

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA DẦU HẠT THỰC VẬT

Nguyễn Thị Thủy*, Hứa Thị Toàn
Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Việt Nam nằm trong khu vực nhiệt đới gió mùa, có thảm thực vật đa dạng và phong phú cả về số lượng cũng như chất lượng. Trong số 10.400 loài thực vật bậc cao đã được phát hiện có khoảng 564 loài là các cây có dầu [2]. Chúng có một vai trò quan trọng trong toàn cảnh bức tranh tài nguyên thực vật nước ta và cuộc sống cộng đồng, không chỉ là nguyên liệu thiết yếu cho công nghiệp chế biến (son, xà phòng, thực phẩm, mỹ phẩm...) và xuất khẩu mà nhiều dầu hạt thực vật còn được sử dụng trong dân gian như các bài thuốc cổ truyền để điều trị các bệnh viêm nhiễm, chóng lão hóa và một số căn bệnh hiểm nghèo. Trong khi một số loại dầu hạt thực vật chủ lực như dầu đậu nành, dầu lạc, dầu vừng, dầu trẩu... đã được nhà nước đầu tư áp dụng những công nghệ tiên tiến để sản xuất thì những nghiên cứu chuyên sâu khoa học và có hệ thống về lipid và các axit béo từ nguồn gốc thiên nhiên ở nước ta gần như còn bỏ ngỏ. Vậy để có kết quả chính xác chúng ta cần có những phương pháp nghiên cứu khoa học, phù hợp với từng đối tượng nghiên cứu. Trong bài báo này chúng tôi đã đưa ra một số phương pháp xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của dầu hạt thực vật Việt Nam.

Từ khóa: *Lipid, thành phần hóa học, hoạt tính sinh học, sắc kí, oxi hóa*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các nguồn tài nguyên đang ngày càng khan hiếm, do đó những kiến thức về tiềm năng di truyền của hạt thực vật ngày càng trở nên quan trọng hơn. Các loại hạt có thành phần dinh dưỡng chính là carbohydrate, protein và chất béo, đồng thời chứa một phần lớn các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau chưa được sử dụng, đây được coi là nguyên liệu hấp dẫn cho việc sản xuất các thực phẩm bổ dưỡng và an toàn cũng như là nguồn tài nguyên sử dụng trong công nghiệp y, dược. Để làm được điều này, chúng tôi cung cấp một số phương pháp chính xác, khoa học để xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của dầu hạt thực vật ở Việt Nam.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tổng quan về lipid

Vào đầu những năm 1950, trong lĩnh vực Hoá học các Hợp chất thiên nhiên trên thế giới đã xuất hiện ngành nghiên cứu hoá học các chất béo (lipid). Lipid (tiếng Hy Lạp cổ - lipid nghĩa là mỡ hay là chất béo) là những hợp

chất hữu cơ tự nhiên rất phổ biến trong tế bào các cơ thể sống, trong động vật, thực vật và vi sinh vật. Lipid là hợp phần cấu tạo quan trọng của các màng sinh học, là nguồn cung cấp năng lượng (376.106 J/kg), nguồn cung cấp các vitamin A, D, E, F, K và F cho cơ thể sống, góp phần tạo ra kết cấu cũng như vị đặc trưng của rất nhiều thực phẩm. Trong tự nhiên những hợp chất thuộc về lớp chất lipid hiểu theo nghĩa rộng rất đa dạng, chúng có thể tồn tại dưới các dạng: các hydrocarbon bậc cao, sterol, alcol, aldehyde hydrate, axit béo và các sản phẩm thứ cấp của chúng như glyceride, sáp, phospholipid, glycolipid, sulfolipid. Trong số đó các dẫn xuất tocopherol và axit béo có hoạt tính sinh học được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm.

Hiện nay, các nguồn tài nguyên đang ngày càng khan hiếm, do đó những kiến thức về tiềm năng di truyền của hạt thực vật hoang dã ngày càng trở nên quan trọng hơn. Do đó chúng tôi lựa chọn một số phương pháp phù hợp và chính xác để xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của dầu hạt thực vật như dưới đây.

* Tel: 0977 008553, Email: Thuy.hoa.nl@gmail.com

Phương pháp xác định thành phần hóa học của lipid

Chiết lipid theo phương pháp ISO 659/2009

Dầu béo từ mẫu hạt được chiết tách và xác định hàm lượng lipid theo phương pháp ISO/DIS 659:1988. Mẫu hạt được lựa chọn theo tiêu chuẩn, đem xay nhỏ trong máy xay rồi được chiết bằng dung môi hữu cơ n-hexan và được hỗ trợ bởi sóng siêu âm trong 6 giờ. Dịch chiết thu được đem cất loại kiệt dung môi trên máy quay cất dung môi chân không.

