

Sử dụng phương pháp mặt mục tiêu nhằm tối ưu hóa quy trình phân tích taurin trong một số loại thực phẩm chức năng bổ sung taurin bằng phương pháp điện di mao quản

Nguyễn Mạnh Huy, Nguyễn Thanh Đàm, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt*

Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Phân tích phục vụ Kiểm định môi trường và An toàn thực phẩm (KLATEFOS), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 06 tháng 9 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 22 tháng 10 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Bài báo này nghiên cứu về việc sử dụng phương pháp mặt mục tiêu để xây dựng mô hình nhằm tối ưu hóa quy trình phân tích taurin bằng kỹ thuật điện di mao quản kết hợp detector đo độ dẫn không tiếp xúc. Một thiết kế mặt mục tiêu kết hợp với mô hình lập tâm với 30 thí nghiệm đã được xây dựng cho bốn yếu tố khảo sát là nồng độ Tris, pH, điện thế tách và thời gian bơm mẫu. Điều kiện tối ưu tìm thấy là: nồng độ Tris là 150 mmol/L và pH= 8,96 với điện thế tách -10kV, thời gian bơm mẫu 60 giây đã được sử dụng để phân tích taurin. Giới hạn phát hiện phương pháp của taurin đạt 0,266 mg/L, độ lặp lại thông qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối của thời gian di chuyển cũng như diện tích tín hiệu nhỏ hơn 3,16%, khoảng tuyến tính từ 1 – 500 mg/L, hệ số tương quan tuyến tính của đường chuẩn đạt 0,999. Áp dụng phân tích hàm lượng taurin trong các mẫu sữa bột, sữa tươi, nước tăng lực, hiệu suất thu hồi trên nhiều nền khác nhau đạt từ 91,9% – 101,7 %.

Từ khoá: Taurin, điện di mao quản, phương pháp mặt mục tiêu.

1. Tổng quan

Taurin (axit 2-aminoetansunfonic) là một amino axit chứa nhóm sunfonic ($-SO_3H$), trong nước phân ly thành nhóm mang điện tích âm ($-SO_3^-$) và có thể phân ly thành nhóm mang điện tích dương ($-NH_3^+$) [1]. Taurin là một trong những axit amin thiết yếu đối với con người bởi vai trò quan trọng trong việc điều trị một số bệnh và cải thiện các chức năng sinh lý của cơ thể con người [2-5]. Ngoài nguồn cung cấp taurin từ thực phẩm tự nhiên, thực phẩm chức năng bổ sung taurin cũng dần trở nên quen

thuộc nhằm đáp ứng nhu cầu bổ sung taurin của con người. Trên thị trường, thực phẩm bổ sung taurin xuất hiện nhiều với chủng loại đa dạng phong phú, từ nước tăng lực cho tới sữa bột, sữa tươi,... Các thực phẩm bổ sung taurin đã và đang xuất hiện nhiều trên thị trường với chủng loại đa dạng, phong phú. Bởi vậy, việc xây dựng phương pháp phân tích đánh giá và kiểm soát chất lượng các loại thực phẩm bổ sung taurin là cần thiết. Một số phương pháp đã được nghiên cứu nhằm phân tích, kiểm soát hàm lượng taurin trong thực phẩm, nước giải khát hay phân tích đánh giá hàm lượng taurin trong nước tiểu, mẫu sinh học, huyết tương.

Một số phương pháp phân tích taurin có thể kể đến như phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối detector mảng diot (HPLC-DAD)

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-913572589.

Email: phamhungviet@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4657>

[6], phương pháp sắc ký lỏng ghép nối detector khối phổ (LC-MS) [7], phương pháp sắc ký ion (IC) [8], phương pháp điện di mao quản kết hợp detector quang [9]. Trong đó, phương pháp điện di mao quản, đặc biệt là phương pháp điện di mao quản tích hợp detector đo độ dẫn không tiếp xúc kết nối kiểu tụ điện (CE-C⁴D) mang lại những ưu điểm nổi bật trong phân tích các hợp chất mang điện với ưu điểm trang thiết bị nhỏ gọn, vận hành đơn giản có thể tự động hóa và triển khai tại hiện trường, hóa chất sử dụng ít với chi phí thấp, cho thấy tiềm năng phát triển phù hợp với nhu cầu và điều kiện thực tế tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, phương pháp CE-C⁴D được lựa chọn để phát triển quy trình phân tích taurin.

Trong phát triển quy trình phân tích, việc khảo sát nhằm tối ưu hóa các điều kiện thí nghiệm là rất quan trọng. Phương pháp tối ưu hóa thường dùng phương pháp khảo sát lần lượt từng yếu tố (one factor at a time) với ưu điểm là dễ thực hiện. Tuy nhiên phương pháp này lại bộc lộ những hạn chế do các yếu tố khảo sát trong phân tích thường ảnh hưởng đồng thời tới kết quả, việc khảo sát lần lượt sẽ cho điều kiện cuối cùng chưa hẳn đã là điều kiện tối ưu nhất. Vì vậy, để khắc phục vấn đề này, phương pháp mặt mục tiêu (RSM - Response surface methodology) kết hợp với thiết kế mô hình lập tâm (CCD - Central composite design) là một giải pháp tối ưu thay thế hiệu quả, được sử dụng rộng rãi trong phân tích [10, 11]. Tuy vậy, việc ứng dụng thiết kế thí nghiệm trong phương pháp CE còn chưa thật sự phổ biến, hiện nay chưa có công bố nào sử dụng RSM kết hợp CCD đối với với thiết bị CE-C⁴D. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp RSM-CCD với năm mức thí nghiệm và bốn yếu tố ảnh hưởng để tối ưu hóa quy trình phân tích taurin.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất và thiết bị

Tất cả các hóa chất sử dụng đều thuộc loại tinh khiết và pha chế bằng nước deion: chất

chuẩn taurin dạng bột, tinh khiết > 98% (Tokyo Chemical Industry, Nhật Bản), axit 2-(Cyclohexylamino) etansunfonic (CHES) (Sigma-Aldrich, Đức). 2-Amino-2-(hidroxymetyl)propan-1,3-diol (Tris), axit 3-mopholinopropan-1-sunfonic (MOPS), axit 3-(Cyclohexylamino)-1-propansunfonic (CAPS), Fluka, CHLB Đức. Axit lactic (Lac) tinh khiết > 90% (Guangdong, Trung Quốc) và các hóa chất khác như dung dịch NaOH 0,1M, dung dịch HCl 0,1M. Nước deion từ máy lọc nước tinh khiết điện trở 18 MΩ, Milipore - Simplicity UV, Mỹ.

