

CẢI TIẾN QUI TRÌNH XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN AXIT AMIN

Nguyễn Huy Du, Nguyễn Văn Đông, Nguyễn Thị Hồng Nhung,

Nguyễn Thị Thùy Luyện, Nguyễn Ánh Mai

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 24 tháng 01 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 28 tháng 03 năm 2012)

TÓM TẮT: Phân tích thành phần axit amin (AA) là cách duy nhất để đánh giá thành phần đạm dinh dưỡng (đạm thật) trong mẫu thực phẩm. Tuy nhiên, quy trình phân tích thường phức tạp và tốn kém nhiều thời gian. Cải tiến kỹ thuật này là điều cần thiết góp phần ngăn chặn tình trạng lạm dụng các chất đạm không dinh dưỡng (đạm giả) trong thực phẩm hiện nay. Cải tiến quan trọng nhất trong nghiên cứu của chúng tôi bao gồm: (i) Đổi mới qui trình dansyl hóa các AA bằng cách sử dụng hệ đệm borat, để có được một quy trình tạo dẫn xuất đơn giản và ổn định cho tất cả các AA phổ biến; (ii) Cải thiện sự phân tách các AA bằng kỹ thuật ghép cặp ion ở pH thấp sử dụng pha tĩnh đặc biệt (“bidentate bonding”) trong sắc ký pha đảo. Nhờ đó, kết quả đạt được không chỉ là sự phân tách các AA phổ biến mà còn tăng cường thông số lưu giữ (k') của axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu) và axit cysteic; (iii) Tìm được môi trường thủy phân nhanh và có thể bảo vệ mạch nhánh của các AA, bao gồm 5 % axit thioglicol (TGA) và 0,2 % phenol trong H_2SO_4 3M. Với điều kiện này, quy trình thủy phân rất hiệu quả, đơn giản và chỉ mất khoảng bốn giờ.

MỞ ĐẦU

Việc thêm các chất giả đạm như melamine vào thực phẩm để đánh lừa người tiêu dùng cần được ngăn ngừa. Bởi vì không dễ dự đoán các chất giả đạm để giám sát, nên các thành phần đạm dinh dưỡng phải được kiểm tra định kỳ đối với các loại thực phẩm thông dụng. Các thành phần đạm dinh dưỡng bao gồm protein, polypeptit, và các axit amin (AA). Mặc dù, hơn 100 AA khác nhau đã được phân lập từ các vật liệu sinh học, nhưng chỉ có 25 loại AA trong số này thường được tìm thấy trong protein và polypeptit của thực phẩm. Vì vậy, thành phần đạm dinh dưỡng của thực phẩm có thể được kiểm định thông qua 25 AA phổ biến [3].

Việc xác định thành phần AA của polypeptit và protein là một quá trình phân tích rất phức tạp, tốn kém nhiều thời gian và chi phí. Quá trình này bao gồm hai bước, thủy phân hoàn toàn của chất nền để sinh ra các AA tự do, tiếp theo là phân tách sắc ký và định lượng các AA vừa được sinh ra [2]. Vì vậy, để phân tích thành phần đạm dinh dưỡng định kỳ, quá trình phân tích thành phần các AA cần được giảm thiểu về thời gian thực hiện và tính phức tạp trong cả hai công đoạn của qui trình.

Một số lượng lớn các công trình đã công bố về lĩnh vực phân tích AA [5]. Tuy nhiên, tai nạn melamine trên qui mô toàn cầu vừa qua cho thấy trong lĩnh vực này vẫn còn nhiều khó khăn không dễ cải tiến. Bài báo xin trình bày

các kết quả nghiên cứu góp phần khắc phục một số khó khăn cơ bản của lĩnh vực phân tích AA, bao gồm: (i) Tạo dẫn xuất bền và nhạy cho các AA phổ biến; (ii) Nâng cao khả năng phân tách AA của hệ sắc ký pha đảo; (iii) Giảm thiểu thời gian và công đoạn cho quá trình thủy phân protein và polypeptit về AA.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết bị

Thiết bị HPLC Agilent 1100: hai bơm và đầu dò UV-Vis bước sóng biến đổi.

