

XÁC NHẬN PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG PHYTIC ACID TRÊN NỀN MẪU NGŨ CỐC BẰNG QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ

METHOD VALIDATION FOR QUANTIFICATION OF PHYTIC ACID CONTENT IN CEREAL SAMPLES USING THE MOLECULAR ABSORPTION SPECTROSCOPY

Vũ Thị Huyền^{1,*}, Trần Nhật Duy¹,
Đặng Công Ảnh¹, Nguyễn Xuân Bắc¹

DOI: <http://doi.org/10.57001/huih5804.2025.167>

TÓM TẮT

Xác nhận phương pháp định lượng và điều kiện thích hợp cho quá trình chiết phytic acid trong mẫu ngũ cốc được nghiên cứu. Phương pháp định lượng được mô tả trong nghiên cứu này là kỹ thuật quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS, bao gồm bước sóng đo 502nm, khoảng tuyến tính của đường chuẩn từ 0 đến 27,18µg/ml, giới hạn phát hiện 0,58µg/ml, giới hạn định lượng 1,74µg/ml, độ lặp lại 5,27%, độ tái lặp 5,23% và độ thu hồi dao động từ 94,92 đến 101,61%. Điều kiện tối ưu cho quá trình chiết phytic acid là dung dịch HCl 2,4%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 và thời gian 4 giờ. Sử dụng kỹ thuật UV-VIS và điều kiện chiết này, hàm lượng phytic acid trong 20 loại đậu, vừng, lạc được xác định và dao động từ 4,84 đến 19,41mg phytic acid/g chất khô. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, phương pháp UV-VIS để định lượng phytic acid trong thực phẩm đơn giản, dễ thực hiện, có độ tin cậy cao, có thể ứng dụng phân tích trên nhiều loại thực phẩm có nguồn gốc thực vật.

Từ khóa: Phương pháp, Phytic acid, ngũ cốc, UV-VIS.

ABSTRACT

Validation of the quantitative method and suitable conditions for the extraction of phytic acid in food samples was studied. The quantitative method described in this study was the molecular absorption spectroscopy (UV-VIS), including a measurement wavelength of 502 nm, a linear range of the standard curve from 0 to 27.18µg/ml, a detection limit of 0.58µg/ml, a quantification limit of 1.74µg/ml, a repeatability of 5.27%, a reproducibility of 5.23% and a recovery ranging from 94.92 to 101.61%. The optimal conditions for the extraction of phytic acid were a 2.4% HCl solution, a material/solvent ratio of 1/30 and a time of 4 hours. Using UV-VIS method and these extraction conditions, the phytic acid content in 20 types of beans, sesame, and peanuts was determined and ranged from 4.84 to 19.41mg phytic acid/g dry matter. The results of this study show that the UV-VIS method for quantifying phytic acid in food is simple, easy to perform, highly reliable, and can be applied to analyze many types of foods of plant origin.

Keywords: Method, Phytic acid, cereals, UV-VIS.

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: vthuyen@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 21/02/2025

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 19/5/2025

Ngày chấp nhận đăng: 28/5/2025

1. GIỚI THIỆU

Phytic acid còn được gọi là inositol hexaphosphate hay IP6, được tìm thấy trong các loại hạt cây, là hình thức lưu trữ phosphorus chủ yếu trong hạt. Khi hạt nảy mầm, phytic acid bị phân hủy và phosphorus được giải phóng để cây non sử dụng. Phytic acid thường được sử dụng như

một chất bảo quản trong các sản phẩm trên thị trường do tính chống oxy hóa của nó [1]. Cấu trúc độc đáo của phytic acid mang lại cho nó khả năng tạo chelat mạnh với các cation như calcium, magnesium, zinc, copper, iron và potassium để tạo thành muối không hòa tan. Do đó, nó ảnh hưởng xấu đến sự hấp thụ và tiêu hóa các khoáng

chất này của động vật [2]. Nó tích tụ trong hạt trong thời kỳ chín, dạng dự trữ chính của cả phosphorus và inositol trong hạt và ngũ cốc thực vật [3]. Chất này hoạt động trong vùng pH rộng dưới dạng ion tích điện âm cao và do đó sự hiện diện của nó trong chế độ ăn có tác động tiêu cực đến sinh khả dụng của các ion khoáng hóa trị hai và hóa trị ba như Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} và Cu^{2+} [4-6]. Ngoài ra, phytic acid cũng được báo cáo là tạo thành phức hợp với protein ở cả giá trị pH thấp và cao. Những sự hình thành phức tạp này làm thay đổi cấu trúc protein, có thể dẫn đến giảm khả năng hòa tan protein, hoạt động enzyme và khả năng tiêu hóa protein. Do đó, ăn càng nhiều thực phẩm chứa phytic acid thì càng nhiều khoáng chất bị chặn lại không cho hấp thu vào cơ thể. Tuy nhiên, cần lưu ý đó là tình trạng kháng chất dinh dưỡng này nó chỉ xảy ra trong một bữa ăn, có nghĩa là phytic acid chỉ làm giảm khả năng hấp thu chất khoáng trong bữa ăn đó, còn trong các bữa ăn khác thì không bị ảnh hưởng [1].

