



THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG MỘT SỐ WHEY PROTEIN TRONG THỰC PHẨM BỔ SUNG BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

*Nguyễn Thị Hồng Ngọc¹, Mạc Thị Thanh Hoa¹, Vũ Thị Thanh An²,
Phạm Thị Thanh Hà², Cao Công Khánh¹, Lê Thị Hồng Hảo¹*

¹ Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

² Đại học Dược Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 17/12/2018; Ngày sửa bài sau phản biện: 21/1/2019; Ngày chấp nhận đăng: 28/1/2019)

Tóm tắt

Một phương pháp chính xác, hiệu quả xác định hàm lượng hai thành phần chính của whey protein là Alpha-lactalbumin (α -LA) và Beta-lactoglobulin (β -LG) trong thực phẩm bổ sung bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo với detector PDA đã được phát triển và thẩm định. Phương pháp này sử dụng cột C18 và pha động với chương trình gradient gồm hai kênh: kênh A (TFA 0,1% (v/v) trong nước và kênh B (TFA 0,1% (v/v) trong acetonitrile). α -LA và β -LG được phát hiện tại bước sóng 215nm trong vòng 50 phút. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chụm và độ đúng; sau đó áp dụng phân tích hàm lượng một số mẫu thực phẩm bổ sung lấy ngẫu nhiên trên thị trường.

Từ khóa: Alpha-lactalbumin (α -LA); Beta-lactoglobulin (β -LG); whey; whey protein; thực phẩm bổ sung, HPLC, PDA

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Whey protein, hay đạm whey, một trong hai thành phần quan trọng nhất của đạm sữa, đã và đang trở thành một phần quan trọng của ngành công nghiệp sữa nhờ một số lợi ích với sức khỏe. Trong một vài năm gần đây, whey protein được sử dụng ngày càng phổ biến như một loại thực phẩm bổ sung, thực phẩm chức năng với người lớn và một thành phần dinh dưỡng quan trọng trong sữa - thực phẩm bổ sung dành cho trẻ nhỏ. Các thành phần sinh học của whey, bao gồm lactoferrin, β -lactoglobulin (β -LG), α -lactalbumin (α -LA), glycomacropeptide và immunoglobulin, đã được chứng minh một loạt các đặc tính tăng cường miễn dịch. Hai thành phần chính trong whey protein, α -LA và β -LG, là tiền chất của các peptide ức chế men chuyển có tên là lactokinin, có hoạt tính chống tăng huyết áp và có khả năng chống béo phì. Các peptide đa chức năng khác sinh ra từ whey gọi là α -Lactorphin và β -Lactorphin ảnh hưởng đến quá trình tạo mỡ của tế bào mỡ do hoạt động ức chế men chuyển của chúng và có thể làm giảm lượng mỡ hấp thu từ thức ăn.

Hiện nay trên thế giới và tại Việt Nam, có một số nghiên cứu về các phương pháp xác định hàm lượng α -LA và β -LG trong các loại thực phẩm bổ sung. Phương pháp chuẩn độ đã được Robinson và cộng sự đã phát triển từ những năm 1940. Phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện nhưng chỉ áp dụng được cho mẫu nguyên liệu đơn thành phần và không chọn lọc cho đúng protein đang cần phân tích. Stumr và cộng sự [5] đã giới thiệu phương pháp ELISA đặc hiệu cho β -LG. Phương pháp này cho độ chọn lọc và đặc hiệu cao, độ chụm và độ đúng đạt yêu cầu về thẩm định của AOAC với giới hạn định lượng 0,22 mg/kg và giới hạn phát hiện 0,07 mg/kg. Miralles B. và cộng sự đã nghiên

¹ Điện thoại: 0975565542 Email: hngoc1710@gmail.com

cứu phương pháp điện di mao quản để xác định đồng thời protein whey, casein và các sản phẩm chuyển hóa của chúng. Các giới hạn xác định là 0,16 và 0,14 mg/mL với độ thu hồi trung bình lần lượt là 99,54 và 105,18% đối với β -LG và para-kappa-casein. Yiping Ren và cộng sự đã phát triển phương pháp xác định đồng thời α -LA và β -LG bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối detector khối phổ. So sánh với các phương pháp trước đây, phương pháp này giúp giảm thời gian phân tích và giảm giới hạn phát hiện. Phương pháp đã được thẩm định khoảng tuyến tính ($R^2 \geq 0,9991$), độ nhạy (giới hạn định lượng 0,15 – 0,19 $\mu\text{g/mL}$), độ thu hồi (94,0 – 98,7%), độ chính xác (độ lệch chuẩn tương đối $\leq 11,1\%$) và độ tái lập (độ lệch chuẩn tương đối $\leq 5,7\%$).