Cột HPLC Zorbax Extend C18: 250 mm x 4.6 mm x 5 µm.

Lò COD VELP ECO16 F.

Hóa chất và thuốc thử

Pha động A: 5 % ACN (Merck), 5 % IPA (Merck) và 90 % của 0,10 % (v/v) TFA (Merck) đã chỉnh pH bằng TEA (Merck) tới pH 2,7.

Pha động B: 40 % ACN (Merck), 40 % IPA (Merck) và 20,0 % của 0,14 % (v/v) TFA (Merck) đã chỉnh pH bằng TEA (Merck) tới pH 2,0.

Hệ đệm borat: 0,2 M, pH 8,5, được chuẩn bị từ Na₂B₄O₇ (Merck) và HCl (Merck)

Thuốc thử dansyl clorua: 0,50 % (w/v) dansyl clorua (Merck) trong acetone. Dung dịch này được chuẩn bị ngay trước khi dùng.

Dung dịch axit sulfuric-phenol-axit thioglicol: Cân 0,1 g tinh thể phenol (Merck) vào cốc 100 ml. Hòa tan các tinh thể trong 30 ml nước cất. Trong khi khuấy đều, thêm 50 ml dung dịch axit sulfuric 6M (Merck) và 20 ml axit thioglicol (Merck).

Qui trình thực hiện

Dansyl hóa

Mẫu hay chuẩn trong ống có nắp vặn được hòa tan với 0,5 ml đệm borat. Sau đó, 0,5 ml thuốc thử dansyl clorua được thêm vào ống. Vặn nắp ống nghiệm thật chặt. Cuối cùng, ống nghiệm được ủ nhiệt trong 30 phút tại 60 °C trong bể ổn nhiệt để dansyl hóa AA.

Phân tách sắc ký

Các AA phổ biến được tách trên cột-C18 Zorbax Agilent Extend (250 mm x4.6 mm x 5 µm) và cột bảo vệ (10 mm x 4.6 mm x 5 µm) với pha động gồm pha A và pha B. Tỷ lệ pha A và pha B được biến đổi theo chương trình trong Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình rửa giải cho các AA phổ biến

T(phút)	% A	% B	Tốc độ dòng (ml/phút)
0,00	100,0	0,0	1,00
20,00	85,0	15,0	1,00
25,00	59,0	41,0	1,00
30,00	50,0	50,0	1,00
33,00	0,0	100,0	1,00

36,00	0,0	100,0	1,00
37,00	100,0	0	1,00

Quy trình thủy phân nhiệt-axit với chất bảo vệ axit thioglicol-phenol

Cân một lượng mẫu có chứa khoảng 1 đến 10 mg protein/polypeptit khô trong ống thủy phân. Thêm 10 ml axit sulfuric -phenol-axit thioglicol vào ống thủy phân để hòa tan mẫu. Đậy nắp các ống thủy phân sau khi loại không khí bằng argon. Đun nóng các ống thủy phân trên lò COD ở 130°C trong 240 phút.