Mặc dù có nhiều khía cạnh tiêu cực đối với sức khỏe con người, tuy nhiên, việc tiêu thụ phytic acid đã được báo cáo là có một số tác động tích cực. Kết quả giám sát dân số áp dụng chế độ ăn chay cho thấy tỷ lệ mắc ung thư thấp hơn, điều này cho thấy rằng phytic acid có tác dụng chống ung thư [7, 8]. Các đặc tính liên kết kim loại của phytic acid mang lại cho nó chức năng chống oxy hóa, ức chế việc sản xuất các gốc hydroxyl giúp bình thường hóa cân bằng nội môi tế bào và nó cũng hoạt động như một chất chống oxy hóa thực phẩm tự nhiên [9]. Phytic acid trong chế độ ăn uống có thể có lợi cho sức khỏe đối với bệnh nhân tiểu đường vì nó làm giảm phản ứng đường huyết bằng cách giảm tốc độ tiêu hóa tinh bột và làm chậm quá trình làm rỗng dạ dày. Tương tự như vậy, phytic acid cũng đã được chứng minh là có tác dụng điều chỉnh sự tiết insulin [10]. Người ta tin rằng phytic acid làm giảm cục máu đông, cholesterol và chất béo trung tính và do đó ngăn ngừa bệnh tim [11]. Nó được sử dụng như một tác nhân tạo phức để loại bỏ dấu vết của các ion kim loại nặng. Các nghiên cứu in vitro đã chỉ ra rằng phytic acid được ủ với tế bào T bị nhiễm HIV-1 sẽ ức chế sự nhân lên của HIV-1 [12, 13].

Do đó, xây dựng phương pháp xác định hàm lượng phytic acid có thể đo lường chính xác lượng phytic acid trong thực phẩm và nghiên cứu về tác động của nó đối với dinh dưỡng và sức khỏe. Điều này có thể giúp ích trong việc phát triển các chiến lược chế biến thực phẩm hoặc cải thiện chất lượng dinh dưỡng của thực phẩm. Cho đến nay, có nhiều phương pháp định lượng phytic acid đã được phát triển từ rất lâu. Phương pháp đầu tiên được chấp nhận để xác định hàm lượng phytic acid dựa

trên sự hình thành kết tủa với $Fe(III)$ và dựa trên chuẩn độ điểm cuối. Nhưng điểm cuối không rõ ràng vì có kết tủa dạng keo của ferric phytate hình thành trong quá trình chuẩn độ [14]. Sau đó, nhiều phương pháp khác được phát triển để xác định hàm lượng phytic acid, như phương pháp so màu [15], phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao [16], phương pháp sắc kí trao đổi ion [17]... Tuy nhiên, các phương pháp hiện có khá phức tạp và có những hạn chế với từng phòng thí nghiệm. Do đó, mục đích của nghiên cứu này là phát triển và xác nhận một phương pháp đơn giản, thông dụng để định lượng phytic acid trong ngũ cốc. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm ứng dụng và phát triển kĩ thuật quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS) trong điều kiện trang thiết bị tại cơ sở nghiên cứu để xác định hàm lượng phytic acid trong các loại ngũ cốc, hạt,... hiện đang được sử dụng phổ biến ở nước ta.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

Lấy mẫu: Các mẫu đậu (14 mẫu), lạc (2 mẫu) và vùng (4 mẫu) sử dụng trong nghiên cứu này được lấy theo TCVN 9027:2011 với một số thay đổi nhỏ phù hợp với thực tế. Mỗi loại mẫu được lấy tại 3 cửa hàng khác nhau, mỗi cửa hàng 3 gói, mỗi gói 200g, sau đó trộn đều và giảm khối lượng theo nguyên tắc chia tư đến khoảng 200g mỗi loại. Sau đó, các mẫu được đựng trong túi vải lọc, đông khô trong 72 giờ, rồi nghiền mịn với mắt sàng 0,12mm và bảo quản trong túi zip ở nhiệt độ $-20^{\circ}C$ dùng cho phân tích.

Hóa chất: Chất chuẩn phytic acid sodium salt hydrate, thuốc thử sulfosalicylic acid, iron(III) chloride khan, sodium chloride được mua của hãng Sigma-Aldrich. Dung dịch hydrochloric acid 36% được mua của hãng Samchun (Hàn Quốc).

Dụng cụ và thiết bị: Máy quang phổ UV-VIS Shimadzu UV 1800, máy lắc ngang HY-2, máy li tâm MIKRO 220R, cân phân tích ME-T Mettler, tủ đông, máy vortex Ms 3 Basic-IKA, và các dụng cụ phân tích cần thiết khác.

2.2. Thẩm định phương pháp

Nguyên tắc của phương pháp định lượng phytic acid bằng quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS): Phytic acid trong các mẫu khảo sát được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Wade chứa 0,018% $FeCl_3$ và 0,03% sulfosalicylic acid [18]. Do phản ứng giữa ion Fe^{3+} và sulfosalicylic acid tạo màu hồng có cực đại hấp thụ ở bước sóng xung quanh 500nm. Khi có mặt phytic acid, ion Fe^{3+} trở thành dạng liên kết ester

phosphate và không thể phản ứng với sulfosalicylic acid, kết quả làm giảm cường độ màu hồng của thuốc thử. Đo độ hấp thụ quang của dung dịch, từ đó xây dựng mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ chất và độ hấp thụ quang, cho phép xác định được hàm lượng phytic acid theo phương pháp đường chuẩn.

