ngày.

Pha động dùng cho HPLC: Hòa tan 13,6g kali dihydro phosphat trong 900ml nước để ion. Lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45 μ m (dung dịch A). Hòa tan 1,82g N-cetyl-N,N,N-trimethylamoni bromua trong 100ml metanol. Trộn kỹ rồi lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45 μ m được dung dịch B. Trộn 900ml dung dịch A với 100ml dung dịch B được dung dịch pha động.

Máy pH SevenCompact S220 hãng Mettler, Thụy Sĩ. Hệ thống HPLC 1260 - Agilent Technologies, Mỹ tại Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội.

2.2. Xử lý mẫu

Mẫu được súp lơ xanh được rửa sạch, để ráo nước, thái nhỏ, trộn đều. Nước cam được vắt từ cam quả. Cân một lượng mẫu thích hợp, chính xác đến từ 2 đến 10g mẫu thử cho trực tiếp vào trong cốc có mỏ 50ml có chứa 30ml axit metaphosphoric 20g/L. Đồng hóa rồi chuyển vào bình định mức 50ml. Lắc đều trong thời gian 15 phút và lọc, thu được dịch chiết mẫu.

Cho ngay 25ml dung dịch mẫu chiết vào cốc có mỏ 50ml. Thêm 10ml dung dịch L-cystein. Khuấy đều dung dịch và chỉnh pH đến khoảng 7,0 và 7,2 bằng cách thêm dung dịch trinatri phosphat và khuấy 5 phút. Sau đó giảm pH đến khoảng từ 2,5 đến 2,8 bằng cách thêm dung dịch axit metaphosphoric 20g/L. Chuyển dung dịch sang bình định mức 50ml, tráng rửa điện cực, que khuấy từ và cốc có mỏ bằng nước. Thêm nước đến vạch. Lọc mẫu qua bộ lọc màng, sử dụng dịch lọc này để phân tích sắc ký.

2.3. Xác nhận các giá trị sử dụng của phương pháp

2.3.1. Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị 6 nồng độ chuẩn khác nhau từ 3 đến 25mg/L. Tiến hành chạy mẫu trên hệ thống HPLC để xác định diện tích peak của chất phân tích. Xây dựng mối quan hệ phụ thuộc giữa diện tích peak và nồng độ của chất phân tích.

2.3.2. Giới hạn phát hiện (MDL), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Chuẩn bị 7 mẫu nước cam và 7 mẫu súp lơ, mẫu được xử lý theo 2.2. Tiến hành phân tích trên máy HPLC, từ diện tích peak, tính được hàm lượng vitamin C của 7 mẫu. MDL và LOQ được xác định theo công thức: MDL = 3xSD, LOQ = 10xSD. Trong đó SD là độ lệch chuẩn giá trị hàm lượng vitamin C của 7 mẫu.

2.3.3. Độ chụm

Độ chụm của phương pháp thể hiện qua việc đánh giá độ lặp lại và độ tái lập nội bộ thực hiện bởi 2 thí nghiệm viên ở 2 ngày khác nhau trên mẫu cam và súp lơ xanh với 7 lần phân tích. Từ các giá trị hàm lượng vitamin C, tính độ lệch chuẩn tương đối độ của độ lặp, độ tái lập.

2.3.4. Độ thu hồi

Độ thu hồi được đánh giá và thực hiện ở 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao (mỗi mức thực hiện lặp lại 7 lần). Xác định % giữa hàm lượng axit ascorbic trong mẫu thêm chuẩn theo thực nghiệm và nồng độ chuẩn thêm vào theo lý thuyết.

2.4. Xử lý và đánh giá số liệu

Sử dụng phần mềm đi kèm theo thiết bị HPLC để thu được các sắc ký đồ, diện tích peak, thời gian lưu. Sử dụng phần mềm Excel để xây dựng khoảng tuyến tính, tính tỉ lệ thu hồi, độ lệch chuẩn. Kết quả các thông số thẩm định phương pháp được đánh giá dựa theo AOAC 2016. Hàm lượng vitamin C (X) trong mẫu được tính bằng mg/100g theo công thức:

$$X = \frac{a \times V}{10 \times m} \times f$$

Trong đó:

- a là hàm lượng vitamin C tính theo đường chuẩn (mg/L);
- V là thể tích dung dịch của mẫu định mức sau khi chiết (mL);
- m là khối lượng mẫu (g);
- 10 là hệ số chuyển đổi;
- f là hệ số pha loãng.