Dung dịch chuẩn gốc taurin 1000 mg/L được chuẩn bị bằng cách cân chính xác 0,1000 g taurin vào bình định mức 100 mL, định mức bằng deion đến vạch định mức, lắc kỹ và chuyển vào lọ PE 100 mL. Chuẩn trung gian 50 mg/L được pha từ chuẩn gốc, định mức đến 10 mL bằng nước deion. Các điểm trên đường chuẩn được pha từ chuẩn trung gian, định mức đến 10 mL bằng nước deion. Các mẫu đã xử lý được bảo quản ở 4°C trước khi phân tích.

Mẫu thực phẩm chức năng bổ sung taurin được thu thập là các sản phẩm được bán trên thị trường, đó là nước tăng lực Redbull, mẫu sữa tươi Ovaltine 110 mL và mẫu sữa bột Bledilait 3. Với mẫu sữa bột được cân chính xác 1 g mẫu bột cho vào bình định mức 10 mL, thêm deion tới định mức, hòa tan mẫu thực hiện với máy lắc Vortex ở nhiệt độ 50°C đến 60°C. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ môi trường, các mẫu này lần lượt được lọc qua màng lọc 0,7 μm và 0,2 μm. Mẫu sữa tươi và nước tăng lực được lọc trực tiếp qua màng lọc 0,7 μm và 0,2 μm. Mẫu sau khi lọc được chuyển vào các vial, mẫu nồng độ cao được pha loãng bằng deion. Các mẫu đã xử lý được bảo quản ở 4°C trước khi phân tích.

Quá trình phân tích điện di được thực hiện trên hệ thiết bị điện di mao quản thao tác bằng tay của trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững, trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội. Thiết bị sử dụng nguồn cao thế ±30 kV (CZE 2000R, Spellman, Pulborough, Anh), bộ ghi dữ liệu e-corder (eDAQ, Denistone East, NSW, Úc), cột mao

quản silica nóng chảy (Agilent, Mỹ) sử dụng có đường kính trong 50 μm , đường kính ngoài 375 μm , độ dài tổng 60 cm và độ dài hiệu dụng là 49 cm. Detector đo độ dẫn không tiếp xúc tự chế tạo sử dụng nguồn cấp một chiều 12 VDC và nguồn kích thích xoay chiều 200 VAC. Các thiết bị phân tích phụ trợ khác là máy đo pH, độ dẫn HQ40d (HACH, Mỹ), cân phân tích AE 200 (Mettler, Thụy Sĩ), máy rung Vortex G-560^E (Scientific Industries, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát thành phần đệm điện di

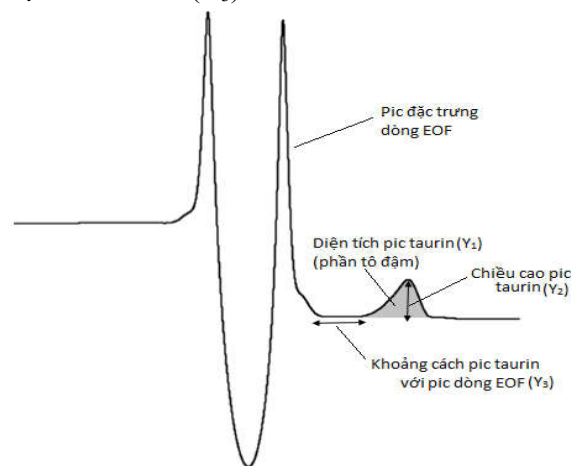
Đệm điện di ảnh hưởng tới sự lên tín hiệu của taurin. Cấu tạo phân tử của những thành phần trong đệm ảnh hưởng tới sự di chuyển của taurin trong mao quản, trong những trường hợp ảnh hưởng này theo hướng tiêu cực làm pic tín hiệu taurin tù và khó xác định. Trong nghiên cứu này, taurin với nhóm axit mạnh ($-\text{SO}_3\text{H}$) được phân tích như một anion với việc sử dụng kỹ thuật phân cực ngược là kỹ thuật phân tích anion theo chiều phân cực âm nên ngược với phân tích anion thông thường là theo chiều phân cực dương. Mục đích của sự lựa chọn này là: taurin ở dạng anion có độ linh động điện di yếu, nó bị lôi cuốn và đảo chiều di chuyển trong mao quản bởi dòng điện di thẩm thấu (dòng EOF) và di chuyển theo chiều cực âm đến detector. Ngoài ra, nhóm amin ($-\text{NH}_2$) trong taurin với $\text{pK} \sim 9$, ở pH thấp tồn tại chủ yếu ở dạng ion ($-\text{NH}_3^+$) gây ảnh hưởng tiêu cực đến sự tách pic taurin với pic đặc trưng dòng EOF. Bởi vậy, các hệ đệm có pH cao được lựa chọn, bao gồm: đệm Tris/Lac 30 mmol/L pH= 8; đệm Tris/MOPS 100 mmol/L pH= 7,7; đệm Tris 60 mmol/L và CAPS 40 mmol/L pH= 9,6; đệm Tris/CHES 100 mmol/L pH= 8,8.

2.2.2. Xây dựng mô hình thực nghiệm RSM-CCD

Hàm mục tiêu

Trong nghiên cứu, phân tích được taurin ở nồng độ càng thấp (giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng càng thấp) thì hiệu quả phân tích đánh giá càng tốt. Bởi vậy hàm mục tiêu là

chiều cao pic taurin (Y_1) và diện tích pic taurin (Y_2). Ngoài ra, với việc phân tích theo kiểu phân cực ngược, pic taurin xuất hiện sau pic đặc trưng của dòng EOF. Khoảng này càng lớn thì khoảng tuyến tính đường chuẩn phân tích taurin càng rộng và càng giảm đi ảnh hưởng của các chất khác với pic taurin trong mẫu thực. Khoảng cách giữa pic taurin và pic đặc trưng dòng EOF (khoảng cách EOF-taurin) là hàm mục tiêu thứ ba (Y_3).