Phản ứng tạo màu được thực hiện như sau: Hút 3,0ml dung dịch chuẩn hoặc mẫu vào ống nghiệm. Thêm vào đó 1,0ml dung dịch thuốc thử Wade, lắc đều và để yên 10 phút ở nhiệt độ phòng. Nước cất được sử dụng làm mẫu trắng.

Khảo sát bước sóng đo của thiết bị UV-VIS: Để khảo sát bước sóng đo trên hệ thống máy quang phổ UV-VIS Shimadzu UV-1800, chuẩn bị một dung dịch chuẩn phytic acid có nồng độ xác định, tạo màu và tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng trong khoảng 600 đến 400nm. Chọn bước sóng mà ở đó độ hấp thụ quang của mẫu đo là lớn nhất.

Xác định khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn phytic acid: Khoảng tuyến tính được thực hiện bằng cách đo các dung dịch chuẩn có nồng độ thay đổi và khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ. Vẽ đường phụ thuộc giữa tín hiệu đo và nồng độ, sau đó quan sát sự phụ thuộc cho đến khi không còn tuyến tính.

Sau khi xác định được khoảng tuyến tính, đường chuẩn phytic acid được xây dựng với nồng độ nằm trong khoảng giá trị đó và hệ số xác định của phương trình hồi quy (R^2) trong khoảng từ 0,99 đến 1. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng chuẩn tinh khiết để xây dựng đường chuẩn. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc giữa tín hiệu đo (độ hấp thụ quang) và nồng độ chất phân tích tuân theo định luật Lambert-Berr có dạng: $y = ax + b$. Trong đó: y là độ hấp thụ quang, x là nồng độ chất phân tích, a là hệ số góc, b là tung độ gốc.

Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp: Phytate là chất có vai trò dinh dưỡng đáng kể như là dạng dự trữ chính của phosphor trong nhiều mô thực vật, đặc biệt là cám và hạt. Nó cũng có trong nhiều loại đậu, đỗ và ngũ cốc. Do đó, với nền mẫu là các loại hạt, không thể tìm được mẫu trắng cho khảo sát xác định LOD và LOQ của phytate. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành xác định LOD và LOQ dựa trên độ lệch chuẩn trên nền mẫu thử có nồng độ chất phân tích thấp và mẫu được sử dụng là giống đậu tương ĐT84.

Giá trị trung bình ($\bar{x}$) và độ lệch chuẩn (SD) được xác định từ các giá trị của 10 lần phân tích song song mẫu thử.

Mẫu thử được chọn có nồng độ thấp (từ 4 - 10 lần so với LOD ước lượng [19]. LOD và LOQ được xác định như sau:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$LOD = 3 \times SD \text{ và } LOQ = 3 \times LOD$$

Tỉ số $\bar{x}/LOD$ sử dụng để đánh giá độ tin cậy của LOD. Nếu $4 \leq \bar{x}/LOD \leq 10$ thì giá trị LOD đáng tin cậy [15].

Xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp:

Độ lặp lại diễn tả độ chính xác của một quy trình phân tích trong cùng điều kiện thí nghiệm trong khoảng thời gian ngắn. Độ lặp lại còn được gọi là độ chính xác trong cùng điều kiện định lượng. Trong nghiên cứu này, mẫu thử được dùng để đánh giá độ lặp lại của phương pháp. Tiến hành thí nghiệm lặp lại 10 lần trên cùng một mẫu thử bởi một người phân tích. Đánh giá độ lặp lại bằng độ lệch chuẩn tương đối (RSDr%) của phương pháp theo AOAC [19].

$$RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100(\%)$$

Độ tái lập được thực hiện bằng cách thử nghiệm trên cùng một mẫu thử trong đánh giá độ lặp lại, thực hiện bởi nhân viên khác trong ngày khác. Tiến hành thí nghiệm 10 lần và đánh giá độ tái lập bằng độ lệch chuẩn tương đối (RSDr%) của phương pháp theo AOAC [19].

Xác định độ thu hồi của phương pháp: Dùng mẫu đậu tương ĐT84 làm mẫu nền để xác định độ thu hồi của phương pháp. Cân 16 mẫu với cùng lượng khối lượng mẫu xác định, trong đó 12 mẫu được sử dụng làm mẫu thêm chuẩn bằng cách thêm vào đó những lượng nhất định chất chuẩn phytic acid ở 3 mức nồng độ 1 LOQ, 3 LOQ và 5 LOQ, mỗi mức tiến hành lặp 4 lần [15]. Tiến hành phân tích mẫu thử và mẫu thêm chuẩn theo qui trình, từ đó xác định được hiệu suất thu hồi theo công thức sau:

$$R\% = \frac{C_{m+c} - C_m}{C_c} \times 100$$

Trong đó: C_m là nồng độ mẫu thử, C_c là nồng độ chất chuẩn thêm vào, C_{m+c} là nồng độ mẫu thêm chuẩn đo thực tế.

