

TRYPTOPHAN ANALYSIS OF BO CHINH GINSENG BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TRYPTOPHAN CỦA SÂM BỐ CHÍNH BẰNG MÁY SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Trần Lý Tường

Trường Đại học Quảng Bình

ABSTRACT: *Abelmoschus Sagittifolius* (Kurz) Merr, alias of BoChinh ginseng, also called the PhuYen ginseng, Bao ginseng, Thohao ginseng is an herb. This ginseng species was first discovered in QuangBinh province with the name of BoChinh ginseng and is now successfully restored by the cooperation of scientists from QuangBinh University and Tue Lam High Tech Agriculture Co. Ltd. Nowadays, this model of ginseng cultivation is expanded by many provinces and initially brought high economic efficiency. In order to have a basis to build a nutritional product chain for it, we conducted an analysis of amino acid content in the rhizome of Bo Chinh ginseng. The results showed that the total tryptophan content (hydrolyzed sample) was 0.0643% and the free tryptophan content was 0.0383%.

Keyword: *Abelmoschus*, amino acids, BoChinh ginseng, HPLC, Quảng Bình.

TÓM TẮT: *Abelmoschus Sagittifolius* (Kurz) Merr, còn được gọi là sâm Bồ Chính, sâm Phú Yên, sâm Báo, sâm Thổ Hào là một loại thảo dược. Đây là loài sâm được phát hiện lần đầu tiên tại Quảng Bình với tên gọi sâm Bồ Chính và được khôi phục thành công bởi sự hợp tác giữa các nhà khoa học Trường Đại học Quảng Bình và công ty TNHH nông nghiệp cao Tuệ Lâm. Hiện nay, loài sâm này được nhiều tỉnh nhân rộng và bước đầu mang lại hiệu quả kinh tế cao. Để có cơ sở xây dựng chuỗi sản phẩm dinh dưỡng đầu ra cho dược liệu này, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu xác định hàm lượng tryptophan trong củ sâm Bồ Chính. Kết quả cho thấy, hàm lượng tryptophan tổng số là 0.0643% và hàm lượng tryptophan tự do chiếm 0.0383%.

Từ khóa: *Abelmoschus Sagittifolius*, axit amin, sâm Bồ Chính, HPLC, Quảng Bình.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Bồ Chính là cây thân thảo, có chiều cao dao động từ 30-100cm, rễ cây hình trụ hoặc hình nón, dài khoảng 10-25cm, đường kính cổ rễ khoảng 0.5-3.0cm, ở thân củ có phân thành 2-5 nhánh nhỏ, trên mỗi nhánh rễ có các rễ phụ nhỏ hơn, bề ngoài có màu trắng hoặc vàng nhạt, hình dạng giống củ nhân sâm, thân củ mềm, dễ gãy, tiết diện ngang củ màu trắng có phần vỏ đồng tâm, khi nếm có vị ngọt và độ nhớt cao [13]. Cuống lá dài khoảng 4-8cm, phần

cuối phiến lá hình trái tim, phía ngọn càng lên càng hẹp, phiến lá chia 5 thùy với thùy giữa dài hơn, có khi phiến lá chia thùy giống mũi tên. Vì vậy, trong tài liệu Trung Quốc thường gọi là Nhân sâm năm ngón [10, 12].

Tryptophan là một trong chín axit amin thiết yếu mà cơ thể không tự tổng hợp được, chúng ta bắt buộc phải bổ sung nó qua thực phẩm. Tryptophan là tiền chất của chất dẫn truyền thần kinh serotonin, một chất liên quan đến sự điều chỉnh tâm trạng

tự nhiên, vì nó có khả năng giúp cơ thể sản xuất và cân bằng một số hormone [5]. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng sự thiếu hụt tryptophan có thể làm tăng sự lo lắng và việc tăng tryptophan có thể làm giảm sự lo lắng [1, 3, 4]. Nhìn chung, bằng chứng cho thấy thiếu hụt tryptophan có thể gây lo lắng, trầm cảm, khó tập trung, mất ngủ và khó chịu. Tryptophan cũng đã được tìm thấy để kích thích sự tạo hormone tăng trưởng và thậm chí làm giảm thêm ăn thực phẩm tinh bột, đồng thời giúp chống lại chứng nghiện đường trong một số trường hợp [2].

Phương pháp HPLC là phương pháp hiện đại và phát triển mạnh trong những năm 80, 90, được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như sinh hóa, hóa học, môi trường và đặc biệt với việc phân tích các vitamin và axit amin. Những nghiên cứu tách và xác định axit amin đã có số lượng lớn các bài báo công bố với các quy trình tách và xác định axit [6-9, 11, 14]. Đây là phương pháp phổ biến nhất để xác định axit amin.