Hình 1. Các hàm mục tiêu lựa chọn.

Lựa chọn yếu tố độc lập ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y_1 Y_2

Các yếu tố được lựa chọn tối ưu là: nồng độ đệm Tris (X_1), pH của dung dịch đệm Tris/Lac (X_2), độ lớn điện thế tách (X_3) và thời gian bơm mẫu (X_4).

Số thí nghiệm

Số thí nghiệm được thực hiện là $N = 2^k + 2k + 6$ ($N = 30$ với $k = 4$). Trong đó, k là số biến số độc lập và $2k$ số thí nghiệm bổ sung tại điểm sao. Khoảng cách từ tâm đến điểm sao $\alpha = 2^{k/4}$ ($\alpha = 2$ với $k = 4$). Tất cả các nghiên cứu được thực hiện ở năm mức ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). Như vậy, trong nghiên cứu này 30 thí nghiệm sẽ được thực hiện với 2^4 số thí nghiệm của quy hoạch toàn phần, 6 thí nghiệm lặp lại tại tâm để đánh giá sai số và 8 thí nghiệm bổ sung tại điểm

sao nằm cách vị trí tâm thực nghiệm một khoảng α .

Phân tích thống kê

Phép phân tích phương sai được sử dụng để phân tích ảnh hưởng của các yếu tố trong thí nghiệm, ảnh hưởng tương tác của chúng lên hàm mục tiêu. Sau khi loại bỏ những yếu tố không ảnh hưởng không đáng kể tới hàm mục

tiêu, mô hình thống kê biểu diễn sự phụ thuộc của chiều cao pic, diện tích pic và khoảng cách EOF-taurin vào các yếu tố được mã hóa được xây dựng bằng phương pháp bình phương tối thiểu là một phương trình phương trình hồi qui có dạng:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Y	Diện tích pic (hoặc chiều cao pic, khoảng cách EOF-taurin) dự đoán
b_0	Hệ số hồi quy bậc 0
X_i	Yếu tố độc lập thứ i ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y
b_i	Hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y
b_{ii}	Hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y
b_{ij}	Hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời X_i và X_j với Y

Đánh giá mô hình

Mô hình và phương trình hồi qui được kiểm tra mức độ phù hợp với thực nghiệm bằng kiểm định Fisher của mô hình (với giá trị $P_{\text{value}} = 0,05$) và sự thiếu phù hợp (Lack of fit). Nếu giá trị P_{value} nhỏ hơn giá trị α và càng nhỏ thì mô hình càng phù hợp (giá trị α thường lấy 0,05 - tức là 5%). Hệ số Lack of fit phải lớn hơn giá trị α (lớn hơn 0,05) thì mô hình đó mới phù hợp, giá trị Lack of fit càng lớn thì mức độ phù hợp của mô hình càng tăng. Ngoài ra còn có một số các thông số đánh giá khác như hệ số tương quan (correlation coefficient) giữa các kết quả dự đoán của mô hình (Y') với các kết quả thực nghiệm (Y), hệ số xác định (coefficient of determination) và độ lệch chuẩn tương đối CV% (coefficient of variation). Cuối cùng, thực hiện việc phân tích tại điểm tối ưu với các điều kiện đệm Tris/Lac, điện thế tách và thời gian bơm mẫu tìm thấy và so sánh với kết quả dự đoán để kiểm tra sự chính xác của mô hình dự đoán.

2.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích đã tối ưu

Để thẩm định phương pháp phân tích sau khi đã tối ưu hóa các điều kiện, một số thông số đánh giá phương pháp đã được xác định bao gồm: giới hạn phát hiện (LOQ), giới hạn định lượng của phương pháp (MQL), khoảng tuyến

tính của đường chuẩn, độ lặp lại của diện tích pic taurin và thời gian di chuyển.

Giới hạn phát hiện (LOD) bao gồm giới hạn phát hiện của thiết bị (IDL) và giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL). Trong nghiên cứu, quá trình xử lý mẫu không có sử dụng các kỹ thuật làm giàu mẫu, giới hạn phát hiện của phương pháp được xác định bằng cách đo mẫu giả (mẫu thêm chuẩn taurin nồng độ 0,5 mg/L vào nền mẫu thực phẩm loại không bổ sung taurin), tính MDL theo tỉ số S/N (S/N là tỉ số chiều cao của tín hiệu với chiều cao của nhiễu nền, S/N = 3). Giá trị IDL được xác định theo cách tương tự với mẫu chuẩn taurin 0,75 mg/L trong nền nước deion. Giới hạn định lượng của phương pháp (MQL) được xác định bằng biểu thức: $MQL = 3 MDL$.

Giới hạn tuyến tính (LOL) là nồng độ cao nhất của chất phân tích mà tại đó tín hiệu phân tích còn tuân theo phương trình tuyến tính bậc nhất. Giá trị này được xác định bằng cách tăng giá trị của điểm cận trên đường chuẩn đến khi đường không còn tuyến tính. Khi đó, khoảng tuyến tính được định nghĩa là từ LOQ đến LOL.

Trong nghiên cứu này, độ lặp lại xác định bằng giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) của thời gian di chuyển và diện tích pic (là kết quả phân tích lặp lại 10 lần taurin nồng độ 10 mg/L tại điều kiện tối ưu của quy trình).