2.3. Xác định tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian chiết

Khảo sát tỉ lệ nguyên liệu/dung môi: Dùng một mẫu thử để khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hiệu quả chiết phytic acid từ nguyên liệu. Cân mẫu theo tỉ lệ lần lượt là 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 và 1/50 (g/ml) vào ống falcon 50ml. Thêm 10ml dung dịch HCl 2,4%,

vortex và lắc với tốc độ 220 rpm/phút trong 16h. Sau khi chiết, hỗn hợp được li tâm ở 6000rpm trong 10 phút ở 10°C, thu dịch chiết thô sang ống falcon chứa 1,0g NaCl và lắc ở 350rpm/phút trong 20 phút để hòa tan muối. Hỗn hợp này được ủ ở -20°C trong 20 phút và sau đó li tâm 6000rpm/phút ở 10°C trong 10 phút, thu dịch trong để phân tích hàm lượng phytic acid.

Khảo sát thời gian chiết: Dùng một mẫu thử để khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hiệu quả chiết phytic acid từ nguyên liệu. Chuẩn bị 33 mẫu theo khối lượng mẫu theo tỉ lệ đã được lựa chọn ở trên. Thêm 10ml dung dịch HCl 2,4%, vortex và lắc với tốc độ 220 pm/phút trong các khoảng thời gian 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h và 16h. Sau khi chiết, hỗn hợp được li tâm ở 6000rpm trong 10 phút ở 10°C, thu dịch chiết thô sang ống falcon chứa 1,0g NaCl và lắc ở 350rpm/phút trong 20 phút để hòa tan muối. Hỗn hợp này được ủ ở -20°C trong 20 phút và sau đó li tâm 6000rpm/phút ở 10°C trong 10 phút, thu dịch trong để phân tích hàm lượng phytic acid.

Xác định hàm lượng phytic acid: Các mẫu nghiên cứu được chiết theo tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian chiết đã khảo sát. Hàm lượng phytic được xác định theo phương trình sau:

$$\text{Phyticacid} = \frac{a.V.f}{m.1000} \text{ (mg PA / g CK)}$$

Trong đó: a là giá trị x từ đường chuẩn phytic acid ($\mu\text{g/ml}$), V là thể tích dung dịch chiết (ml), m là khối lượng mẫu theo chất khô (g), f là hệ số pha loãng, 1000 đổi từ μg sang mg.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

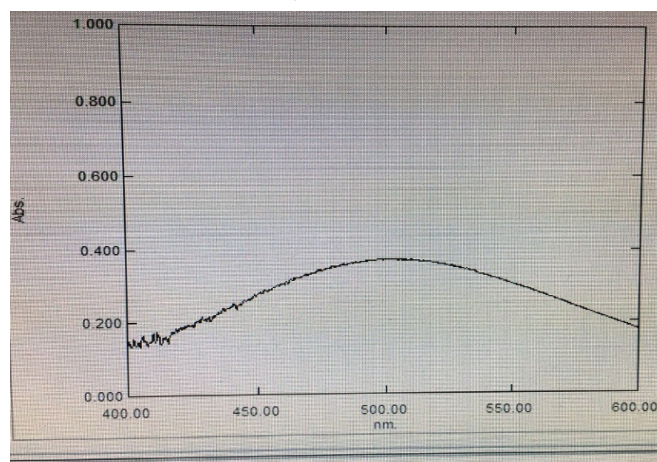
Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần và các số liệu thí nghiệm được tính toán bằng phần mềm Excel 2016. Phương trình đường chuẩn và các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Excel 2016. Phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA) với kiểm định Tukey được sử dụng để xác định sự khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các giá trị trung bình. Tất cả các kết quả được phân tích trên phần mềm Minitab (phiên bản 16.0). Số liệu thể hiện là giá trị trung bình và được làm tròn tới chữ số thập phân thứ 2 $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Các chữ số khác nhau ở cùng thông số khảo sát trên đồ thị thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp định lượng phytic acid bằng kĩ thuật quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS)

Chọn bước sóng đo: Bước sóng đo được lựa chọn thông qua phổ hấp thụ. Phổ hấp thụ của một chất là

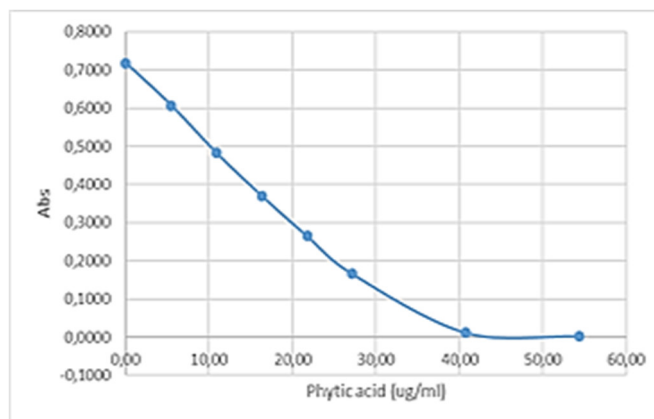
đường biểu diễn độ hấp thụ của chất đó theo bước sóng ánh sáng chiếu tới. Bước sóng được lựa chọn cho phương pháp so màu là bước sóng ở đó độ hấp thụ quang đo được đạt giá trị lớn nhất. Tiến hành quét phổ hấp thụ của dung dịch phytic acid chuẩn 16,31 $\mu\text{g/ml}$ trong vùng bước sóng từ 400 đến 600nm thu được kết quả như ở hình 1. Kết quả cho thấy, trong khoảng bước sóng khảo sát, độ hấp thụ của hợp chất phức màu có sự thay đổi rõ rệt và đạt cực đại ở bước sóng 502 nm. Kết quả này phù hợp theo nghiên cứu của của Gao và cộng sự [18] với kết quả khảo sát bước sóng là 500nm. Do vậy, trong nghiên cứu này, tiến hành định lượng phytic acid bằng phương pháp UV-VIS ở bước sóng 502nm.



