

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT VITAMIN NHÓM B (B₂, B₃, B₆, B₉) TRONG MẪU SỮA BỘT CÔNG THỨC

*Nguyễn Thị Ngọc Vân**, *Dương Tuyết Ngân*, *Lâm Vĩ Trang*,
Nguyễn Ngọc Nguyễn Trang, *Phạm Tuấn Thành*, *Hà Phi Long*,
Lê Thị Nhân Duyên, *Nguyễn Thị Đặng*, *Đỗ Trung Hiền*
Trường Đại học Y Dược Cần Thơ
*Email: ntnvan@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Vitamin B đóng vai trò quan trọng trong sự vận động, tăng trưởng và phát triển bình thường của con người. Ngày nay, trên thị trường có nhiều sản phẩm giúp bổ sung vitamin như các thực phẩm công thức sữa, bột dinh dưỡng... Trong đó, sữa công thức là thức ăn bổ sung quan trọng cho trẻ nhỏ. **Mục tiêu nghiên cứu:** Nghiên cứu quy trình chiết xuất vitamin nhóm B trong mẫu sữa bột công thức. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Các vitamin nhóm B (B₂, B₃, B₆, B₉) trong nền mẫu sữa bột công thức được tối ưu hóa quy trình chiết xuất và định lượng bằng phương pháp HPLC/PDA. **Kết quả:** Quy trình chiết tối ưu dùng 4mL dung môi trichloroacetic acid (TCA) ở nồng độ 3%, chiết siêu âm trong 25 phút và tủa protein lặp lại 2 lần. **Kết luận:** Phương pháp chiết xuất đơn giản, hiệu quả, lặp lại và độ thu hồi cao, phù hợp với quy mô phòng thí nghiệm nhằm phục vụ cho nghiên cứu định lượng các vitamin nhóm B (B₂, B₃, B₆, B₉).

Từ khóa: Vitamin B, sữa bột công thức, chiết xuất.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF EXTRACTION B₂, B₃, B₆, B₉ VITAMINS IN FORMULA MILK POWDER

*Nguyen Thi Ngoc Van**, *Duong Tuyet Ngan*, *Lam Vi Trang*,
Nguyen Ngoc Nguyen Trang, *Pham Tuan Thanh*, *Ha Phi Long*,
Le Thi Nhan Duyen, *Nguyen Thi Dang*, *Do Trung Hien*
Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Vitamin B plays an important role in human growth and development. Nowadays, many products help supplement vitamins such as milk formula foods, and nutritional powders on the market. Among them, formula milk powder is an important supplementary food for young children. **Objective:** Optimization of extraction B vitamins from formula milk powder samples. **Materials and methods:** B vitamins (B₂, B₃, B₆, B₉) in the formula milk powder sample were optimized for extraction and quantification using the HPLC/PDA method. **Results:** The optimal extraction process used 4mL of trichloroacetic acid (TCA) solvent at a concentration of 3%, ultrasonic extraction for 25 minutes, and protein precipitation repeated twice. **Conclusion:** The extraction method is simple, effective, repeatable and high recovery, suitable for laboratory scale to serve quantitative research on B vitamins (B₂, B₃, B₆, B₉).

Keywords: B vitamins, formula milk powder, extraction

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vitamin B đóng vai trò quan trọng trong sự vận động, tăng trưởng và phát triển bình thường của con người. Mặc dù, được tìm thấy trong khá nhiều các loại thực phẩm nhưng tình trạng thiếu vitamin nhóm B đặc biệt là ở trẻ em hiện nay vẫn đang tăng và trở thành một vấn đề đáng lo ngại. Rất nhiều trường hợp do bệnh lý hoặc chế độ dinh dưỡng kém dẫn tới thiếu vitamin B, gây ra ảnh hưởng xấu cho sức khỏe. Ngày nay, trên thị trường có nhiều sản phẩm giúp bổ sung vitamin như các thực phẩm công thức sữa, bột dinh dưỡng... hoặc

thuộc dưới dạng viên vitamin B đơn hay hỗn hợp các vitamin. Trong đó, sữa công thức là thức ăn bổ sung quan trọng cho trẻ nhỏ. Hiện nay Bộ Y Tế đã ban hành các Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với các sản phẩm dinh dưỡng công thức [1], [2], [3] quy định hàm lượng cũng như phương pháp phân tích các chất dinh dưỡng, bao gồm các vitamin nhóm B. Việc xác định chính xác hàm lượng các vitamin được bổ sung có ý nghĩa trong vấn đề đảm bảo quyền lợi và sức khỏe của người tiêu dùng.