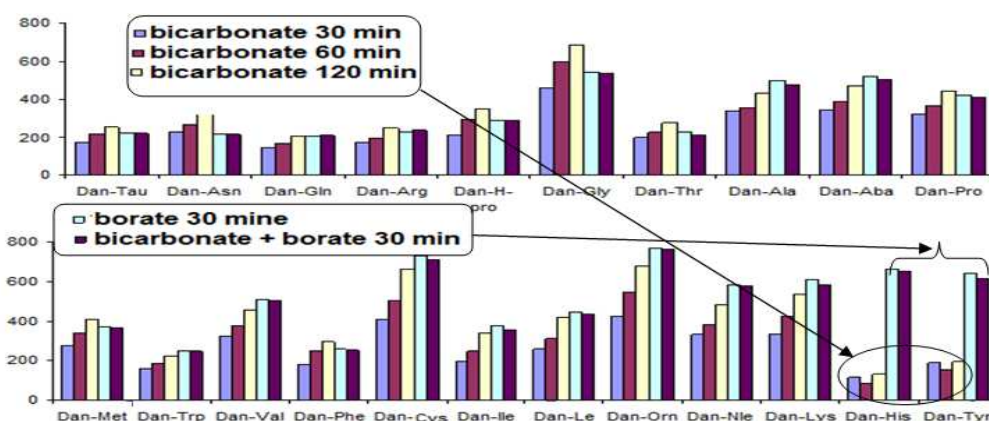
Làm sạch sản phẩm thủy phân

Sau khi kết tủa anion sulfat bởi bari clorua, lấy 3,0 ml dịch thủy phân vào ống ly tâm và chiết với cloroform. Thêm 2 ml cloroform và vortex trong 1 phút, sau đó ly tâm 2 phút và lớp cloroform được hút ra ngoài. Sau khi chiết với cloroform 3 lần, lấy 1,0 ml dung dịch thủy phân trong ống ly tâm và 1 ml aceton vào ống nghiệm khác. Làm khô ống bằng dòng argon nóng. Sau đó, phần cặn được pha loãng và trung hòa với khoảng 2,5 ml dung dịch 0,01 M natri hydroxit. Các AA trong dung dịch này sẽ được dansyl hóa.

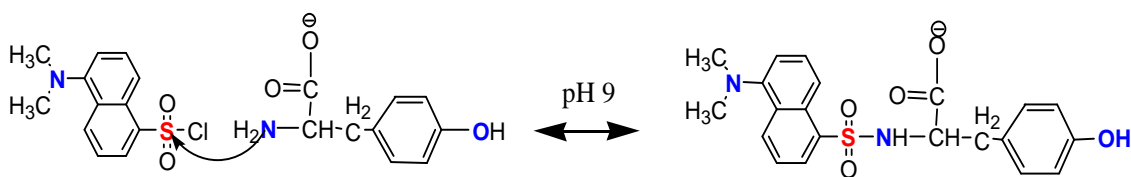
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dansyl hóa các AA phổ biến

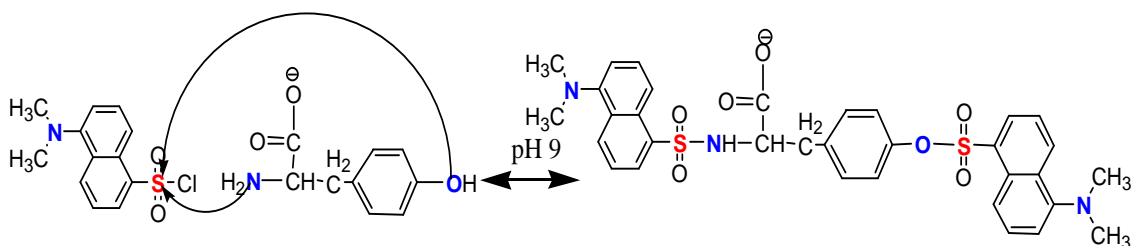
Các nghiên cứu trước về dansyl hóa các AA thường sử dụng hệ đệm bicarbonat pH 9 để hỗ trợ các phản ứng giữa AA và thuốc thử dansyl clorua [7]. Trong bài này, ảnh hưởng của một số hệ đệm trên phản ứng dansyl hóa các AA được khảo sát. Kết quả cho thấy các hệ đệm borat là tốt nhất. Với khả năng hình thành liên kết hydro, các ion borat có thể làm tăng tính thân điện tử của thuốc thử DNS [1]. Do đó, hệ đệm borat cho kết quả tốt hơn so với hệ đệm bicarbonat (thể hiện trên Hình 1). Đối với tyrosin và histidin, hệ đệm borat hỗ trợ quá trình dansyl hóa lần thứ hai (Hình 2b), giúp khắc phục tình trạng tạo thành hai mũi trên sắc ký đồ của các AA này. Đối với các AA còn lại, vận tốc của quá trình dansyl hóa trong hệ đệm borat nhanh hơn bốn lần so với hệ đệm bicarbonat.