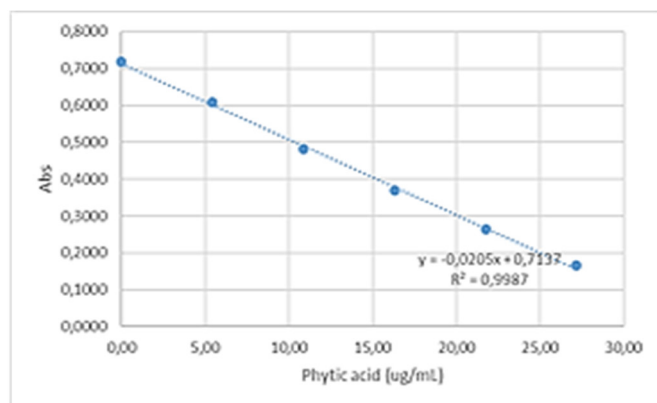
Hình 1. Đồ thị khảo sát bước sóng đo

Khoảng tuyến tính và đường chuẩn phytic acid:

Trên cơ sở khoảng nồng độ của dung dịch chuẩn và độ hấp thụ quang đo được, đồ thị và hàm tuyến tính của phytic acid được xác định. Kết quả thể hiện trong hình 2 cho thấy khoảng nồng độ tuyến tính của phytic acid là 0 - 27,18 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành xây dựng đường chuẩn của phytic acid trong mỗi lần khảo sát trên hệ thống UV-VIS đều cho hệ số $R^2 > 0,99$ đảm bảo độ tin cậy và chính xác của đường chuẩn [19].



a)



b)

Hình 2. Đường biểu diễn sự phụ giữa độ hấp thụ quang và nồng độ phytic acid (a) và đường chuẩn xác định nồng độ phytic acid (b)

Phương trình hồi qui tuyến tính xây dựng cho phytic acid có hệ số góc (a) là -0,0205 cho thấy sự phụ thuộc tuyến tính âm giữa độ hấp thụ quang với nồng độ phytic acid. Kết quả này phù hợp với cơ sở lý thuyết của phép đo là sự giảm cường độ màu của phức giữa ion Fe^{3+} và sulfosalicylic acid do phản ứng tạo phức của Fe^{3+} với phytic acid.

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

Kết quả xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phytic acid trên mẫu thử được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phytic acid

Các chỉ tiêu	Phytic acid ($\mu\text{g/ml}$) (n = 10)
Hàm lượng trung bình ($\mu\text{g/ml}$)	$3,65 \pm 0,19$
Giới hạn phát hiện (LOD) ($\mu\text{g/ml}$)	0,58
Giới hạn định lượng (LOQ) ($\mu\text{g/ml}$)	1,74
Tương quan giữa giá trị trung bình và LOD	6,29

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) đối với phytic acid lần lượt là $0,58\mu\text{g/ml}$ và $1,74\mu\text{g/ml}$. Tỷ số $\bar{x}/\text{LOD}$ đạt được nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn AOAC [15] là $4 \leq \bar{x}/\text{LOD} \leq 10$. Như vậy, kết quả giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng đều cho các giá trị phù hợp và có độ tin cậy cao.

Xác định độ lặp lại và độ tái lập:

Độ lặp lại được xác định thông qua phân tích mẫu thử lặp lại 10 lần với cùng một thử nghiệm viên. Độ tái lập được thực hiện trên cùng một mẫu thử lặp lại 10 lần với cùng một phương pháp, cùng hóa chất và cùng thiết bị,

nhưng được thực hiện bởi thử nghiệm viên thứ hai và tại thời điểm khác nhau. Kết quả độ lặp lại và độ tái lập được thể hiện trong bảng 2. Kết quả cho thấy, phép phân tích độ lặp lại có RSD_r% là 5,27% và độ tái lập có RSD_R là 5,23% đều nhỏ hơn 6,0% theo AOAC [19]. Như vậy, phép phân tích hàm lượng phytic acid đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp.