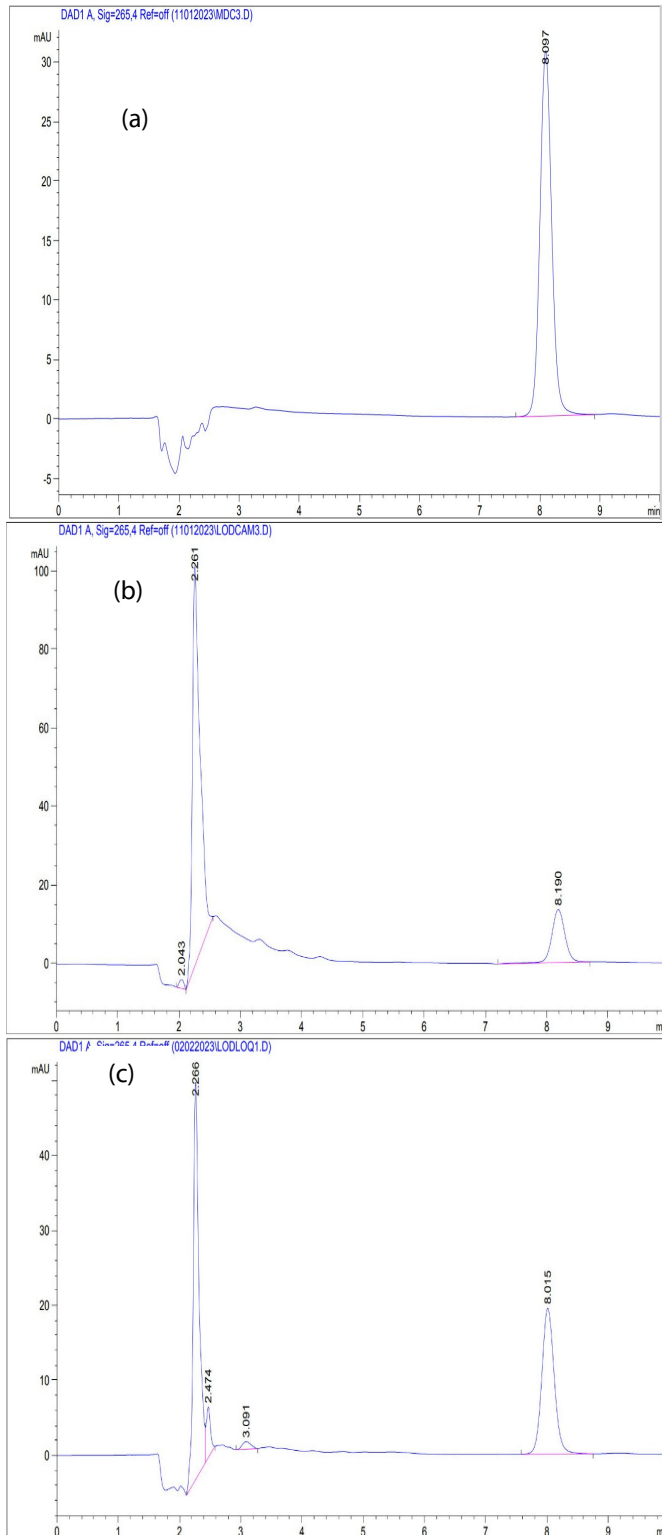
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Các điều kiện sắc ký HPLC

Theo tài liệu tham khảo EN 14130 : 2003 [9] và qua khảo sát sơ bộ, chúng tôi lựa chọn và tiến hành thực hiện HPLC ở các điều kiện sau:

- Pha động: Dung dịch pha động theo mục 2.1
- Cột: Eclipse XDB-C18, cỡ hạt 5 μ m, kích thước 150mm x 4,6 mm.
- Tốc độ dòng: 1mL/phút.
- Detector: UV-DAD, bước sóng 265nm.
- Thể tích bơm mẫu: 20 μ L.
- Nhiệt độ cột: 25°C

Kết quả sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu súp lơ xanh và mẫu cam quả được thể hiện trên hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ HPLC của vitamin C trong mẫu chuẩn (a), mẫu súp lơ xanh (b), mẫu nước cam (c)