Theo TCVN 9660:2013 (ISO 13875:2005) về sữa dạng lỏng - Xác định hàm lượng β -lactoglobulin tan trong acid [1], mẫu sữa lỏng (sữa tươi, thanh trùng và sữa đặc) được chỉnh pH đến mức dưới 4,6 để kết tủa casein. Dịch chiết mẫu còn lại sẽ được pha loãng thích hợp và phân tích trên hệ thống HPLC. Phương pháp này có ưu điểm là dễ thực hiện, có thể áp dụng được tại nhiều phòng thí nghiệm, nhưng mới chỉ áp dụng cho nền sữa lỏng, chưa có thử nghiệm với các nền sữa bột và một số sản phẩm sữa khác như phomat. Mặt khác, phương pháp mới chỉ dừng lại tại một loại protein là β -lactoglobulin, còn thành phần α -lactalbumin không được đề cập đến, nên cần phải xem xét thêm để chứng minh hai protein này không bị trùng nhau trong quá trình phân tích mẫu, vì hai protein này gần như luôn đi cùng nhau.

Phương pháp sắc ký lỏng sử dụng detector khối phổ có độ nhạy và độ chọn lọc cao, tuy nhiên yêu cầu quá trình xử lý mẫu phức tạp, trang thiết bị đắt tiền. Trong khi đó, phương pháp HPLC là phương pháp ổn định, hiệu quả, sử dụng hóa chất và thiết bị thông thường, dễ triển khai, phù hợp với điều kiện của các phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Để tăng tính ứng dụng của nghiên cứu, nhóm nghiên cứu lựa chọn kỹ thuật HPLC để tách các whey protein trong đề tài này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu thực phẩm bổ sung có chứa whey được lấy ngẫu nhiên trên thị trường.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

2.2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Alliance gồm bơm cao áp, bộ điều nhiệt cột, bộ tiêm mẫu tự động kết nối với detector PDA của hãng Waters.

Cột Sunfire C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) và tiền cột tương ứng (Waters).

Các dụng cụ và thiết bị phụ trợ khác trong phòng thí nghiệm.

2.2.1.2. Hóa chất

- Chuẩn α -lactalbumin from bovine milk Type III (độ tinh khiết $\geq 85\%$) và β -lactoglobulin from bovine milk (độ tinh khiết $\geq 90\%$) của hãng Sigma Aldrich.

- Acetonitrile dùng cho HPLC, Merck.

- Acid trifluoroacetic (TFA), acid clorohydric 37% (HCl), acid acetic băng (Merck).

- Nước cất hai lần.

2.2.2. Tiến hành

2.2.2.1. Chuẩn bị chất chuẩn

- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 50mg chất chuẩn và chuyển vào bình định mức 50ml, hòa tan hoàn toàn và định mức bằng đến vạch bằng H_2O và lắc đều.

- Dây chuẩn làm việc: chuẩn bị dây chuẩn làm việc từ 30- 800 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2.2. Xử lý mẫu

Mẫu được xay, nghiền nhỏ, mịn và trộn đều để đạt được độ đồng nhất về mặt cảm quan. Cân chính xác khoảng 2,0 g mẫu vào ống ly tâm 50mL, thêm khoảng 45 mL dung dịch acid acetic 0,05M, lắc vortex 30 giây và để yên trong 10 phút. Sau đó, ly tâm gạn dịch vào bình định mức 50mL định mức đến vạch bằng H_2O . Pha loãng thích hợp bằng H_2O và lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi



phân tích trên HPLC.