Bảng 2. Độ lặp lại và độ tái lập của phytic acid

Các chỉ tiêu	Độ lặp lại (n = 10)	Độ tái lập (n = 10)
Hàm lượng trung bình (mg/g CK)	$6,31 \pm 0,33$	$6,53 \pm 0,34$
Độ lặp lại (RSD _r %)	5,27	
Độ tái lập (RSD _R %)		5,23

Độ thu hồi của phương pháp:

Kết quả độ thu hồi của phương pháp được trình bày trong bảng 3. Độ thu hồi của 3 mức thêm chuẩn có nồng độ chất phân tích từ 10 - 100ppm theo quy định của AOAC (bảng A5, 2016) cần đạt từ 80 - 110%. Như vậy, kết quả mà nghiên cứu xác định được đáp ứng tốt qui định về độ thu hồi của phương pháp.

Bảng 3. Độ thu hồi ở 3 mức thêm chuẩn của phytic acid

C ($\mu\text{g/ml}$)	C _{m+c} ($\mu\text{g/ml}$)	Độ thu hồi R% (n = 6)
0	10,27	
1LOQ	12,17	94,92
3LOQ	16,37	101,61
5LOQ	20,41	101,41

3.2. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian chiết đến hiệu quả chiết phytic acid

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi:

Phytic acid của mẫu thử được tách chiết bằng dung dịch HCl 2,4% ở nhiệt độ phòng trong thời gian 16h với các tỉ lệ nguyên liệu/dung môi khác nhau. Kết quả phân tích hàm lượng phytic acid của mẫu thử được giới thiệu ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng phytic acid

Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	Hàm lượng phytic acid (mg/g CK)
1/10	Dịch chiết đục
1/20	$6,86 \pm 0,10^b$
1/30	$7,44 \pm 0,35^a$
1/40	Dịch chiết đục
1/50	Dịch chiết đục

Ghi chú: Trong cùng một cột, số liệu mang chữ cái khác nhau thì khác nhau với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

Tỉ lệ nguyên liệu/dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng phytic acid ($p = 0,019$). Ở tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/10, 1/40 và 1/50, dịch chiết sau khi ủ và li tâm không trong, không thỏa mãn điều kiện áp dụng của định luật Lambert-Beer, là cơ sở của phương pháp so màu. Hàm lượng phytic acid chiết được tăng lên khi tỉ lệ nguyên liệu/dung môi tăng từ 1/20 đến 1/30. Điều này là do lượng dung môi dùng với tỉ lệ 1/30 đã đủ để chiết phytic acid có trong mẫu thử. Với mục đích của nghiên cứu là tìm điều kiện thích hợp để chiết nhiều nhất phytic acid từ mẫu thử, do đó, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30 được lựa chọn sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian chiết:

Để xác định ảnh hưởng của thời gian chiết đến quá trình tách chiết phytic acid từ mẫu nghiên cứu, tiến hành chiết phytic acid bằng dung dịch HCl 2,4%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 ở nhiệt độ phòng trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả được chỉ ra ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng phytic acid

Thời gian chiết (h)	Hàm lượng phytic acid (mg/g CK)
1	$6,79 \pm 0,99^e$
2	$7,39 \pm 0,50^{bcd}$
3	$7,82 \pm 0,12^{abcd}$
4	$8,62 \pm 0,15^a$
5	$8,30 \pm 0,16^{ab}$
6	$8,17 \pm 0,10^{abc}$
7	$8,21 \pm 0,16^{abc}$
8	$7,55 \pm 0,20^{bcde}$
9	$7,56 \pm 0,09^{bcde}$
10	$7,48 \pm 0,13^{bcde}$
16	$7,29 \pm 0,20^{de}$

Kết quả bảng 5 cho thấy thời gian chiết ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng phytic acid của mẫu khảo sát ($p = 0,000$). Khi thời gian chiết tăng từ 1 đến 4 giờ, hàm lượng phytic acid tăng từ $6,79 \pm 0,99$ đến $8,62 \pm 0,15$ mg PA/g CK. Khi thời gian chiết tăng từ 5 đến 7 giờ, hàm lượng phytic acid không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Sau đó, khi thời gian chiết tiếp tục tăng từ 8 đến 16 giờ, hàm lượng phytic acid giảm và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Điều đó cho thấy, thời gian chiết 4 giờ cho phép chiết hầu hết phytic acid từ mẫu thử.

Trong nhiều nghiên cứu về hàm lượng phytic trong mẫu thực phẩm, thời gian chiết được sử dụng là 16 giờ [18, 20], hoặc không khảo sát thời gian chiết mà lựa chọn

một thời gian cụ thể cho mẫu nghiên cứu [21]. Ảnh hưởng của thời gian chiết phytic acid từ thực vật cũng được chỉ ra trong nghiên cứu của Saad và cộng sự [22]. Thời gian chiết phytic acid từ cám gạo được khảo sát tại hai thời điểm 2 giờ và 3 giờ. Kết quả cho thấy, tại thời điểm thời gian chiết là 3 giờ, hàm lượng phytic acid từ cám gạo cao hơn và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Xuất phát từ kết quả các thí nghiệm trong nghiên cứu này, điều kiện thích hợp nhất để chiết phytic acid từ mẫu đậu đỗ là: HCl 2,4%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30 (g/ml) và thời gian chiết là 4 giờ. Điều kiện chiết này được sử dụng để xác định hàm lượng phytic acid trong các mẫu được lựa chọn khảo sát trong nghiên cứu này.