Xác định thành phần của các axit béo theo phương pháp ISO/FDIS 5509/1998 LB Đức. Phân tích trên máy sắc ký khí HP-6890, ghép nối với Mass Selective Detector Agilent 5973

- Thành phần và hàm lượng axit béo xác định theo phương pháp ISO/FDIS 5509:1998 LB Đức: lấy 100mg dầu béo hoà tan trong 1ml heptan sau đó chuyển hóa thành dạng methyl ester để phân tích trên máy sắc ký khí. Máy sắc ký khí hãng Hewlett Packard instrument Model 5890 Series II, CP-Sil 88 (cột mao quản chuyên dụng CP-Sil 88, 100mm/0.25mm/0.25 μ m với hệ chất chuẩn C16:0, C18:0) [3]. Chương trình nhiệt độ: nhiệt độ 155-220 $^{\circ}$ C(1.5 $^{\circ}$ C/min), tốc độ: 10 $^{\circ}$ C/phút, 260 $^{\circ}$ C/5 phút; Split:1:50; injector 250 $^{\circ}$ C, detector 250 $^{\circ}$ C, khí mang 36cm/s hydrogen, detector gas: 30ml/min hydrogen. 300ml/min không khí và 30ml/min nitrogen, bơm mẫu tự động với thể tích 0,9 μ l. Sử dụng phổ dữ liệu chất chuẩn thư viện. Nhận dạng các axit béo bằng phần mềm chuyên dụng tính toán chuyển đổi qua giá trị thời gian lưu tương đương ELC (Equivalent Chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids) cho cột mao quản chuyên dụng CP-Sil 88, có sử dụng hệ chất chuẩn C16:0, C18:0 trên máy C-R3A theo công thức sau:

$$ECL = 16 + \frac{2(LgRT_x - LgRT_{16:0})}{LgRT_{18:0} - LgRT_{16:0}}$$

Lấy 10mg dịch chiết hexan của mẫu hạt được methyl hóa bởi tác nhân CH₃ONa/MeOH (1%). Sau đó methyl của lipid tổng được phân tích trên máy GC.

Xác định thành phần của các tocopherol theo phương pháp ISO 9936/2016

- Hòa tan phần mẫu thử trong n-heptan và dùng sắc ký lỏng hiệu năng cao để tách từng loại tocol. Dùng hệ số hiệu chuẩn xác định được từ các dung dịch hiệu chuẩn để tính hàm lượng của từng loại tocol.

- Thành phần và hàm lượng tocopherol xác định theo phương pháp ISO/9936:2016: hoà tan 70mg-100mg dầu béo trong 100 μ l heptan sau đó lấy 20 μ l ra và đem phân tích trên thiết bị sắc ký lỏng cao áp HPLC hãng Merck-Hitachi F-1000 Fluorescence Spectrophotometer, 295/330nm, D-2500. Mẫu được bơm tự động trong buồng bơm mẫu tự động Merck 655-A40, cột 25cm x 4.6mm ID, tốc độ: 1.3ml/phút, hệ mobilephase sử dụng heptan/tert.butyl metylete (99+1,v/v), Chromato integrator, hệ dung môi chạy heptan/tert.butyl metylete (99+1,v/v).

Nghiên cứu xác định thành phần và hàm lượng của các triacylglycerol, phytosterol sẽ được xác định bởi:

Sắc kí lớp mỏng (TLC)

Sắc kí lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufoalien 60 F254 (Marck 1,05715), RP18 F254S (Merck). Phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄10% được phun đều trên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng trên bếp điện từ từ tới khi xuất hiện màu.

Sắc kí lớp mỏng điều chế

Sắc kí lớp mỏng điều chế được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silica gel 60G F254 (Merck, kí hiệu là 105875), phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch là H₂SO₄ 10%, hơ nóng để phát hiện vết chất, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ bằng dung môi thích hợp.

Sắc kí cột (CC)

Sắc kí cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha

thường có kích thước hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50 μ m, Fujisilisa Chemical Ltd.).