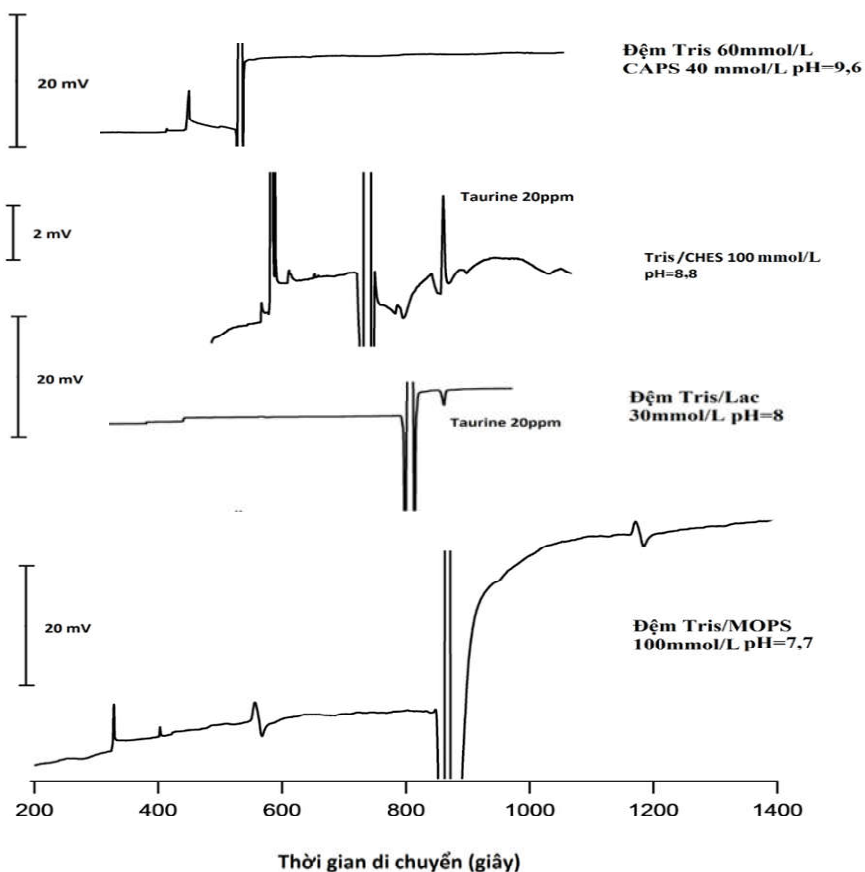
Độ đúng của phương pháp phân tích được xác định dựa trên việc xác định hiệu suất thu hồi khi phân tích các mẫu thêm chuẩn taurin trên nền nước deion và trên các nền mẫu thực. Các mẫu sữa tươi, nước tăng lực được pha loãng, mẫu sữa bột được hòa tan bằng nước deion, thêm taurin chuẩn với các nồng độ 2mg/L, 5 mg/L và 10 mg/L, mẫu nước deion được thêm taurin chuẩn 8 mg/L. Sau đó các mẫu nền, mẫu thêm chuẩn được lọc qua màng lọc 0,2 μm , phân tích trên hệ điện di mao quản. Nồng độ taurin được xác định bằng phương pháp đường chuẩn, hiệu suất thu hồi trên các nền mẫu thực được xác định dựa trên kết quả

phân tích mẫu nền, mẫu thêm chuẩn và lượng thêm chuẩn.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát thành phần đệm điện di

Kết quả thí nghiệm như các điện di đồ trong hình 2 cho thấy trong bốn hệ đệm nghiên cứu chỉ có hai hệ đệm Tris/Lac và Tris/CHES là xuất hiện tín hiệu của taurin ở nồng độ 20 mg/L. Do đó, đệm Tris/Lac và Tris/CHES được chọn để tiếp tục nghiên cứu.



Hình 2. Khảo sát thành phần đệm điện di.

Sau đó thực hiện phân tích taurin ở nồng độ 10 mg/L với hai đệm này với cùng điều kiện điện thế tách -10kV, thời gian bơm mẫu 20

giây. Kết quả thu được chiều cao và diện tích pic của taurin khi sử dụng đệm Tris/Lac lớn hơn rất nhiều so với đệm Tris/CHES. Vì vậy,

đệm Tris/Lac được lựa chọn làm đệm sử dụng trong quy trình phân tích để xây dựng mô hình tối ưu hóa ở phần sau.

3.2. Xây dựng mô hình thực nghiệm RSM-CCD

Các yếu tố được xác định để tối ưu hóa bao gồm: nồng độ Tris, pH (điều kiện hóa học) và độ lớn điện thế tách, thời gian bơm mẫu (điều kiện thiết bị phân tích). Bài toán tối ưu được lập lên dựa trên phương trình hồi quy xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của chiều cao, diện tích

pic taurin và khoảng cách EOF-taurin vào các yếu tố với miền khảo sát được thể hiện trong bảng 1.

Phần mềm Design-Expert 10.0.4 được sử dụng để mô hình hóa thí nghiệm và phân tích các kết quả thực nghiệm theo mô hình, xây dựng phương trình hồi quy và giải bài toán tối ưu. Các thí nghiệm trong mô hình, kết quả thực nghiệm (Y) và kết quả mô hình dự đoán (Y') được trình bày tại bảng 2.

Bảng 1. Giới hạn phạm vi và mức biến đổi của các yếu tố

Biến thực	Biến mã hóa	Đơn vị	Mức nghiên cứu				
			-2 (- α)	-1	0	+1	+2 (+ α)
Nồng độ Tris	X ₁	mmol/L	30	60	90	120	150
pH	X ₂	-	8	8,25	8,5	8,75	9
Độ lớn điện thế tách	X ₃	kV	10	12,5	15	17,5	20
Thời gian bơm mẫu	X ₄	s	10	22,5	35	47,5	60