Do đó, việc định lượng một cách chính xác các vitamin B trong thực phẩm đặc biệt là sữa đang trở nên cấp thiết để xác định mối tương quan giữa tác động của nó đối với sức khỏe trẻ em nói riêng và con người nói chung. Do đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích xây dựng phương pháp chiết xuất đơn giản, hiệu quả, lặp lại và có thời gian chiết ngắn, độ thu hồi cao, phù hợp với quy mô phòng thí nghiệm nhằm phục vụ cho nghiên cứu định lượng các vitamin nhóm B (B₂, B₃, B₆, B₉) có trong nền mẫu sữa bột công thức.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, chất chuẩn

Methanol, acid orthophosphoric (HPLC) từ Merk (Đức). Trichloroacetic acid (Trung Quốc). Chuẩn riboflavin (Vitamin B₂) hàm lượng 98,6%, chuẩn Nicotinamid (Vitamin B₃) hàm lượng 99,9%, chuẩn Pyridoxin hydroclorid (Vitamin B₆) hàm lượng 99,8%, chuẩn Acid folic (Vitamin B₉) hàm lượng 91,8% của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương.

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng Máy HPLC SHIDMADZU LC-20AD (Shimadzu, Nhật), cột Phenomenex C₁₈ (250mm× 4,6mm, 5µm), cân phân tích 4 số, 5 số Mettler Toledo (Mettler Toledo, Mỹ), bể siêu âm Elma Ultrasonic (Elma, Đức), máy ly tâm EBA 200 (Hettich, Đức) và các thiết bị khác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình chiết tối ưu

Dựa trên điều kiện xử lý mẫu của các nghiên cứu bởi Joon Hyuk Suh cùng *cộng sự* [4] và của Soledad Albalá-Hurtado cùng *cộng sự* [5] đã được công bố và độ tan của các chất phân tích, dung môi được lựa chọn để khảo sát là acid trichloroacetic (TCA).

Tiến hành tối ưu 4 yếu tố với 5 mức khác nhau mỗi yếu tố: Thể tích dung môi TCA (3 ml; 3,5 ml; 4 ml; 4,5 ml và 5 ml); Nồng độ dung môi TCA (1%, 2%, 3%, 4% và 5%), thời gian chiết siêu âm (5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút), số lần chiết (1, 2, 3, 4 lần). Khi tiến hành khảo sát từng yếu tố ảnh hưởng thì điều kiện chiết cho những yếu tố còn lại được cố định. Lượng sữa bột được sử dụng là 1g.

Đánh giá kết quả: Dựa trên tổng diện tích đỉnh của các pic các vitamin nhóm B (B₂, B₃, B₆, B₉) trên sắc ký đồ bằng phương pháp HPLC/PDA để chọn điều kiện chiết tối ưu.