Hình 1. Sự thay đổi lượng sản phẩm tạo thành trong phản ứng dansyl hóa AA theo thời gian và bản chất hệ đệm



Hình 2a. Quá trình đơn dansyl hóa cho tyrosin với nhóm phenol chưa phản ứng



Hình 2b. Quá trình dansyl hóa cho tyrosin lần thứ hai tại nhóm phenol

Phân tách các dẫn xuất dansyl AA trên cột C18 Zorbax Agilent Extend

Trong hầu hết các trường hợp tạo dẫn xuất trước cột cho AA, các quá trình phân tách bằng RP-HPLC theo sau, đều được thực hiện trong khoảng pH 5-7. Trong khoảng pH này, điện tích thực của các dẫn xuất của AA sẽ nhận các giá trị khác nhau. Điều này hỗ trợ RP-HPLC phân tách tốt hơn các dẫn xuất của AA [5]. Tuy nhiên, khó khăn còn tồn tại là thông số lưu còn quá thấp đối với các axit cysteic, Asp, Glu. Giải pháp cho tình trạng này là giảm pH của pha động. Tuy nhiên, pH thấp làm cho sự phân tách trên RP-HPLC gặp khó khăn hơn, thể hiện trong Bảng 2.

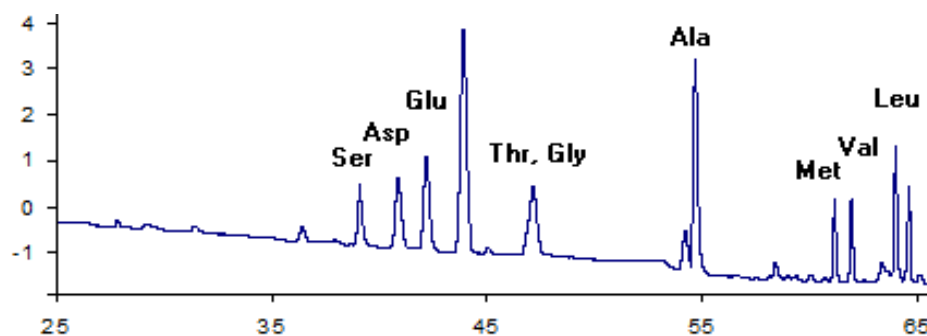
Trở ngại này được giải quyết triệt để bởi kỹ thuật ghép cặp ion, bằng cách thêm các cation như triethylammonium (TEA) vào pha động [6]. Hình 3 cho thấy độ phân giải của các dẫn xuất DNS-AA được nâng cao khi có TEA

trong pha động. Sau khi tối ưu hóa các thành phần của pha động, pH cực thấp là tốt nhất: 2.7 cho pha A và 2.0 cho pha B. pH cực thấp là điều cần thiết để tăng cường thông số lưu và độ phân giải cho các dẫn xuất AA đơn dansyl hóa như DNS-Asp, DNS-Glu hoặc axit DNS-cysteic, và để giảm thời gian lưu giữ của các dẫn xuất AA đôi dansyl hóa như DNS2-Tyr, DNS2-His. Do đó, pha tĩnh pha đảo “bidentate bonding” được sử dụng vì tính ổn định tại pH cực thấp của nó. Nhờ vậy, nghiên cứu mang lại một kết quả tốt hơn trong phân tách các AA phổ biến (Hình 4).