Bảng 2. Ma trận kế hoạch thực nghiệm và kết quả thực nghiệm

Mã hóa	(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	(X ₄)	Y ₁	Y' ₁	Y ₂	Y' ₂	Y ₃	Y' ₃
Đơn vị	mmol/L	-	kV	s	V	V	V.s	V.s	s	s
1	30	8,5	15	35	0,0112	0,0120	0,0402	0,0417	20,00	19,95
2	60	8,75	12,5	22,5	0,0075	0,0067	0,0352	0,0331	68,10	67,61
3	60	8,75	17,5	47,5	0,0123	0,0130	0,0486	0,0479	38,20	39,81
4	60	8,25	17,5	47,5	0,0161	0,0150	0,0593	0,0575	14,20	14,79
5	60	8,75	12,5	47,5	0,0126	0,0130	0,0714	0,0708	62,10	60,26
6	60	8,25	12,5	22,5	0,0084	0,0090	0,0383	0,0407	27,50	25,70
7	60	8,25	17,5	22,5	0,0088	0,0090	0,0277	0,0275	16,60	16,60
8	60	8,75	17,5	22,5	0,0074	0,0067	0,0236	0,0229	46,50	44,67
9	60	8,25	12,5	47,5	0,0158	0,0150	0,0848	0,0851	22,20	22,91
10	90	8,5	15	35	0,0091	0,0096	0,0429	0,0457	53,00	52,48
11	90	8,5	15	35	0,0091	0,0096	0,0417	0,0457	52,60	52,48
12	90	8,5	15	35	0,0093	0,0096	0,0439	0,0457	52,40	52,48
13	90	8,5	15	35	0,0097	0,0096	0,0478	0,0457	49,80	52,48
14	90	8,5	20	35	0,0096	0,0096	0,0342	0,0347	37,60	36,31
15	90	8,5	15	60	0,0138	0,0150	0,0755	0,0776	51,40	46,77
16	90	8,5	15	35	0,0099	0,0096	0,0492	0,0457	49,80	52,48
17	90	8,5	10	35	0,0094	0,0096	0,0727	0,0741	82,80	85,11
18	90	9	15	35	0,0069	0,0078	0,032	0,0355	62,50	64,57

19	90	8,5	15	35	0,0105	0,0096	0,052	0,0457	49,20	52,48
20	90	8,5	15	10	0,0037	0,0042	0,0168	0,0174	57,30	58,88
21	90	8	15	35	0,0076	0,0086	0,0368	0,0355	10,60	10,47
22	120	8,25	12,5	22,5	0,0050	0,0047	0,0283	0,0275	49,00	45,71
23	120	8,25	17,5	47,5	0,0098	0,0094	0,0404	0,0398	25,60	26,30
24	120	8,75	12,5	22,5	0,0063	0,0062	0,0363	0,0339	103,50	107,15
25	120	8,75	17,5	22,5	0,0065	0,0062	0,0243	0,0229	69,90	69,18
26	120	8,25	12,5	47,5	0,0098	0,0094	0,0597	0,0589	39,40	40,74
27	120	8,25	17,5	22,5	0,0052	0,0047	0,0183	0,0191	29,40	29,51
28	120	8,75	12,5	47,5	0,0113	0,0110	0,0708	0,0708	96,50	95,50
29	120	8,75	17,5	47,5	0,0115	0,0110	0,0494	0,0490	65,00	61,66
30	150	8,5	15	35	0,0074	0,0083	0,0357	0,0380	73,40	74,13

Từ phần mềm Design-Expert 10.0.4, sau khi đã loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng không đáng kể tới hàm mục tiêu diện tích pic, chiều cao pic và khoảng cách EOF-taurin ở độ tin cậy

90% (yếu tố có giá trị P_{value} theo ảnh hưởng bậc một, bậc hai và ảnh hưởng tương hỗ nhỏ hơn 0,1), kết quả phân tích phương sai và kiểm định mô hình được thể hiện tại bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai cho mô hình đa thức bậc hai theo chiều cao pic, diện tích pic và khoảng cách EOF-taurin

Mô hình đa thức	Mô hình		Sự thiếu phù hợp		R^2	$CV_{height}(\%)$
	Giá trị F	Giá trị P	Giá trị F	Giá trị P		
Chiều cao pic	71,99	< 0,0001	1,86	0,2550	0,9515	7,44
Diện tích pic	145,77	< 0,0001	0,34	0,9501	0,9831	1,94
Khoảng cách EOF-taurin	507,72	< 0,0001	2,34	0,1775	0,9951	1,25

Phân tích các kết quả thu được:

Hệ số tương quan r (coefficient of correlation) giữa kết quả thực nghiệm và kết quả mô hình dự đoán của diện tích pic, chiều cao pic và khoảng cách EOF-taurin lần lượt là $r_1 = 0,977$; $r_2 = 0,992$ và $r_3 = 0,996$. Giá trị hệ số tương quan r cao cho thấy có sự tương đồng giữa kết quả dự đoán và kết quả thực nghiệm. Điều này cho thấy phương trình hồi quy đã mô tả chính xác các số liệu thực nghiệm.

Kiểm định F của mô hình (F-test hay kiểm định Fisher) thể hiện trong bảng 3. Giá trị P_{value} của chiều cao pic, diện tích pic và khoảng cách EOF-taurin lần lượt là $P_{height} < 0,0001$, $P_{area} < 0,0001$ và $P_{range} < 0,0001$ nghĩa là chỉ có nhỏ hơn 0,01% sự thay đổi của giá trị F là phần nhiều mà mô hình không tính toán được. Kết quả này cho thấy độ tương thích tốt của hai phương

trình hồi quy so với số liệu thực nghiệm, từ đó cho thấy độ tin cậy thống kê cao.

Hệ số xác định R^2 (coefficient of determination) của chiều cao pic, diện tích pic và khoảng cách hai pic lần lượt là 0,9515, 0,9831 và 0,9951 cho biết lần lượt 95,15%, 98,31% và 99,51% sự biến đổi của chiều cao pic, diện tích pic và khoảng cách EOF-taurin là do ảnh hưởng của các biến độc lập như nồng độ Tris, pH, độ lớn điện thế tách và thời gian bơm mẫu; chỉ có lần lượt là 4,85%, 1,69% và 0,49% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định được nguyên nhân gây ra (sai số ngẫu nhiên).

Kiểm định F cho sự thiếu phù hợp của mô hình (lack of fit) là kiểm định sự thiếu phù hợp của mô hình bằng cách so sánh sự mất mát của các giá trị quan sát (tổng phương sai của giá trị thực nghiệm so với giá trị dự đoán) với phương

sai của các lần chạy điểm lặp tâm, kết quả thu được $P_{\text{value}} > 0,1$ ($P_{\text{height}} = 0,2550$; $P_{\text{area}} = 0,9501$ và $P_{\text{range}} = 0,1775$) cho thấy sự tồn tại của giả thiết đảo là “không có sự thiếu phù hợp” hay sự sai khác giữa hai phương sai này là không đáng kể, từ đó kết luận mô hình phù hợp. Bên cạnh đó, hệ số biến thiên theo độ lệch chuẩn tương đối CV% (coefficient of variation) thấp ($CV_{\text{height}} = 7,44\%$; $CV_{\text{area}} = 1,94\%$ và $CV_{\text{range}} = 1,25\%$) chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại cao.