Phương pháp định lượng vitamin nhóm B trong nền mẫu sữa bột bằng HPLC/PDA

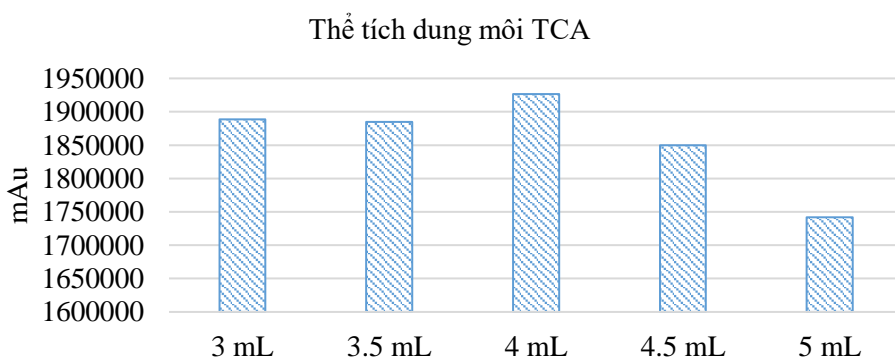
Cân chính xác khoảng 1g sữa bột, cho vào ống ly tâm. Pha loãng trong khoảng 3 ml nước ấm 40°C. Sử dụng Ax mL dung môi TCA ở nồng độ Bx, sau đó vortex trong 1 phút và ly tâm 5 phút ở tốc độ 5000 vòng sau mỗi lần tua. Gạn lấy lớp trong phía trên và tiếp tục tua Cx lần. Gộp lớp trong phía trên của tất cả các lần tua lại, cho vào bình định mức 10 mL, điền đủ bằng đệm phosphate. Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiến hành sắc ký. Điều kiện sắc ký cụ thể được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký	Luna C ₁₈ (5 μm 4,6x 250 mm) Phenomenex		
Pha động B	Methanol		
Pha động D	Đệm NaH ₂ PO ₄		
Chương trình gradient	Thời gian (phút)	Pha động B (%)	Pha động D (%)
	0,01	10	90
	7,00	10	90
	7,01	40	60
	15,00	40	60
	15,01	10	90
	20,00	10	90
Tốc độ dòng	1 mL/phút		
Thể tích tiêm	20 μL		
Nhiệt độ cột	30°C		
Bước sóng phát hiện	270 nm với niacin và riboflavin và 290 nm với acid folic và pyridoxin		
Đầu dò	PDA		

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Khảo sát thể tích dung môi chiết



Hình 1. Đồ thị biểu diễn kết quả tổng diện tích đỉnh của khảo sát thể tích dung môi chiết

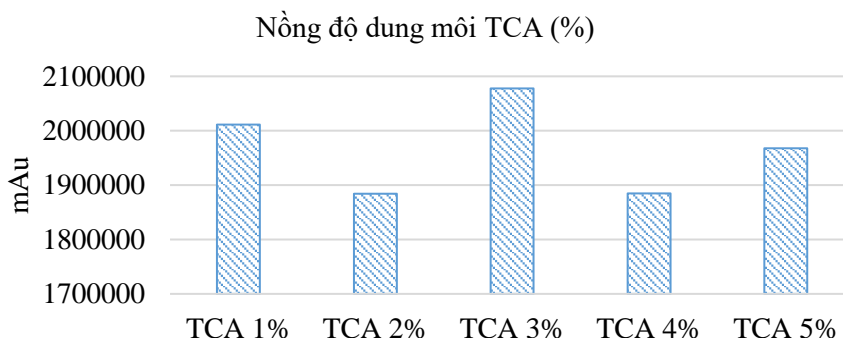
Nhận xét: Qua kết quả cho thấy khi tăng dần thể tích dung môi chiết, tổng diện tích đỉnh của 4 vitamin B tăng dần đến bão hòa tại thể tích TCA 4ml sau đó giảm dần ở thể tích 4,5 ml và 5 ml. Do đó chọn thể tích 4 ml để tiếp tục khảo sát yếu tố tiếp theo.

Bảng 2. Hiệu suất chiết khảo sát thể tích dung môi chiết

Chất phân tích	Thể tích dung môi	Hiệu suất chiết (%)				
		3 ml	3,5 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml
Vitamin B ₃		89,66	105,28	102,82	95,82	78,69
Vitamin B ₂		117,84	101,64	103,75	106,82	105,93
Vitamin B ₆		82,97	97,05	98,69	87,73	84,99
Vitamin B ₉		77,99	84,79	88,92	81,18	70,95

Nhận xét: Tiến hành khảo sát tỷ lệ dung môi chiết TCA ở 5 thể tích khác nhau 3 ml; 3,5 ml; 4 ml; 4,5 ml và 5 ml kết quả cho thấy các vitamin nhóm B đều có hiệu suất chiết trong khoảng từ 70% - 120%. Ở thể tích dung môi chiết TCA là 4 ml cho thấy hiệu suất chiết nằm trong khoảng từ 88% - 104% và có tổng diện tích đỉnh 4 chất phân tích cao nhất. Vì vậy chọn thể tích dung môi TCA là 4 ml để tiến hành khảo sát tiếp theo.