2.2.2.3. Điều kiện sắc ký

Để xây dựng quy trình phân tích đồng thời α -LA và β -LG, các điều kiện sắc ký dưới đây đã được sử dụng:

- Cột C18 (250 mm x 4,6mm x 5 μ m)
- Tốc độ dòng pha động: 0,8mL/phút
- Pha động:
 - kênh A (TFA 0,1% (v/v) trong nước);
 - kênh B (TFA 0,1% (v/v) trong acetonitril);
- gradient: 0 - 35 phút: 30% A - 50% B, 35 - 40 phút: 50% A - 30% B.
- Thể tích bơm mẫu: 20 μ l
- Detector PDA: λ =215nm

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Các điều kiện xử lý mẫu và phân tích mẫu

Qua tham khảo các tài liệu [1] và khảo sát tại phòng thí nghiệm, thấy rằng sử dụng cột tách C18 với pha động theo chương trình rửa giải gradient gồm hai kênh chứa TFA 0,1% trong nước (kênh A) và TFA 0,1% trong ACN cho hiệu quả tách tốt nhất α -LA và β -LG.

Do đối tượng nghiên cứu của đề tài là nền mẫu sữa và các thực phẩm bổ sung có nguồn gốc từ sữa, thực phẩm bổ sung chứa whey là nền mẫu phức tạp, cần quy trình xử lý mẫu để làm sạch tạp chất cũng như loại bỏ một số protein đồng rửa giải trong quá trình sắc ký. α -LA và β -LG có mặt trong nền sữa với lượng nhỏ trong khi mẫu chứa lượng lớn casein, do đó cần kết tủa để loại bỏ casein, α -LA và β -LG được tách bằng ly tâm và phân tích trên HPLC.

Trong nghiên cứu này, một số dung môi đã được sử dụng để khảo sát điều kiện xử lý mẫu. Kết quả cho thấy dung dịch acid acetic 0,05 M cho dịch chiết sau khi ly tâm trong nhất. Acid acetic là một acid yếu có pKa = 4,75, dung dịch acid acetic 0,05M có pH khoảng 3, có thể chiết α -LA và β -LG và kết tủa casein mà không cần điều chỉnh pH. α -LA và β -LG không bị kết tủa và có thể phân tích trực tiếp bằng phần dịch trong. Do đó, dung dịch acid acetic 0,05M được lựa chọn để chiết α -LA và β -LG. Sau khi lựa chọn điều kiện sắc ký và điều kiện xử lý mẫu, phương pháp được thẩm định để xác nhận giá trị sử dụng và áp dụng phân tích một số mẫu thực tế.

Như vậy quy trình xử lý mẫu cụ thể gồm các bước sau:

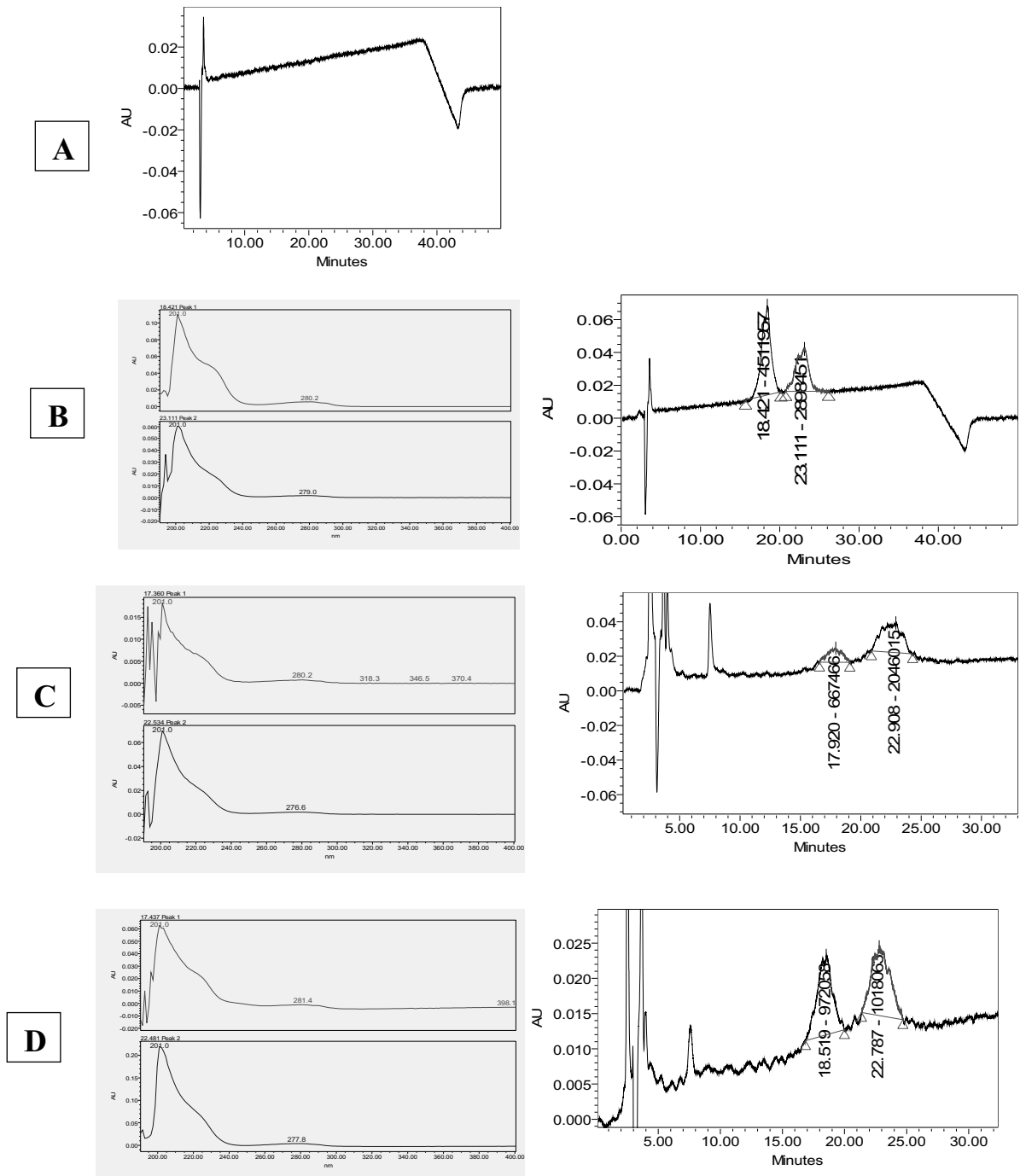
Cân 2 – 5 g mẫu vào ống ly tâm 50 mL, thêm 35 mL acid acetic 0,05M, lắc xoáy 1 phút và để yên trong 15 phút. Lắc xoáy 1 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Định mức 50 mL bằng dung dịch acid acetic 0,05M. Lọc dịch và phân tích bằng HPLC.