Xác định thành phần của phospholipid bằng phương pháp: LC-DAD, LC-MS, GC-MS

- Nghiên cứu xác định thành phần và hàm lượng các lớp chất trong lipid tổng

- Nghiên cứu thành phần và hàm lượng của phospholipid. Thành phần và hàm lượng các axit béo trong các lớp chất phospholipit TL, PL, NL. Sử dụng sắc kí cột, sắc kí bản mỏng, sắc kí lỏng hiệu năng cao HPLC để phân lập các lớp chất phospholipit: PE, PC, PI, LPE, PA, PG và 01 lớp chất SQDG.

Các phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa

Phương pháp Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC)

TEAC là phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa so sánh với khả năng chống oxy hóa của Trolox (Demirel và cộng sự, 2009) [3]. Cation ABTS⁺ [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS)] là một gốc tự do bền.

Phương pháp FRAP (ferric reducing-antioxidant power)

Nguyên tắc xác định hoạt tính chống oxy hóa của phương pháp này là dựa trên khả năng của các chất chống oxy hoá trong việc khử phức Fe³⁺-TPTZ [2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)] (màu tím) thành phức Fe²⁺-TPTZ (màu xanh) trong môi trường acid. Khi đó, độ tăng cường độ màu xanh tỷ lệ với hàm lượng chất chống oxy hóa có trong nguyên liệu. Mức độ tăng cường độ màu này được đo ở bước sóng 593 nm trong sự so sánh với chất chuẩn là dung dịch FeSO₄ hay BHT (Butylated Hydroxy Toluene) (Strain và Benzie, 1996). Khi cho phức Fe³⁺-TPTZ vào môi trường chứa chất chống oxy hóa, các chất chống oxy hóa sẽ nhường điện tử cho phức này và sinh ra Fe²⁺-TPTZ. Kết quả tính toán là mmol Fe²⁺/g chất khô. Do đó, khi kết quả tính toán ra lớn thì chúng ta có thể suy đoán

rằng trong môi trường phản ứng đó, số lượng các phân tử có thể nhường điện tử là cao. Tuy nhiên, điều này không hoàn toàn đúng vì một phân tử chất chống oxy hóa có thể khử nhiều phức Fe³⁺-TPTZ cùng lúc. Đây là một hạn chế của phương pháp FRAP.

Phương pháp DPPH

Nguyên tắc của phương pháp: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo ra các gốc tự do bền trong dung dịch ethanol bão hoà. Khi cho các chất thử nghiệm vào hỗn hợp này, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp phụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống oxi hoá được đánh giá thông qua giá trị hấp phụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515 nm.

Phương pháp ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

Phương pháp ORAC xác định khả năng hấp thụ gốc tự do chứa oxy hoạt động [3]. Phương pháp này đo mức độ phân hủy do bị oxy hóa của fluorescein khi có sự hiện diện của gốc peroxy. Phản ứng trong điều kiện này được so sánh với 16 phản ứng trong sự hiện diện của chất chuẩn Trolox (hay vitamin E) và trong hiện diện của mẫu chứa chất chống oxy hóa cần xác định hoạt tính. Khi fluorescein bị oxy hóa, cường độ phát huỳnh quang sẽ giảm đi. Tiến hành đo độ giảm cường độ phát quang này liên tục trong 35 phút sau khi thêm chất oxy hóa vào. Khi có mặt chất chống oxy hóa, sự phân rã fluorescein sẽ chậm hơn. Xây dựng đường cong biểu diễn sự phụ thuộc độ giảm phát huỳnh quang theo thời gian và vùng dưới đường cong dùng để tính toán. Kết quả tính toán là mmol Trolox/g mẫu.

Phương pháp TRAP (total radical-trapping antioxidant potential)

Phương pháp TRAP sử dụng gốc peroxy được tạo thành từ 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Khi cho AAPH vào môi trường plasma, các chất khử sẽ bị oxy hóa. Quá trình oxy hóa

này được đo đạt thông qua hàm lượng oxy tiêu thụ bằng một điện cực. Khi có mặt chất chống oxy hóa trong môi trường plasma, quá trình oxy hóa sẽ xảy ra chậm hơn. Giá trị TRAP của mẫu thí nghiệm được tính toán dựa vào độ dài pha lag của mẫu so với độ dài pha lag của mẫu trắng và độ dài pha lag của chất chuẩn là dung dịch Trolox. Kết quả tính toán là mmol Trolox/kg mẫu rắn hoặc mmol Trolox/l mẫu lỏng.