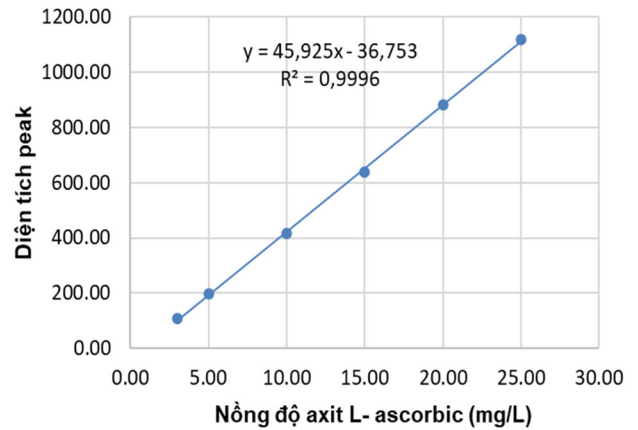
Từ kết quả, nhận thấy, thời gian lưu của axit ascorbic là khoảng 8 phút,, các phổ đồ của các mẫu súp lơ xanh và nước cam đều thể hiện sự có mặt của vitamin C và peak của axit L-ascorbic đều được tách rời, tương đối cân xứng. Điều này đáp ứng được cho quá trình định lượng vitamin C bằng HPLC.

3.2. Đường chuẩn định lượng axit ascorbic

Đường chuẩn được biểu diễn bằng đồ thị sự phụ thuộc diện tích peak vào nồng độ axit L-ascorbic thông qua các mẫu chuẩn có nồng độ lần lượt là: 3; 5; 10; 15; 20; 25mg/L. Từ kết quả trên hình 3 cho thấy, phương trình hồi quy là: $y = 45,925x - 36,753$ với hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,9996$.

Trong đó: y là diện tích peak, x là nồng độ axit L-ascorbic.

Với hệ số tương quan tuyến tính $0,995 < R^2 = 0,9996 < 1$, cho thấy đường chuẩn đã xây dựng đạt độ tuyến tính cao trong khoảng nồng độ từ 3 - 25mg/L, hoàn toàn có thể sử dụng để xác định hàm lượng vitamin C.



Hình 3. Đường chuẩn định lượng vitamin C

3.3. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (LOQ)

Phân tích 7 mẫu thực súp lơ xanh và nước cam bằng phương pháp HPLC, kết quả xác định MDL, LOQ được trình bày trong bảng 1. Giá trị MDL, LOQ trên nền mẫu súp lơ xanh đạt 4,31mg/100g và 14,4mg/100g, đối với nước cam các giá trị này đạt 3,24mg/100g và 10,8mg/100g. Đồng thời, giá trị MDL cũng được đánh giá thông qua độ nhiễu nền (S/N) với kết quả thu được trên nền mẫu súp lơ xanh là 7,4 và 9,7. Các giá trị này đều thỏa mãn ($5 < S/N < 20$) theo EPA [11].

Bảng 1. Kết quả MDL, LOQ của phương pháp định lượng vitamin C

Nền mẫu	Giá trị trung bình hàm lượng vitamin C ^a , mg/100g	Độ lệch chuẩn (SD)	MDL (mg/100g)	LOQ (mg/100g)	Độ nhiễu nền, S/N
Súp lơ xanh	10,59	1,44	4,31	14,4	7,4
Nước cam	10,45	1,08	3,24	10,8	9,7

a. Số thí nghiệm lặp lại 7 lần

$S/N = \text{Giá trị trung bình của vitamin C} / \text{Độ lệch chuẩn}$

3.4. Độ chụm

Độ lặp, độ tái lặp được xác định bằng cách định lượng với 7 lần đo đối với mỗi thí nghiệm viên 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 độ lặp, độ tái lặp đạt 5,79 -

7,72% đối với mẫu súp lơ xanh và từ 3,79 - 3,98% đối với mẫu nước cam. Các giá trị này đều đạt độ đúng theo AOAC.

Bảng 2. Độ lặp, độ tái lập của phương pháp định lượng vitamin C

Nền mẫu	Độ lặp		Độ tái lập	
	Giá trị trung bình hàm lượng vitamin C ^b , mg/100g	Độ lệch chuẩn tương đối độ lặp (RSD%)	Giá trị trung bình hàm lượng vitamin C ^c , mg/100g	Độ lệch chuẩn tương đối độ tái lập (RSD%)
Súp lơ xanh	10,55	5,79	10,96	7,72
Nước cam	10,58	3,79	10,88	3,98

b. Số thí nghiệm lặp lại 7 lần của 1 thí nghiệm viên trong cùng 1 ngày
c. Số thí nghiệm lặp lại 14 lần của 2 thí nghiệm viên trong 2 ngày

3.5. Độ thu hồi

Độ thu hồi được xác định bằng cách định lượng với 7 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 ở nồng độ thêm chuẩn thấp, trung bình, cao, với các giá trị hiệu suất thu hồi đạt từ 87,6 - 105,4% đối với nền súp lơ xanh và từ 88,3 - 97,7% đối với nền nước cam. Do đó, có thể nói phương pháp phân tích đạt độ thu hồi tốt theo AOAC.