3.2. Thẩm định phương pháp

- Độ đặc hiệu: phân tích đồng thời dung dịch chuẩn α -LA và β -LG, dung môi chiết mẫu và mẫu thực, mẫu thực thêm chuẩn trên hệ thống HPLC, sau đó so sánh thời gian lưu của chuẩn, mẫu thực. mẫu thực thêm chuẩn và dung môi chiết mẫu. Kết quả phân tích cho thấy, trên sắc ký đồ của dung môi chiết mẫu không xuất hiện pic nào có cùng thời gian lưu với pic của α -LA và β -LG trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 1). Đồng thời trên sắc ký đồ của mẫu thực, mẫu thực thêm chuẩn xuất hiện pic α -LA và β -LG có thời gian lưu gần với thời gian lưu của chuẩn với (độ chệch 0,34%) với phổ hấp thụ tương đồng về hình dạng phổ, bước sóng cực đại, số lượng bước sóng cực đại. Như vậy quy trình đã xây dựng cho phép phân tích hàm lượng α -LA và β -LG trong nền mẫu đã lựa chọn.

- Khoảng tuyến tính: Chuẩn α -LA và β -LG được chuẩn bị thành 5 dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ dao động từ 30- 800 μ g/mL. Kết quả thực nghiệm (Bảng 1) cho thấy trong khoảng nồng độ này có quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ lý thuyết và diện tích pic trên sắc ký đồ.

- Giới hạn phát hiện (LOD) - Giới hạn định lượng (LOQ): Tiến hành xác định LOD theo phương pháp thực nghiệm (phương pháp tính toán): Dùng mẫu có nồng độ thấp gần giá trị ngưỡng phát hiện, phân tích lặp lại 10 lần và tính các giá trị độ lệch chuẩn, giá trị trung bình. Từ đó tính được giá



Hình 1. Sắc đồ độ đặc hiệu và chọn lọc

A - Dung môi chiết, B - Dung dịch chuẩn và phổ hấp thụ,

C - Dịch chiết mẫu thực và phổ hấp thụ. D - Dịch chiết mẫu thực thêm chuẩn và phổ hấp thụ.

trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng tương ứng với quy trình phân tích (Bảng 1).