3.3. Phân tích hàm lượng phytic acid trong một số mẫu đậu đỗ

Sau khi xây dựng được phương pháp, lựa chọn được tỉ lệ nguyên liệu/dung môi và thời gian chiết, 14 mẫu đậu đỗ, 2 mẫu lạc và 4 mẫu vùng thu thập trên thị trường được xác định hàm lượng phytic acid. Kết quả phân tích (bảng 6) cho thấy, hàm lượng phytic acid trong khoảng từ 4,84 (đậu Hà Lan) đến 19,41 mg/g CK (vùng đen). Trong nghiên cứu của Salam và cộng sự [23], hàm lượng phytic acid dao động từ 13,5 đến 20,6 mg/g CK đối với các mẫu lạc nghiên cứu. Năm 2021, Feizollahi và cộng sự [24], đã báo cáo hàm lượng của phytic acid trong một số loại hạt, rau, dầu và nhân của một số mẫu nghiên cứu. Đa số các có hàm lượng phytic acid cao hơn, nhưng bên cạnh đó, có một số mẫu có hàm lượng phytic acid thấp hơn. Điều này có thể do các yếu tố như điều kiện sinh trưởng, đặc biệt là các giống hạt, kĩ thuật canh tác, hoặc do các yếu tố ngoại cảnh như môi trường, thời tiết,... Kết quả phân tích từ bảng 6 còn cho thấy, với cùng một loại hạt, thì hàm lượng phytic acid trong mẫu vỏ và mẫu nguyên vỏ cũng có sự khác biệt. Cụ thể, mẫu đậu xanh nguyên vỏ, hàm lượng phytic acid là 6,95 mg/g CK, trong khi, mẫu đậu xanh tách vỏ, thì giá trị của đại lượng này là 5,52 mg/g CK. Mẫu vùng vàng tách vỏ (10,17 mg/g CK) và vùng vàng nguyên vỏ (19,15 mg/g CK) cũng cho kết quả theo cùng xu hướng. Như vậy, hàm lượng phytic acid được báo cáo chủ yếu nằm ở thành phần vỏ hạt, do đó, nếu bỏ vỏ của một số loại hạt trong quá trình chế biến cũng làm giảm hàm lượng phytic acid. Vì vậy, cần đánh giá mối tương quan hàm lượng phytic acid và khối lượng vỏ của các mẫu đậu, các loại hạt, ngũ cốc..., đồng thời, đánh giá hàm lượng của các thành phần dinh dưỡng trong quá trình chế biến là cần thiết. Phytic acid là một chất kháng oxy hóa nhưng cũng cản trở sự hấp thụ những khoáng chất khác như sắt và kẽm. Do đó, việc hiểu rõ hàm lượng

phytic acid trong thực phẩm cũng rất quan trọng và cần thiết đối với dinh dưỡng và sức khỏe con người. Các mẫu khảo sát trong nghiên cứu này, hàm lượng phytic acid đều trên giới hạn định lượng LOQ là 1,74µg/ml, cho thấy, bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS có thể định lượng được hàm lượng phytic acid trên các mẫu đậu, đỗ, vùng lạc và có thể áp dụng trên nhiều loại mẫu với hàm lượng khác nhau.

Bảng 6. Hàm lượng phytic acid trong một số loại đậu đỗ (mg/g CK)

Loại nguyên liệu	Mã nguyên liệu	Phytic acid (n = 3)
Mẫu đậu	Đậu tương 1	7,34 ± 0,11
	Đậu tương 2	8,51 ± 0,23
	Đậu tương 2	9,63 ± 0,12
	Đậu tương 4	9,30 ± 0,08
	Đậu xanh nguyên vỏ	6,95 ± 0,16
	Đậu xanh tách vỏ	5,52 ± 0,20
	Đậu mắt ngọc	8,01 ± 0,49
	Đậu ngự	5,10 ± 0,27
	Đậu đỏ hạt nhỏ	6,10 ± 0,25
	Đậu đỏ hạt to	5,95 ± 0,11
	Đậu trắng	7,90 ± 0,36
	Đậu gà	5,58 ± 0,20
	Đậu đen	5,84 ± 0,16
	Đậu Hà Lan	4,84 ± 0,44
Mẫu vùng	Vùng đen	19,41 ± 0,69
	Vùng trắng	9,23 ± 0,23
	Vùng vàng tách vỏ	10,17 ± 0,22
Mẫu lạc	Vùng vàng nguyên vỏ	19,15 ± 0,22
	Lạc đỏ	8,12 ± 0,23
	Lạc trắng	6,76 ± 0,34

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác nhận được phương pháp định lượng phytic acid và điều kiện chiết phytic acid trên nền mẫu ngũ cốc. Trên máy quang phổ UV-VIS, bước sóng đo được sử dụng là 502 nm, trong khoảng tuyến tính của phytic acid từ 0 đến 27,18µg/ml đã xây dựng được đường chuẩn với R² bằng 0,9987 để định lượng hợp chất này. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 0,58µg/ml và 1,74µg/ml. Độ lặp lại 5,27%, độ tái lặp 5,23% và độ thu hồi từ 94,92% đến 101,61% đều đảm bảo theo quy định của AOAC 2016.