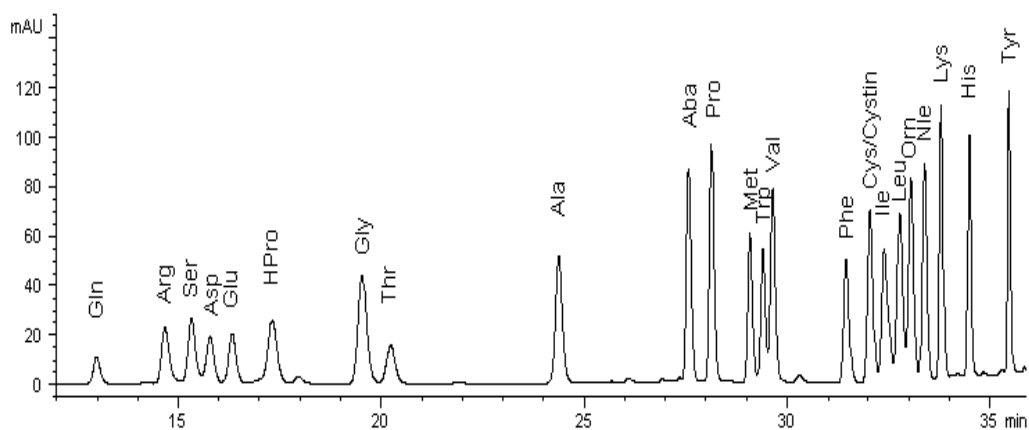
Một thành công nữa của quá trình phân tách các AA là có thể điều chỉnh thành phân pha động, để phân tách đồng thời những chuyển hóa chất của các AA do bị oxy hóa (axit cysteic và cystein) hay các đồng phân D, L-isoleucin, giúp đánh giá độ tươi của thực phẩm chế biến (Hình 5).

Bảng 2. Độ phân giải của một số dẫn xuất dansyl-AA theo C_{TFA} của pha động

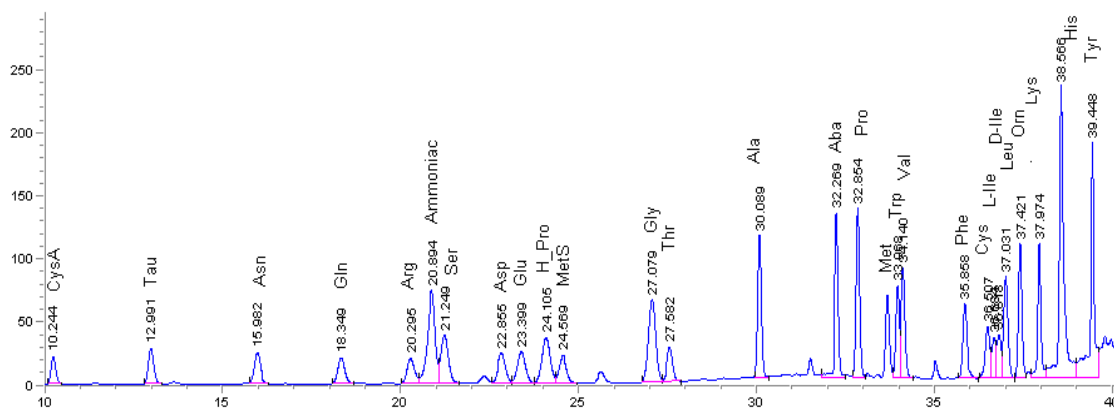
STN ^o	Nồng độ TFA trong pha động	Độ phân giải (R_s)	
		Glu & Asp	Met & Val
1	0,01 % (v/v)	0,53	2,10
2	0,05 % (v/v)	0,85	0,31
3	0,10 % (v/v)	1,20	0,23



Hình 3. Sắc ký đồ phân tách 9 dẫn xuất DNS-AA với pha A (10 mM TFA + 9.5 mM TEA) và pha B (20% IPA + 80% ACN). % B được tăng tuyến tính trong 80 phút.



Hình 4. Sắc ký đồ phân tách các dẫn xuất DNS-AA của các AA phổ biến với pha động gồm pha A và pha B. % B được tăng theo Bảng 1



Hình 5. Sắc ký đồ phân tách các AA phổ biến và các chuyển hóa chất do oxy hóa với pha động gồm pha AF và pha BF: AF(10,5 % ACN (Merck), 1,0 % IPA (Merck) và 88,5 % của 0,10 % (v/v) TFA (Merck) đã chỉnh pH bằng TEA (Merck) tới pH 3,0), BF= B