- Độ lặp lại: Được đánh giá qua 6 lần phân tích độc lập trong ngày. Kết quả thực nghiệm cho thấy có độ lặp lại phù hợp với yêu cầu của mức nồng độ tương ứng theo yêu cầu của AOAC (Bảng 1).

- Độ đúng (độ thu hồi): Được đánh giá khi thêm chuẩn α -LA và β -LG vào nền mẫu tại 2 mức nồng độ khác nhau. Kết quả thực nghiệm cho thấy độ thu hồi tại các mức thêm chuẩn đều đạt yêu cầu của AOAC (Bảng 1).



Bảng 1. Tóm tắt kết quả thẩm định

Thông số thẩm định	Yêu cầu AOAC	Kết quả	
		α -LA	β -LG
Khoảng tuyến tính - Khoảng nồng độ - Phương trình hồi quy - Hệ số tương quan - Độ chệch (bias %)	$R^2 \geq 0,99$ $\pm 15\%$ (max)	33,6 - 768 ppm $y = 9966,4x - 4557,5$ $R^2 = 0,9955$	36,4 - 803 ppm $y = 4900,7x + 192231$ $R^2 = 0,9993$
LOD - LOQ	$R = [4,10]$	LOD = 0,21 (g/100g); LOQ = 0,70 (g/100g) ($R = 4,11$)	LOD = 0,95 (g/100g); LOQ = 3,17 (g/100g) ($R = 4,60$)
- Độ lặp lại (n = 6)	RSD% độ lặp lại - Hàm lượng 1%: $\leq 2,7\%$ - Hàm lượng 100%: $\leq 1,3\%$	RSD% = 1,73%	RSD% = 1,76%
Độ thu hồi (thêm chuẩn ở 2 mức nồng độ)	$R\% [1,100\%] = 98 - 102\%$	95,0 % - 104,9 %	97,9 % - 102,8 %

3.3. Ứng dụng phân tích thực phẩm bổ sung trên thị trường

Sau khi thẩm định, phương pháp phân tích được áp dụng để phân tích hàm lượng α -LA và β -LG trong một số mẫu thực phẩm bổ sung dành cho trẻ nhỏ được lấy ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Các mẫu dạng bột được mã hóa bằng chữ “B”, các mẫu dạng lỏng được mã hóa bằng chữ “L”. Kết quả phân tích mẫu thực tế được liệt kê trong Bảng 2.

Kết quả phân tích cho thấy, tỷ lệ β -LG/ α -LA trong các mẫu sữa dao động trong khoảng 1,59 - 4,07 lần. Theo lý thuyết, α -LA chiếm khoảng 20 -25% whey, β -LG khoảng 60 -65%, nên tỷ lệ β -LG/ α -LA theo lý thuyết sẽ khoảng 2,4 - 3,25. Có thể thấy rằng có 8/17 mẫu sữa cho tỷ lệ gần sát lý thuyết. Ngoài ra, hàm lượng β -LG + α -L chiếm khoảng 20,87 - 63,42% so với hàm lượng protein ghi trên nhãn. Sự khác biệt này có thể lý giải do nguồn gốc sữa khác nhau (bò, dê, cừu) nên tỷ lệ whey/casein khác nhau. Hơn nữa, do điều kiện bảo quản khác nhau mà tỷ lệ hư hao, chuyển hóa qua nhau trong quá trình lưu trữ.

Bảng 2. Kết quả phân tích mẫu thực tế

STT	Tên mẫu	α -LA (g/100g, 100mL)	β -LG (g/100g, 100mL)	Tỷ lệ β -LG/ α -LA	β -LG + α -LA (g/100g, 100mL)	Protein nhãn (g/100g, 100mL)	% β -LG + α -LA/ protein nhãn
1	B1	1,13	2,89	2,55	4,03	16,5	24,4
2	B2	2,26	5,14	2,28	7,40	21,5	34,4
3	B3	1,39	2,20	1,59	3,59	11,1	32,3

4	B4	1,43	4,08	2,85	5,51	15,2	36,3
5	B5	1,45	2,95	2,03	4,41	15,5	28,4
6	B6	1,09	3,05	2,79	4,14	16,0	25,9
7	B7	1,11	3,16	2,84	4,27	16,2	26,4
8	B8	1,26	3,15	2,50	4,41	16,8	26,3
9	B9	2,62	5,40	2,06	8,02	17,9	44,8
10	B10	1,24	3,31	2,66	4,56	18,1	25,2
11	B11	1,01	4,09	4,07	5,09	13,4	38,0
12	B12	2,96	6,68	2,25	9,64	15,2	63,4
13	L1	0,23	0,67	2,88	0,90	3,36	26,7
14	L2	0,35	0,81	2,31	1,17	3,10	37,6
15	L3	0,28	0,60	2,12	0,89	3,50	25,4
16	L4	0,17	0,48	2,79	0,65	3,10	20,9
17	L5	0,26	0,64	2,52	0,90	3,40	26,4

4. KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng đồng thời α -LA và β -LG bằng HPLC-PDA trong nền mẫu thực phẩm bổ sung đã được xây dựng và thẩm định. Phương pháp đã được thẩm định về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chụm, độ đúng theo hướng dẫn của AOAC. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt yêu cầu để áp dụng phân tích hàm lượng α -LA và β -LG trong thực phẩm bổ sung, có thể tiến hành phân tích tại các phòng thử nghiệm có hệ thống HPLC như một phương pháp thường quy. Những kết quả phân tích ban đầu từ một số mẫu thực tế trên thị trường cho thấy có sự khác biệt lớn về hàm lượng α -LA và β -LG giữa các mẫu, thể hiện sự không đồng đều đáng kể về chất lượng của những sản phẩm này.

Tuy nhiên, để có thêm các căn cứ đánh giá chất lượng của whey protein, cần có thêm các nghiên cứu về các thành phần khác, chứa hàm lượng nhỏ nhưng có giá trị quan trọng trong cải thiện sức khỏe. Do vậy, trong tương lai, nhóm thực hiện đề tài sẽ tiếp tục nghiên cứu mở rộng phân tích các whey protein khác, cũng như mở rộng các nền mẫu có chứa whey protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tiêu Chuẩn Quốc Gia 9660:2013 (ISO 13875:2005) về Sữa Dạng Lỏng - Xác Định Hàm Lượng β -Lactoglobulin Tan Trong Acid - Phương Pháp Sắc Ký Lỏng Hiệu Năng Cao Pha Đảo, 2013
2. R. Hartmann and H. Meisel, "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications - ScienceDirect," *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2), 2007, pp. 163–169.
3. H. Meisel, "Multifunctional peptides encrypted in milk proteins," *Biofactors*, 21 (1–4), 2004, pp. 55–61.
4. H. W. Robinson and C. G. Hogden, "The Biuret Reaction in the Determination of Serum Proteins I. a Study of the Conditions Necessary for the Production of a Stable Color Which Bears a Quantitative Relationship to the Protein Concentration," *J Biol Chem*, 135 (2), 1940, pp. 707–725.



5. F. Stumr et al., “Enzyme-linked immunosorbent assay kit for beta-lactoglobulin determination: interlaboratory study,” *J AOAC Int*, 92 (5), 2009, pp. 1519–1525.
6. B. Miralles, V. Rothbauer, M. A. Manso, L. Amigo, I. Krause, and M. Ramos, “Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-kappa-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis,” *J Chromatogr A*, 915 (1–2), 2001, pp. 225–230.
7. Y. Ren, Z. Han, X. Chu, J. Zhang, Z. Cai, and Y. Wu, “Simultaneous determination of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in infant formulae by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 667, no. 1, pp. 96–102, May 2010.

Summary

METHOD VALIDATION FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF WHEY PROTEINS IN DIETARY SUPPLEMENTS BY HPLC

*Nguyen Thi Hong Ngoc*¹, *Mac Thi Thanh Hoa*¹, *Vu Thi Thanh An*²,
*Pham Thi Thanh Ha*², *Cao Cong Khanh*¹, *Le Thi Hong Hao*¹

¹ *National Institute for Food Control*

² *Hanoi University of Pharmacy*

A HPLC method has been validated for simultaneous determination of Alpha-lactalbumin (α -LA) and Beta-lactoglobulin (β -LG) contents in dietary supplements by HPLC-PDA. The method was carried out in C18 column with a gradient of 0.1% TFA/ water – 0.1% TFA/ acetonitrile as mobile phase. The proteins were detected at 215 nm wavelength within 50 minutes. The method was validated in specificity, linearity, precision and accuracy; and then was applied to analyze several random dietary supplements.

Keywords: *Alpha-lactalbumin (α -LA), Beta-lactoglobulin (β -LG), whey, whey protein, dietary supplement, HPLC, PDA.*