Các kết quả kiểm định cho thấy sự đúng đắn của các mô hình xây dựng được. Từ đó, biểu thức toán học mô tả mối quan hệ giữa chiều cao, diện tích pic taurin và khoảng cách EOF-taurin với các biến mã hóa (điều kiện khảo sát) như sau:

$$\text{Chiều cao pic } (Y_1) = 0,1082 - 1,155 \cdot 10^{-3} X_1 + 2,915 \cdot 10^{-4} X_4 + 1,258 \cdot 10^{-4} X_1 \cdot X_2 - 8,445 \cdot 10^{-7} X_1 \cdot X_4 - 4,892 \cdot 10^{-7} X_1^2 \quad (1)$$

$$\text{Diện tích pic } (Y_2) \text{ với } \text{Log}_{(10)}(Y_2) = -11,695 - 0,0918 X_3 + 0,0239 X_4 + 5,505 \cdot 10^{-3} X_1 \cdot X_2 - 0,2055 X_2^2 + 1,960 \cdot 10^{-3} X_3^2 - 1,567 \cdot 10^{-4} X_4^2 \quad (2)$$

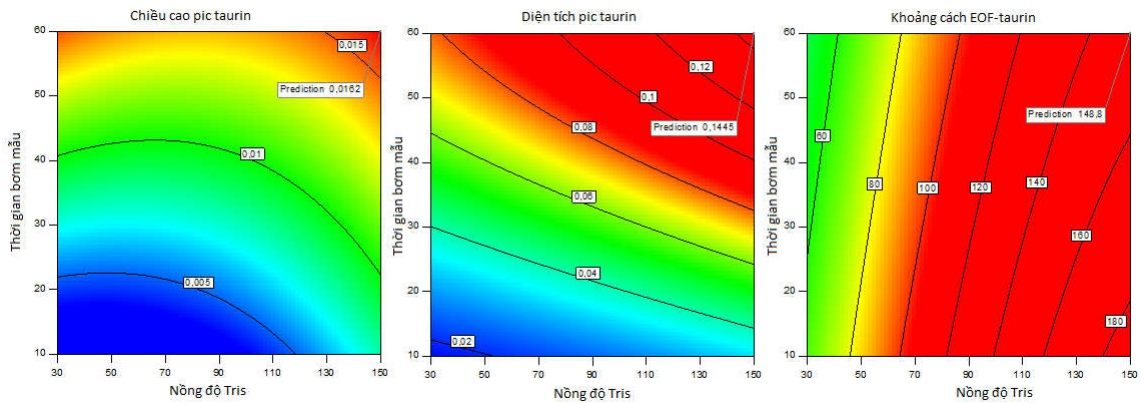
$$\text{Khoảng cách EOF-taurin } (Y_3) \text{ với } \text{Log}_{(10)}(Y_3) = -76,916 + 0,0241 X_1 + 17,614 X_2 - 0,0765 X_3 - 1,991 \cdot 10^{-3} X_4 - 1,859 \cdot 10^{-3} X_1 \cdot X_2 - 1,982 \cdot 10^{-3} X_1^2 - 0,9797 X_2^2 + 1,312 \cdot 10^{-3} X_3^2 \quad (3)$$

Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy (1) cho thấy chiều cao pic chịu ảnh hưởng bậc một của yếu tố nghiên cứu X_1 , X_4 ; bậc hai của yếu tố nghiên cứu X_1 và chịu ảnh hưởng đồng thời của các cặp yếu tố $(X_1 * X_2)$, $(X_1 * X_4)$. Phương trình hồi quy (2) cho thấy logarit cơ số 10 của diện tích pic chịu ảnh hưởng bậc một của các yếu tố nghiên cứu X_3 , X_4 ; bậc hai của yếu tố X_2 , X_3 , X_4 và chịu ảnh hưởng đồng thời của cặp yếu tố $(X_1 * X_2)$. Phương trình hồi quy (3) cho thấy logarit cơ số 10 của khoảng cách EOF-taurin chịu ảnh hưởng bậc một của cả bốn yếu tố nghiên cứu X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ; bậc hai của

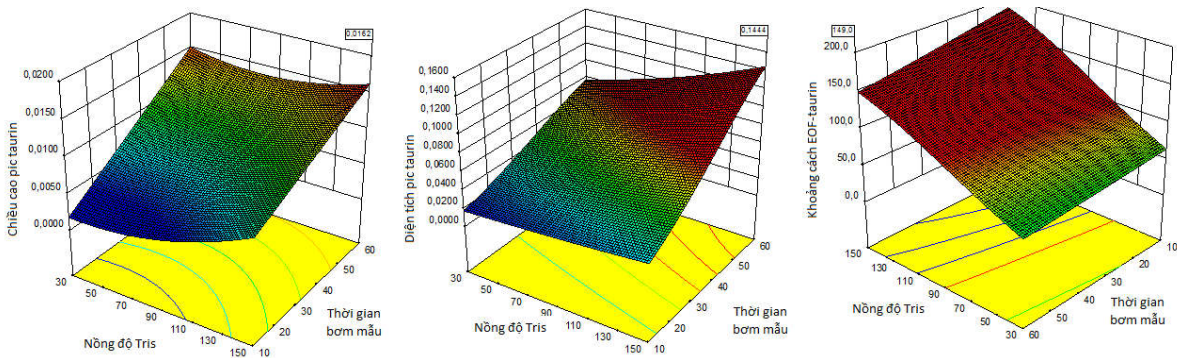
yếu tố X_1 , X_2 , X_3 và chịu ảnh hưởng đồng thời của cặp yếu tố $(X_1 * X_2)$.