Khảo sát nồng độ TCA



Hình 2. Đồ thị biểu diễn kết quả tổng diện tích đỉnh của khảo sát nồng độ TCA (%)

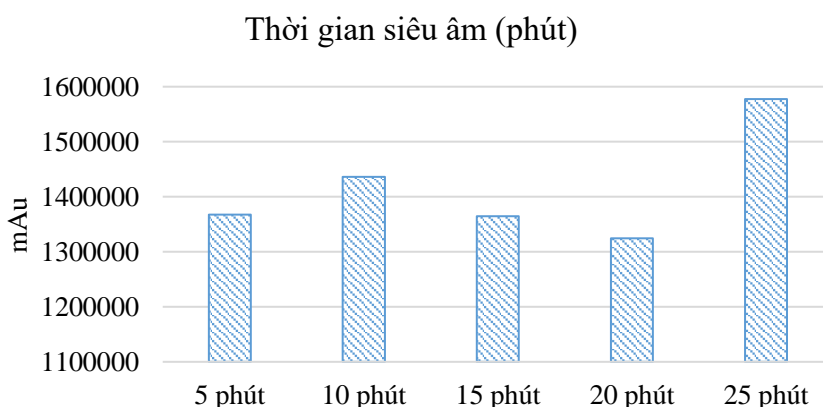
Nhận xét: Qua kết quả cho thấy khi tăng dần thể tích dung môi chiết, tổng diện tích đỉnh của 4 vitamin B tăng dần đến bão hòa tại thể tích TCA 4 mL sau đó giảm dần ở thể tích 4,5 mL và 5 mL. Do đó chọn thể tích 4 ml để tiếp tục khảo sát yếu tố tiếp theo.

Bảng 3. Hiệu suất chiết khảo sát nồng độ TCA (%)

Chất phân tích	Nồng độ TCA				
	Hiệu suất chiết (%)				
	1%	2%	3%	4%	5%
Vitamin B ₃	98,29	98,34	100,38	84,51	78,59
Vitamin B ₂	120,90	119,33	105,01	123,33	131,98
Vitamin B ₆	92,49	85,33	94,98	90,54	94,60
Vitamin B ₉	87,49	70,24	84,75	65,58	67,10

Nhận xét: Tiến hành khảo sát tỷ lệ nồng độ TCA ở 5 nồng độ khác nhau 1%, 2%, 3%, 4% và 5%. Kết quả cho thấy các vitamin nhóm B đều có hiệu suất chiết trong khoảng từ 65% - 125%. Ở nồng độ TCA 3%, cho thấy hiệu suất chiết nằm trong khoảng từ 84% - 105% và có tổng diện tích đỉnh 4 chất phân tích cao nhất. Vì vậy chọn nồng độ dung môi TCA là 3% để tiến hành khảo sát tiếp theo.

Khảo sát thời gian chiết siêu âm



Hình 3. Đồ thị biểu diễn kết quả tổng diện tích đỉnh của khảo sát thời gian chiết siêu âm

Nhận xét: Qua kết quả cho thấy khi tăng dần thời gian chiết siêu âm, diện tích đỉnh của 4 vitamin B dao động nhưng đạt cao nhất ở thời gian chiết siêu âm là 25 phút. Do đó chọn thời gian chiết siêu âm 25 phút để tiếp tục khảo sát yếu tố tiếp theo.

Bảng 4. Hiệu suất chiết khảo sát thời gian chiết siêu âm

Chất phân tích	Thời gian chiết				
	Hiệu suất chiết (%)				
	5 phút	10 phút	15 phút	20 phút	25 phút
Vitamin B ₃	87,78	87,44	86,31	87,34	97,85
Vitamin B ₂	72,14	78,52	74,60	72,81	93,73
Vitamin B ₆	72,77	78,15	70,87	71,74	81,17
Vitamin B ₉	88,10	87,36	86,01	80,35	95,10