Điều kiện thích hợp nhất để chiết phytic acid từ mẫu ngũ cốc là dung dịch HCl 2,4%, tỉ lệ nguyên liệu/dung môi 1/30 và thời gian chiết 4 giờ. Thu thập và phân tích 20 loại đậu, vùng, lạc trong điều kiện được lựa chọn ở trên cho kết quả dao động từ 4,84 đến 19,41 mg phytic acid/g chất khô. Phương pháp phân tích dễ thực hiện, có độ chính xác, độ tin cậy cao, có thể áp dụng định lượng phytic acid trong các mẫu ngũ cốc.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Học viện Nông nghiệp Việt Nam tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này thông qua đề tài mã số T2024-08-26TĐ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Đặng Anh Dũng, *Acid phytic trong các loại đậu, hạt dinh dưỡng*. Dadanut, 2021.

[2]. Raboy V., "Progress in breeding low phytate crops," *Journal Nutrition*, 132, 2002

[3]. Loewus F., "Biosynthesis of phytate in food grains and seeds," *Food phytates*, 53-61, 2002.

[4]. Fredlund K., Isaksson M., Rossander-Hulthén L., Almgren A., Sandberg A. S. "Absorption of zinc and retention of calcium: Dose-dependent inhibition by phytate," *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 20(1), 49-57, 2006.

[5]. Lopez H.W., Leenhardt F., Coudray C., Révész C., "Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition?," *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 727-739, 2002.

[6]. Lönnnerdal B., "Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions," *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 749-758, 2002.

[7]. Vucenik I., Shamsuddin M., "Cancer Inhibition by Inositol Hexaphosphate (IP6) and Inositol: From Laboratory to Clinic," *Journal of Nutrition*, 133(11), 3778S-3784S, 2003.

[8]. Vikas K., Amit K.S., Harinder P.S.M, Klaus B., "Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review," *Food chemistry*, 120(4), 945-959, 2010.

[9]. Raboy V., Gerbası P. F., Young A. K., Stoneberg D. Sterra, Pickett G. Suewiya, Bauman T. Andrew, Murthy P.N. Pushpalatha, Sheridan F. William, Ertl S. David, "Origin and Seed Phenotype of Maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1," *Plant Physiol.*, 124, 355-368, 2000,

[10]. Barker C.J., Berggren P.O., "Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling," *Anticancer Res.*, 19(5A), 3737-3741, 1999

[11]. Harakeh S, Jariwalla RJ, Pauling L., "Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate," *Journal of Applied Nutrition*, 42(1), 18-28, 1990.

- [12]. Otake T., Mori H., Morimoto M., "Anti-HIV-1 activity of myo inositol hexaphosphoric acid (IP6) and myo-inositol hexasulfate (IS6)," *Anticancer Research*, 19, 3723-3726, 1999.
- [13]. Otake T., Shimonaka H., Kanai M., "Inhibitory effect of inositol hexasulfate and inositol hexaphosphoric acid (phytic acid) on the proliferation of the human immunodeficiency virus (HIV) in vitro," *Kansenshogaku Zasshi*, 63, 676-683, 1989.
- [14]. Heubner W., Stadtler H., "Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie; zeitschrift für die gesamte Biochemie," *Biochemische Zeitschrift*, 64, 422-437, 1914.
- [15]. Latta M., Eskin M., "A simple and rapid colorimetric method for phytate determination," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 1313-1315, 1980.
- [16]. Lehrfeld J., "High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column," *Cereal Chemistry*, 66, 510-515, 1989.
- [17]. Oberleas D., "Phytate content in cereals and legumes and methods of determination," *Cereal Foods World*, 28, 352-357, 1983.
- [18]. Gao Y., Shang C., Maroof M.A.S., Biyashev R.M., Grabau E.A., Kwanyuen P., Burton J.W., Buss G.R., "A Modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean," *Crop Science*, 47(5), 1797-1803, 2007.
- [19]. AOAC, "AOAC Official Methods of Analysis. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements," *Journal of AOAC International*, 1-18, 2016.
- [20]. Iosif A., Vaintraub Natalya A. Lapteva, "Colorimetric Determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing," *Analytical Biochemistry*, 175(1), 227-230, 1988.
- [21]. Wheeler EL, Ferrel PE., "A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions," *Cereal Chem*, 48, 312-420, 1971.
- [22]. Norazalina Saad N., Esa NM., Ithnin H., Shafie NH., "Optimization of optimum condition for phytic acid extraction from rice bran," *African Journal of Plant Science*, 5 (3), 168-176, 2011.
- [23]. Salam A., Lina S., "Effect of Processing Methods on Phytic Acid Content of Peanut and Wheat," *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(6), 2973-2976, 2019.
- [24]. Feizollahi E., Mirmahdi RS., Alaleh Zoghi A., Zijlstra RT., Roopesh, MS., Vasanthan T., "Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products," *Food Research International*. 143, 110284, 2021.

AUTHORS INFORMATION

Vu Thi Huyen, Tran Nhat Duy, Dang Cong Anh, Nguyen Xuan Bac

Faculty of Food Science and Technology, Vietnam National University of Agriculture, Vietnam