Từ các phương trình hồi quy (1) (2) (3), xu hướng ảnh hưởng của các yếu tố ảnh hưởng được giải thích như sau: Yếu tố nồng độ Tris ảnh hưởng theo hướng tiêu cực tới chiều cao pic, điều này có thể được giải thích là do nồng độ Tris tăng thì nồng độ lactic cũng tăng (để giữ pH không đổi), nồng độ đậm cao cản trở sự di chuyển và làm pic taurin tù hơn, chiều cao pic giảm đi. Yếu tố pH ảnh hưởng theo hướng ảnh hưởng tích cực tới khoảng cách EOF-taurin. Điều này có thể được giải thích là do khi pH tăng thì dòng EOF tăng dẫn tới sự lôi cuốn taurin của dòng EOF mạnh hơn, khoảng cách EOF-taurin tăng. Yếu tố điện thế tách ảnh hưởng tích cực tới diện tích pic taurin và ảnh hưởng tiêu cực tới khoảng cách EOF-taurin vì khi điện thế tách lớn trong khi taurin di chuyển ngược chiều điện trường làm giãn rộng chân pic taurin, diện tích pic tăng. Điện thế tách lớn làm cho lực điện trường lớn, chất phân tích di chuyển nhanh hơn, khoảng cách giữa pic taurine và EOF nhỏ hơn. Yếu tố thời gian bơm mẫu ảnh hưởng tích cực tới diện tích và chiều cao pic taurin, ảnh hưởng tiêu cực tới khoảng cách EOF-taurin vì thời gian bơm mẫu tăng làm lượng mẫu phân tích tăng, tín hiệu taurin lớn hơn, chiều cao và diện tích pic tăng. Tín hiệu pic taurin lớn làm chân tích rộng hơn, khoảng cách EOF-taurin giảm.

Từ mô hình rút ra được điều kiện tối ưu cho phân tích taurin là: nồng độ Tris = 150 mmol/L, thời gian bơm mẫu 60 giây, pH = 8,96 và điện thế tách là -10kV. Điều kiện này cần được kiểm tra bằng cách so sánh kết quả phân tích kiểm tra với giá trị dự đoán mô hình, khoảng dự đoán của mô hình. Kết quả tại bảng 4, kết quả thí nghiệm kiểm tra nằm trong khoảng dự đoán của mô hình và độ lệch so với giá trị mô hình dự đoán của mô hình nhỏ hơn 10%. Giá trị chiều cao và diện tích pic mô hình dự đoán có độ chính xác cao.



Hình 3. Đồ thị dạng 2D với các đường đồng mức (2D contour) cho biết ảnh hưởng của cặp yếu tố nồng độ Tris và thời gian bơm mẫu đến chiều cao pic taurin khi yếu tố còn lại được giữ cố định ở mức không.



Hình 4. Đồ thị dạng 3D (3D response surface) cho biết ảnh hưởng của cặp yếu tố nồng độ Tris và thời gian bơm mẫu đến diện tích pic taurin khi yếu tố còn lại được giữ cố định ở mức không.

Bảng 4. Kết quả thí nghiệm kiểm tra điều kiện mô hình dự đoán

	Kết quả phân tích (n = 6)	Khoảng dự đoán (n = 6)	Giá trị dự đoán	Độ lệch (%)
Chiều cao pic (V)	0,0177	0,0140 – 0,0190	0,0162	9,3
Diện tích pic (V.s)	0,1546	0,1148– 0,1809	0,1444	7,1
Khoảng cách EOF-taurin	163,5	117,3 – 188,8	149,0	9,7

n: Số thí nghiệm phân tích lặp lại với điều kiện mô hình dự đoán

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích đã được tối ưu hóa

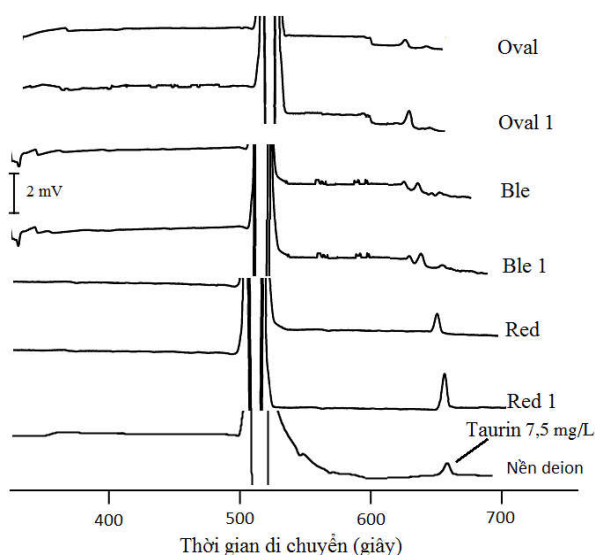
Các thông số đánh giá quy trình phân tích taurin được thực hiện, kết quả được thể hiện tại bảng 5. Từ kết quả cho thấy: giới hạn phát hiện của thiết bị thấp (IDL = 0,119 mg/L), phương pháp có giới hạn phát hiện và giới hạn định

lượng đều thấp (MDL = 0,266 mg/L, MQL = 0,799 mg/L), khoảng tuyến tính rộng (1 – 500 mg/L). Giá trị độ lặp lại được xác định thông qua độ lệch chuẩn tương đối theo thời gian di chuyển (RSD_a) và độ lệch chuẩn tương đối theo diện tích pic (RSD_b) cho kết quả 2 - 3 % chứng tỏ độ lặp lại tốt.

Bảng 5. Đánh giá quy trình phân tích taurin

Thông số	IDL (mg/L)	MDL* (mg/L)	MQL (mg/L)	Khoảng tuyến tính (mg/L)	RSD _a (%)	RSD _b (%)
Taurin	0,119	0,266	0,799	1 - 500	1,83	3,16

Chú thích (*): Giá trị MDL xác định trên nền mẫu sữa bột công thức loại không bổ sung taurin



Hình 5. Giản đồ điện di phân tích taurin trong các nền mẫu thực và mẫu thêm chuẩn

Để xác định hiệu suất thu hồi khi phân tích các mẫu thêm chuẩn, trước hết đường chuẩn phân tích taurin được dựng từ nồng độ 1 – 50 mg/L với hệ số tương quan tuyến tính $R^2 = 0,999$. Kết quả hiệu suất thu hồi trên nền nước

deion là 91,92 % và trên các nền mẫu sữa và nước tăng lực là khá tốt (101,3 – 101,7 %), pic taurin cách xa tín hiệu dòng EOF và không trùng với pic của các thành phần khác trong mẫu thực.