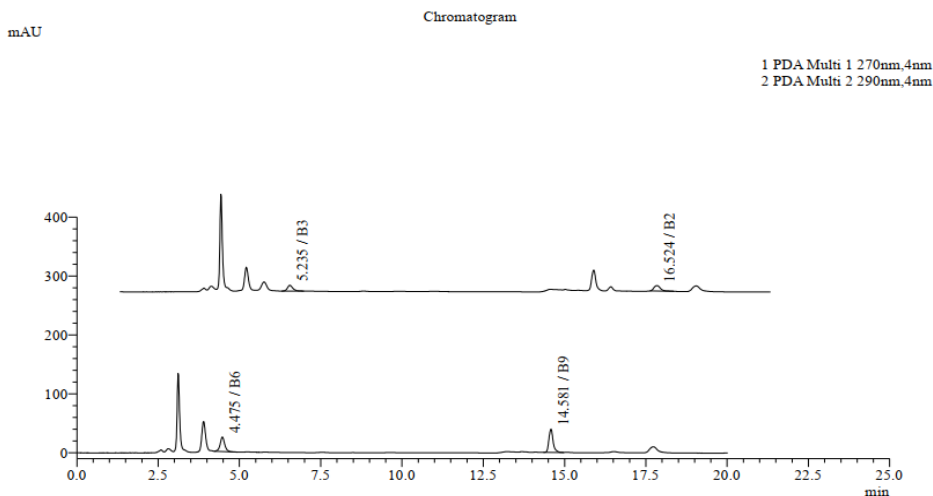
Nhận xét: Tiến hành khảo sát ở thời gian siêu âm khác 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút và 25 phút. Kết quả cho thấy các vitamin nhóm B đều có hiệu suất chiết trong khoảng từ 80% - 95%. Ở thời gian chiết siêu âm là 25 phút, cho thấy hiệu suất chiết nằm trong khoảng từ 81% - 95% và có tổng diện tích đỉnh 4 chất phân tích cao nhất. Vì vậy chọn thời gian chiết siêu âm là 25 phút để tiến hành khảo sát tiếp theo.

Khảo sát số lần chiết

Bảng 5. Hiệu suất chiết khảo sát số lần chiết

Chất phân tích	Số lần chiết			
	Hiệu suất chiết (%)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4
Vitamin B ₃	96,22	3,78	0	0
Vitamin B ₂	85,58	13,19	0	0
Vitamin B ₆	89,98	8,23	0	0
Vitamin B ₉	87,11	11,10	1,09	0

Nhận xét: Tiến hành khảo sát số lần chiết từ 1 đến 4 lần. Kết quả cho thấy sau khi chiết lần 2 hiệu suất chiết > 99% nên chọn chiết lặp 2 lần để chiết kiệt chất phân tích ra khỏi nền mẫu sữa.



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn với quy trình xử lý mẫu được tối ưu hóa

IV. BÀN LUẬN

Quy trình chiết xuất tối ưu được lựa chọn: Cân chính xác khoảng 1g sữa bột, cho vào ống ly tâm. Pha loãng trong khoảng 3 mL nước ấm 40°C, Sử dụng 4 mL dung môi TCA ở nồng độ 3%, sau đó vortex trong 1 phút. Chiết siêu âm 25 phút và ly tâm 5 phút ở tốc độ 5000 vòng sau mỗi lần tua. Gạn lấy lớp trong phía trên và tiếp tục tua 2 lần. Gộp lớp trong

phía trên của tất cả các lần tua lại, cho vào bình định mức 10 mL, điền đủ bằng đệm phosphate. Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiến hành sắc ký.

Sữa được coi là nguồn thực phẩm chính của con người, có hàm lượng dinh dưỡng cao giá trị. Thực tế là có hơn 100.000 loài phân tử khác nhau đã được xác định trong sữa khiến cho việc xử lý nền mẫu sữa đặc biệt là sữa công thức trở nên khá phức tạp [6]. Nhìn chung các nghiên cứu trong nước và trên thế giới với các loại sữa khác nhau như sữa lừ, sữa tươi, sữa mẹ,... đều cho ra các phương pháp xử lý mẫu với ưu và nhược điểm riêng nhưng nguyên tắc chung là phải cho kết tủa protein có trong nền mẫu các loại sữa. Phương pháp kết tủa protein trong sữa bằng acid trichloroacetic (TCA) được xuất phát từ Nhật Bản với các nghiên cứu của Evenson và cộng sự (1988) [6], Freed và cộng sự (1982) [7], Meyrand và cộng sự (1999) [8]. Phương pháp dùng TCA kết tủa protein có ưu điểm là độ thu hồi cao.