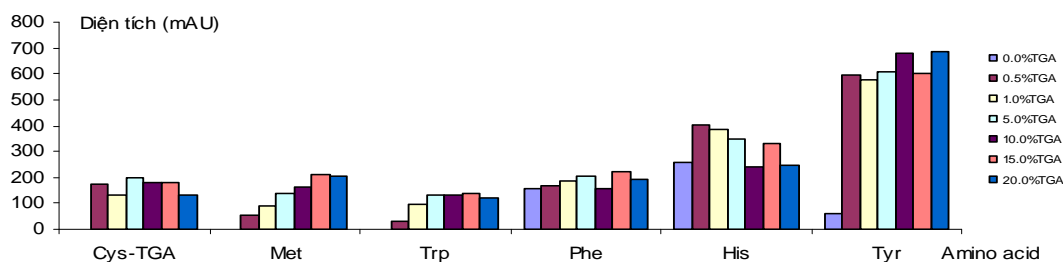
Bảo vệ các AA trong quá trình thủy phân protein và polypeptid

Sau khi khảo sát phương pháp thực hiện phản ứng bảo vệ trước khi thủy phân và phương pháp thêm các chất bảo vệ vào môi trường thủy phân [4], chúng tôi thấy rằng hướng thêm chất bảo vệ giúp giảm thiểu thời gian và công đoạn cho quá trình thủy phân.

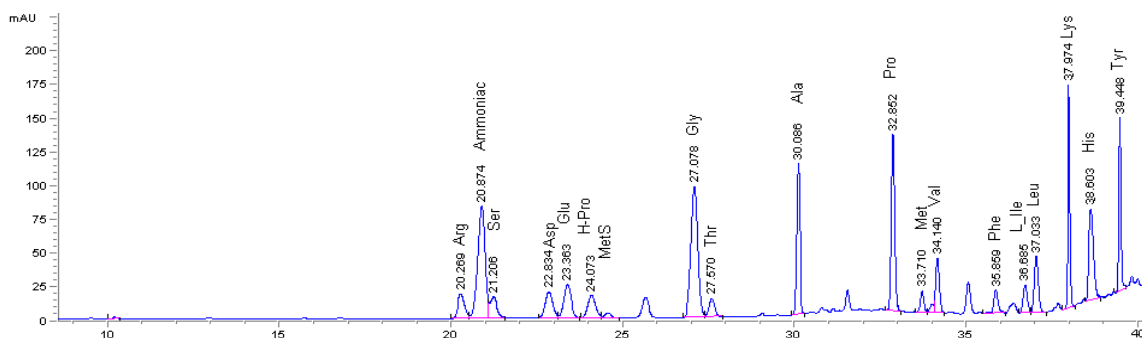
Kết quả của việc tối ưu hóa phương pháp dùng chất bảo vệ cho thấy môi trường tốt nhất

để bảo vệ các AA, gồm TGA 5 % và phenol 0,2 % trong axit sulfuric 1,5 M (Hình 6).

Sau khi, khảo sát nồng độ của axit sulfuric cho thấy rằng axit sulfuric 3,0 M là tối ưu cho thủy phân BSA (Bảng 3). Hơn nữa, nhiệt độ tốt nhất cho quá trình thủy phân nhiệt là 130°C. Ở nhiệt độ này, BSA được thủy phân hoàn toàn trong 4 giờ. Kết quả áp dụng môi trường thủy phân mới tìm được vào mẫu thật, mẫu Cá Ngựa, được trình bày trên Hình 7.



Hình 6. Các phần còn lại của 6 AA, có dây nhánh dễ bị hư trong thủy phân, theo % TGA khi gia nhiệt bằng lò nung COD



Hình 7. Sắc ký đồ phân tách các AA phổ biến được thủy phân từ mẫu Cá Nguira Đò với thành phần dung dịch thủy phân gồm TGA 5 % và phenol 0,2 % trong axit sulfuric 3,0 M

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi của các AA theo nồng độ axit sulfuric