Phương pháp Lipid assay

Phương pháp này đánh giá sự khác biệt trong tốc độ oxy hóa acid linoleic bởi gốc ABAP trong mối quan hệ với chất chuẩn là tocopherol [3]. Trước và trong suốt quá trình xảy ra phản ứng, nhiệt độ của hỗn hợp {[70 µl của linoleic acid (2,3 mmol/l)]; 100 ml đệm phosphate 0,05 M (Natri phosphate hòa tan trong nước; 2.88 g SDS; pH 7.4)} được điều chỉnh và duy trì ở 4°C. Lấy 2 µl của dung dịch này cho vào 0,01 ml ABAP (0,04 M). Sau 2-5 phút phản ứng, lấy 0,02 ml dịch chiết cho vào hỗn hợp này. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở 236 nm.

Phương pháp FTC (ferric thiocyanat)

Mục đích của phương pháp này là khảo sát khả năng làm giảm sự peroxide hóa lipid của chất kháng oxy hóa. Thông thường, các gốc oxy tự do sẽ peroxide hóa lipid, tạo thành peroxide. Peroxide sẽ oxy hóa Fe^{2+} thành Fe^{3+} , phức của Fe^{3+} với SCN^- có giá trị hấp thụ tối đa tại 500 nm. Giá trị hấp thụ cao đồng nghĩa với sự peroxide hóa lipid cao trong suốt quá trình ủ dung dịch. Mẫu dung dịch

có chứa chất kháng oxy hóa sẽ cho giá trị độ hấp thụ thấp hơn mẫu trắng không có chất kháng oxy hóa.

Phương pháp tổng năng lực khử (reducing power)

Nguyên tắc xác định hoạt tính chống oxy hóa của phương pháp này là dựa trên khả năng của các chất chống oxy hoá trong việc khử phức $K_3[Fe(CN)_6]$ thành phức $K_4[Fe(CN)_6]$, phức này tác dụng với $FeCl_3$ thành $KFe[Fe(CN)_6]$ (xanh Pruss) [3]. Khi đó, độ tăng cường độ màu xanh tỷ lệ với hàm lượng chất chống oxy hóa có trong nguyên liệu. Mức độ tăng cường độ màu này được đo ở bước sóng 690 nm trong sự so sánh với chất chuẩn là dung dịch acid ascorbic.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã đưa ra được kết quả tổng quan về một số phương pháp xác định thành phần hóa học và phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa của dầu hạt thực vật là tài liệu tham khảo cần thiết cho các cơ sở sản xuất lựa chọn, áp dụng trong đánh giá chất lượng sản phẩm của cơ sở.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Quốc Long, Châu Văn Minh (2005), *Lipit và các axit béo hoạt tính sinh học có nguồn gốc thiên nhiên*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật
2. Phạm Văn Nguyên (1981), *Những cây có dầu béo ở Việt Nam*, Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật
3. Ulleberg, E.K.; Comi, I.; Holm, H.; Herud, E.P.; Jacobsen, M.; Vegarud, G.E. (2011), "Human gastrointestinal juices intended for use in in vitro digestion models", *Food Digestion* 2, pp 52-61.

SUMMARY

THE METHODS TO DEFINE CHEMICAL COMPOSITIONS, BIOLOGICAL ACTIVITIES OF VEGETABLE SEED OIL OF VIETNAM

Nguyen Thi Thuy* , Hua Thi Toan
University of Agriculture and Forestry - TNU

Vietnam locates in monsoon tropical area with abundant and diversified vegetation in quality as well as quantity. Of the 10.400 tracheophyta species were discovered, there were about 564 species of oil plants. These plant species play an important role in the whole of plant resource picture and community life of our country, not only are they be essential ingredients for the processing industry (paint, soap, food, cosmetics...) and export but many kinds of vegetable seed oil also were used in the folk such as traditional remedies for treatment of ageing resistant, inflamed diseases, and other serious diseases. While some main vegetable seed oils such as soybean, peanut, sesame, tung oil, etc., have been invested and applied the advanced technologies to produce by the state, the scientific deeply and systematic researches about fat acids and lipids from natural sources in our country have been still almost opened. Therefore, to obtain accurate results we need to have suitable scientific research methods for each studied object. In this paper, we suggested several methods to determine the chemical compositions and the biological activities of vegetable oil of some plants in Vietnam.

Keywords: *Lipid, chemical composition, biological activity, chromatography, oxidation*

Ngày nhận bài: 17/4/2017; Ngày phản biện: 21/6/2017; Ngày duyệt đăng: 30/9/2017

* Tel: 0977 008553, Email: Thuy.hoa.nl@gmail.com