Bảng 6. Hiệu suất thu hồi khi phân tích taurin trên các nền mẫu thực

Mẫu	Mã mẫu	Hệ số pha loãng (lần)	Nồng độ taurin thêm (mg/L)	Kết quả phân tích (mg/L)	Hiệu suất thu hồi trên nền mẫu (%)
Nước deion	Deion		8,00	7,35 ± 0,29	91,9
Nước tăng lực Redbull	Red	400	-	9,58 ± 0,34	-
	Red 1	400	10,00	19,71 ± 0,68	101,3
Sữa tươi Ovaltine	Oval	10	-	3,65 ± 0,16	-
	Oval 1	10	2,00	5,68 ± 0,22	101,4
Sữa bột Bledilait 3	Ble	3	-	3,97 ± 0,17	-
	Ble 1	3	5,00	9,06 ± 0,32	101,7

Chú thích (*): Kết quả phân tích của mẫu sữa bột là hàm lượng phân tích sau khi hóa tan mẫu (1g mẫu sữa bột pha trong 10 mL nước deion)

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp tối ưu hóa mặt mục tiêu với mô hình lập tâm (RSM-CCD) để tối ưu hóa quy trình phân tích taurin bằng kỹ thuật điện di mao quản. Kết quả đánh giá giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp tốt, cho thấy phương pháp có thể phân tích được các mẫu có hàm lượng taurin xuống đến cỡ vài ppm (giới hạn định lượng phương pháp là 0,799 mg/L), phương pháp có độ lặp lại tốt (RSD < 3,16%), khoảng tuyến tính rộng (1- 500 mg/L), hiệu suất thu hồi trên các nền mẫu đạt từ 91,9 – 101,7%. Các kết quả thẩm định trên cho thấy có thể áp dụng phương pháp để phân tích hàm lượng taurin trong các mẫu thực phẩm bổ sung.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong khuôn khổ đề tài “Phân tích sàng lọc và phân tích thẩm định an toàn thực phẩm trên cơ sở phát triển và ứng dụng kỹ thuật điện di mao quản đa kênh sử dụng đồng thời hai cảm biến điện hóa và đo quang: ứng dụng thí điểm trong kiểm soát một số thực phẩm chức năng và đồ uống có cồn dễ bị làm giả tại Việt Nam”, mã số 104.04.2016.50.

Tài liệu tham khảo

- [1] Schuller-Levis, Georgia B.; Park, Eunkyue, Taurine: new implications for an old amino acid, *FEMS Microbiology Letters* 226, (2003) 195–202.
- [2] Huxtable, RJ, Physiological actions of taurine, *Physiol Rev.* 72 (1), (1992) 101–63.
- [3] Urquhart, N; Perry, TL; Hansen, S; Kennedy, J, Passage of taurine into adult mammalian brain, *Journal of Neurochemistry.* 22 (5), (1974) 871–2.
- [4] Leon R, Wu H, Jin Y, Wei J, Buddhala C, Prentice H, Wu JY, Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons, *Journal of Neuroscience Research.* 87 (5), (2008) 1185–1194.
- [5] Yanagita, T; Han, SY; Hu, Y; Nagao, K; Kitajima, H; Murakami, S, Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG2 cells, *Lipids in Health and Disease*7, (2008) 38.
- [6] Zilin Chen, Gang Xu, Karl Specht, Rongjian Yang, Shiwang She, Determination of taurine in biological samples by reversed-phase liquid chromatography with precolumn derivatization with dinitrofluorobenzene, *Analytica Chimica Acta* 296, (1993) 249-253.
- [7] Zhi Chen, Bo Chen, Shouzhao Yao, High-performance liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets, *Analytica Chimica Acta* 569, (2006) 169-175.
- [8] Feng Qu, Zhu-hua Qi, Ke-na Liu, Shi-fen Mou, Ion chromatographic determination of taurine in medicine, nutrient capsule and human urine with electrochemical detection, *Journal of Chromatography* 730, (1999) 161-166.
- [9] Mary T.Kelly, Huguette Fabre, David Perrett, Determination of taurine in plasma by capillary zone electrophoresis following derivatization with florescamine, *Electrophoresis* 21, (2000), 699-705.
- [10] In KyungBae, Hyeoni Ham, Min HeeJeong, Dong HoKim, Ho JinKim, Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process, *Food Chemistry* 172, (2015) 469-475.
- [11] Sandile M.Khamanga, Roderick B, The use of experimental design in the development of an HPLC–ECD method for the analysis of captopril, *Talanta* 83, (2011) 1037-1049.

Using a Surface Response Methodology for the Experimental Design to Optimize the Analysis of Taurine in Food Supplements by Capillary Electrophoresis

Nguyen Manh Huy, Nguyen Thanh Dam, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet

VNU Key Laboratory of Analytical Technology for Environmental Quality and Food Safety Control (KLATEFOS), VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Abstract: This study focused on using a surface response methodology to optimize the taurine analysis by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detector. A response surface methodology coupled with a central composite model comprising 30 experiments was developed with four factors including concentration of Tris buffer, pH value, separating potential and sample injection time. The best set of factor levels for taurine analysis was found as follows: 150 mmol/L of Tris concentration, pH = 8.96, separation voltage of -10 kV, the sample injection time of 60 seconds. The validation of analytical method showed that the detection limit for taurine was 0.266mg/L, linearity was in range from 1 to 500 mg/L, relative standard deviation values for peak areas and migration times were less than 3.16%, the linear correlation coefficient gained 0.999. Recovery efficiency of taurine in several food supplement matrixes such as: fresh milk, milk powder, energy drink were in range from 91.9% to 101.7%.

Keywords: Taurine, capillary electrophoresis, response surface methodology.