AA	N ^o của AA	% (w) AA _{LT} trong BSA (có kể đến sự cộng nước)	H ₂ SO ₄ 1,5 M		H ₂ SO ₄ 3,0 M	
			% (w) AA	Hiệu suất (%)	% (w) AA	Hiệu suất (%)
Asn	14	2,54	0,00	0,00	0,00	0,00
Gln	18	3,61	0,00	0,00	0,00	0,00
Arg	21	5,02	5,00	99,6	5,00	99,6
Ser	30	4,33	4,05	93,5	4,15	95,8
Asp	39	7,12 (9,66) *	11,60	120,1	11,40	118,0
Glu	59	11,90 (15,51) *	15,10	97,3	15,00	96,7
Gly	15	1,55	1,72	111,0	1,72	111,0
Thr	31	5,07	4,03	79,5	4,53	89,3
Ala	48	5,87	6,10	103,9	6,10	103,9
Cys	34	5,65	3,85	68,2	3,65	64,6
Pro	20	3,16	4,00	126,6	3,80	120,2
Met	5	1,02	1,11	108,8	1,11	108,8
Trp	3	0,84	Vết **	KXĐ	Vết **	KXĐ
Val	37	5,95	3,46	58,2	5,46	91,8
Phe	26	5,89	4,02	68,3	3,92	66,6
Ile	11	1,98	Vết **	KXĐ	2,01	101,5
Leu	61	11,00	6,52	59,3	10,40	94,5
Lys	55	11,00	10,50	95,4	10,50	95,4
His	13	2,77	3,53	127,4	3,33	120,2

Tyr	15	3,73	3,39	90,9	3,29	88,2
AA	555	100,00	87.98	87.98	95.47	95.47

Ghi chú: (*)Trong quá trình thủy phân Asn và Gln lần lượt bị chuyển thành Asp và Glu, do đó giá trị trong ngoặc đơn thể hiện phần trăm khối lượng tổng cộng của Asp và Asn hay Glu và Gln. (**) “Vết” biểu diễn giá trị nhỏ hơn LOQ của phương pháp

KẾT LUẬN

Với các sự cải tiến trong nghiên cứu của chúng tôi, phân tích thành phần AA trong thực phẩm không còn là một kỹ thuật phức tạp và

tốn thời gian như trước. Vì vậy, phân tích thành phần axit amin có thể trở thành kỹ thuật phân tích tốt nhất để xác định thành phần đạm dinh dưỡng của mẫu thực phẩm.

IMPROVEMENT OF AMINO ACID DETERMINING METHOD

Nguyen Huy Du, Nguyen Van Dong, Nguyen Thi Hong Nhung,

Nguyen Thi Thuy Luyen, Nguyen Anh Mai

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: Analysis of amino acid composition is the only way to evaluate the nutritional value of food. The analytical procedure is often complicated and time-consuming. Improving the analysis is, therefore, necessary to control the use of nonprotein nitrogenous constituents in food. The main contributions of the study on the analysis of 25 protein AAs are: (i) The use of borate buffer which facilitated the dansylation of AAs; (ii) The improvement of liquid chromatographic separation using ion-pairing technique in reversed-phase mode at low pH with “bidentate bonding” column. Not only the resolutions of the AAs were improved but the retention factors of aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu) and cysteic acid (Cys) were also enhanced; (iii) The discovery of a medium consisting of 5 % thioglycolic acid (TGA) and 0,2 % phenol in H₂SO₄ 3M for the hydrolysis of BSA, a model protein. With this medium the fragile side chains can be protected. The developed hydrolysis procedure was very simple, efficient and fast (only 4 hours).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Huy Du, *Nghiên cứu thiết lập quy trình xác định các amino acid trong một số loại mẫu thực phẩm và sinh học dựa trên phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*, Luận văn thạc sĩ Hóa Học, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên Tp. Hồ Chí Minh (2009).
- [2]. AOAC Official Method 985.28, 45.4.05 (2006).
- [3]. Tacon Albert G.J., *The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - a training manual 1*, The essential

- nutrients, FAO of the United Nations (1987).
- [4]. Micheal Fountoulakis, Hans-Werner Lahm, *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*, J. Chromatogr. A, 826, 109–134 (1998).
- [5]. Leo M. L. Nollet, *Food Analysis by HPLC*, Marcel Dekker Inc, American (1992).
- [6]. Colin F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science, American (2003).
- [7]. Maurizio Simmaco, Daniela De Biase, Donatella Barra, Francesco Bossa , *Automated amino acid analysis using precolumn derivatization with dansylchloride reversed-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr., 504, 129-138 (1990).