Bảng 3. Kết quả độ thu hồi của phương pháp định lượng vitamin C

Nền mẫu	Hiệu suất thu hồi (H%)	Độ lệch chuẩn tương đối (RSD%)
<i>Súp lơ xanh</i>		
Nồng độ thêm chuẩn thấp 5mg/100g	87,6	6,9
Nồng độ thêm chuẩn trung bình 20mg/100g	92,6	1,7
Nồng độ thêm chuẩn cao 40mg/100g	105,4	0,6
<i>Nước cam</i>		
Nồng độ thêm chuẩn thấp 5mg/100g	88,3	14,2
Nồng độ thêm chuẩn trung bình 25mg/100g	89,2	4,1
Nồng độ thêm chuẩn cao 50mg/100g	97,7	1,0

3.6. Kết quả phân tích một số mẫu súp lơ xanh và mẫu cam

Sau khi đánh giá phương pháp phân tích, tiến hành định lượng vitamin C trong một số mẫu cam và súp lơ xanh được thu thập ở chợ Nhổn, Bắc Từ Liêm, Hà Nội. 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 C, kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả hàm lượng vitamin C trong một số mẫu cam và súp lơ xanh

Mẫu	Hàm lượng vitamin C trong mẫu (mg/100g)
Cam-1	40,32 ± 0,40
Cam-2	47,44 ± 0,36
Cam-3	37,16 ± 0,34
Súp lơ-1	98,4 ± 0,42
Súp lơ-2	105,68 ± 0,32
Súp lơ-3	119,84 ± 0,64

Các giá trị được tính trung bình ± SD (n = 3)

Các kết quả cho thấy, các mẫu đều xuất hiện sự có mặt của vitamin C với hàm lượng từ 37,16 - 47,44mg/100g với mẫu cam và từ 98,4 - 119,84mg/100g với mẫu súp lơ xanh.

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu lựa chọn các điều kiện thích hợp cho phép đo HPLC xác định hàm lượng vitamin C trên nền mẫu súp lơ xanh, cam quả với detector UV-DAD bước sóng 265nm, cột Eclipse XDB-C18, cỡ hạt 5µm, kích thước 150 x 4,6mm. Các giá trị của phương pháp được xác định: khoảng tuyến tính đường chuẩn từ 3 - 25mg/L, hệ số tương quan tuyến tính R² = 0,9996, giới hạn định lượng LOQ = 14,37mg/100g với mẫu súp lơ và 10,81mg/100g với mẫu nước cam. Đã định lượng vitamin C trong một số mẫu súp lơ xanh và nước cam bằng phương pháp HPLC. Phương pháp này có thể áp dụng định lượng vitamin C nhằm kiểm soát chất lượng thực phẩm có chứa vitamin C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Davey M. W., et al., "Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860, 2000.
- [2]. Arrigoni O., De Tullio M. C. "Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant," *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569, 1-9, 2002.
- [3]. AOAC, *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 2016.
- [4]. Arya S. P., Mahajan M., Jain P., "Photometric methods for the determination of vitamin C," *Analytical Sciences*, 14, 889-895, 1998.
- [5]. L. Nováková, P. Solich, D. Solichová, "HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids," *TrAC Trends Anal. Chem.*, 27, 942-958, 2008.
- [6]. L. F. Russel, *Quantitative determination of water-soluble vitamins*. in: L.M.L. Nollet (Ed.), *Food Analysis by HPLC*, second ed., Marcel Dekker, New York, pp. 403-476, 2000.
- [7]. R. R. Eitenmiller, L. Ye, W.O. Landen Jr., *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*, second ed. CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [8]. M. C. Sánchez-Mata, R. D. Cabrera Loera, P. Morales, V. Fernández-Ruiz, M. Cámara, C. Díez Marqués, M. Pardo-de-Santayana, J. Tardío, "Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds," *Genet. Resour. Crop Evol.*, 59, 431-443, 2012.
- [9]. EN 14130:2003. Foodstuffs - Determination of Vitamin C By HPLC (Foreign Standard).
- [10]. Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, Revision 2, 2016.

AUTHORS INFORMATION

Nguyen Manh Ha, Pham Thi Mai Huong, Tran Quang Hai, Nguyen Thi Thu Phuong, Nguyen Thi Thoa, Dao Thu Ha, Vu Thi Trang
Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry, Vietnam