So sánh với nghiên cứu của tác giả Lê Thị Cúc (2015) [9], nghiên cứu này đã lựa chọn quy trình xử lý mẫu của Soledad Albalá-Hurtado [4] cùng cộng sự để thực hiện. Sử dụng 1ml dung môi TCA 20% để kết tủa protein trong mẫu, chọn cách lắc siêu âm để tăng hòa tan các vitamin và thời gian siêu âm là 5 phút. Quy trình xử lý mẫu này có ưu điểm là sử dụng dung môi phù hợp với chất phân tích, thời gian xử lý mẫu nhanh, tuy nhiên dùng với lượng ít dung môi TCA dẫn đến có thể tủa không hết protein có trong mẫu. Quy trình có hỗ trợ lắc siêu âm, để các vitamin hòa tan nhanh, tiết kiệm được thời gian xử lý mẫu.

So sánh với nghiên cứu của nhóm tác giả Ren cùng với cộng sự (2015) [11], đã dùng methanol làm dung môi xử lý mẫu sữa mẹ, được trộn trong 1 phút và ly tâm ở tốc độ 14.480 vòng trong 10 phút ở 4°C. Sau đó, phần kết tủa hòa với nước tinh khiết và được chiết lần nữa với dietyl ete. Quy trình xử lý mẫu này có ưu điểm là sử dụng methanol có hiệu suất chiết của phương pháp cao và loại bỏ được protein có trong các vitamin nhóm B, nhược điểm của quy trình này sử dụng methanol và dietyl ete là dung môi độc hại.

V. KẾT LUẬN

Quy trình chiết tối ưu dùng 4mL dung môi TCA ở nồng độ 3%, chiết siêu âm trong 25 phút và tủa protein lặp lại 2 lần. Phương pháp chiết xuất đơn giản, hiệu quả, lặp lại và độ thu hồi cao, phù hợp với quy mô phòng thí nghiệm nhằm phục vụ cho nghiên cứu định lượng các vitamin nhóm B (B₂, B₃, B₆, B₉).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Quy chuẩn quốc gia đối với sản phẩm dinh dưỡng công thức cho trẻ đến 12 tháng tuổi, QCVN 11-1/2012. 2012.
2. Bộ Y tế. Quy chuẩn quốc gia đối với sản phẩm dinh dưỡng công thức với mục đích ăn bổ sung cho trẻ từ 6 đến 36 tháng tuổi, QCVN 11-3/2012. 2012.
3. Bộ Y tế. Quy chuẩn quốc gia đối với sản phẩm dinh dưỡng công thức với mục đích y tế đặc biệt cho trẻ đến 12 tháng tuổi, QCVN 11-2/2012. 2012.
4. Byung Kyu Lee, Joon Hyuk Suh, Dong-Hyug Yang, Han Young Eom, Unyong Kim, Junghyun Kim, Hyeyeon Lee, and Sang Beom Han. Simultaneous Determination of B Group Vitamins in Supplemented Food Products by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection. *Bull. Korean Chemical Society*. 2011. 32(8), 2648-2656. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.8.2648>.
5. Soledad Albalá-Hurtado, M. Teresa Veciana-Nogués, María Izquierdo Pulido, Abel Mariné-Font. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid

- chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997. 778, 247-253, [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00387-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00387-7).
6. Samanidou, V. F., & Karageorgou, E. G. An overview of the use of monoliths in sample preparation and analysis of milk. *Journal of Separation Science*. 2011. 34(16-17), 2013-2025, doi:10.1002/jssc.201100101.
 7. Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S., Bergdoll, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreaks of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*. 1988. 25, 311 – 316, doi:10.1016/0168-1605(88)90057-8.
 8. Freed, R.C., Evenson, M.L., Reiser, R.F., Bergdoll, M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982. 44, 1349 – 1355, doi:10.1128/aem.44.6.1349-1355.1982.
 9. Meyrand, A., Atrache, V., Bavai, C., Montet, M.P., VernozyRozand, C. Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Letters in Applied Microbiology*. 1999. 28, 411 – 415, doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00562.x.
 10. Lê Thị Cúc. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời các vitamin B1, B2, B6, B9 trong sản phẩm dinh dưỡng công thức cho trẻ em bằng HPLC. 2015. Luận văn Tốt nghiệp Dược sĩ đại học. Trường Đại học Dược Hà Nội.
 11. Ren, X. N., Yin, S. A., Yang, Z. Y., Yang, X. G., Bing, S. H. A. O., Ren, Y. P., & Zhang, J. Application of UPLC-MS/MS method for analyzing B-vitamins in human milk. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2015. 28(10), 738-750. doi:10.3967/bes2015.104.
-