Trong thời gian qua, từ khi công ty TNHH Nông nghiệp cao Tuệ Lâm công bố khôi phục thành công loài sâm này trên địa bàn tỉnh Quảng Bình cho tới nay nhiều địa phương khác cũng đã nhân rộng mô hình bởi giá trị kinh tế của loài sâm này mang lại cao hơn nhiều so với các cây trồng truyền thống khác. Trong khi đó chưa có công trình nào nghiên cứu sâu về thành phần dinh dưỡng của sâm Bồ Chính, trong khuôn khổ bài báo này, tác giả đã tập trung tìm hiểu hàm lượng axit amin và phân tích hàm lượng tryptophan trong củ sâm Bồ Chính để làm cơ sở cho việc phát triển và sử dụng loài dược liệu này tại tỉnh Quảng Bình nói riêng cũng như Việt Nam nói chung.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

- Tủ sấy;
- Máy nghiền;
- Rây có đường kính lỗ 0.5mm;
- Cân phân tích;
- Giấy lọc;
- Bình định mức, ống nghiệm;
- Hệ thống HPLC;
- Máy ly tâm;
- Máy đo pH;
- Sâm củ 9 tháng tuổi tại Quảng Bình;
- Axit sunfuric(H_2SO_4);
- Dung dịch chuẩn tryptophan;
- Thuốc thử:
p-dimethylaminobenzaldehyd (DMAB);
- Natri Nitrat($NaNO_2$);
- Kali hydroxit(KOH).

2.2. Phương pháp thí nghiệm

a. Chuẩn bị thí nghiệm

- Sâm được sấy khô ở nhiệt độ 40-50°C, đưa vào nghiền thành bột và sàng qua rây có đường kính lỗ 0.5mm.

- H_2SO_4 (10.7 mol/l): Lấy 589ml dung dịch axit H_2SO_4 đậm đặc từ từ cho vào trong 350ml nước cất, sau đó pha loãng tới 1L cất vào tủ lạnh để dùng.

- Dung dịch DMAB 1%: Cân 1g bột DMAB hòa tan trong 100ml dung dịch axit H_2SO_4 nồng độ 10.7 mol/l.

- $NaNO_2$ (0.2%): Cân 0.2g $NaNO_2$ hòa tan trong 100 ml nước cất, để trong chai thủy tinh tối màu để tránh ánh nắng.

- KOH (10%): Cân 10g KOH hòa tan trong 100ml nước cất.

- Dung dịch chuẩn tryptophan (100µg/ml): Cân 200mg tryptophan đã được sấy khô ở 105°C đến khối lượng không đổi, thêm một lượng nhỏ dung dịch

KOH 0.1mol/l để hòa tan, thêm nước cất pha loãng tới 200ml, đựng vào chai tối màu và tránh ánh sáng.

b. Xây dựng đường chuẩn tryptophan

Cho dung dịch chuẩn tryptophan và nước cất vào ống nghiệm có nắp đậy theo ký hiệu ở bảng trên, sau đó thêm riêng 1ml dung dịch KOH 10%, lắc đều, tiếp theo thêm 5 ml dung dịch p-dimethylaminobenzaldehyd 1%. Lắc đều và để yên ở nhiệt độ 25 °C trong 1 giờ, sau đó thêm 0,2 ml dung dịch NaNO₂ 0,2%, đậy nắp trộn đều để yên ở 30 °C trong 30 phút, ống số 0 được sử dụng làm đối chứng. Độ hấp thụ của từng dung dịch ống được đo trên hệ thống HPLC ở bước sóng 595nm.

c. Xác định hàm lượng tryptophan tổng số (dịch thủy phân)

Bước 1. Cân 0,6g mẫu, đặt vào bình định mức 50ml và từ từ thêm 25ml dung dịch KOH 10%. Đặt vào tủ ấm 40°C trong 18 giờ, lấy ra và làm nguội đến nhiệt độ phòng, pha loãng tới 50 ml bằng nước cất, lắc đều và ly tâm để dùng cho các bước tiếp theo.

Bước 2. Dùng bơm tiêm lấy 2 ml phần nổi phía trên (Bước 1) cho vào ống nghiệm có nắp, thêm 5 ml dung dịch p-dimethylaminobenzaldehyd 1% và lắc đều.

Bước 3. Mẫu đối chứng (mẫu trắng) lấy 2 ml dung dịch nổi phía trên (Bước 1), thêm vào 5 ml dung dịch H₂SO₄ 10,7 mol/l,

lắc đều và để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

Bước 4. Thêm mỗi ống nghiệm 0,2 ml dung dịch NaNO₂ 0,2% đặt ở 25°C trong 30 phút. Độ hấp thụ của dung dịch được đo ở bước sóng 595nm.

d. Xác định hàm lượng tryptophan tự do

Bước 1. Cân 0,5g mẫu, đặt vào ống ly tâm 10ml, từ từ thêm 10 ml nước cất, trộn và đặt vào tủ ấm 40°C. Sau khi hoàn thành, lấy ra làm nguội và ly tâm.

Bước 2. Dùng bơm tiêm lấy 2 ml phần nổi phía trên (Bước 1) cho vào ống nghiệm có nắp, thêm 5 ml dung dịch p-dimethylaminobenzaldehyd 1% và lắc đều.

Bước 3. Mẫu đối chứng (mẫu trắng) lấy 2 ml dung dịch nổi phía trên (Bước 1), thêm vào 5 ml dung dịch H₂SO₄ 10,7 mol/l, lắc đều và để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

Bước 4. Thêm mỗi ống nghiệm 0,2 ml dung dịch NaNO₂ 0,2% đặt ở 25°C trong 30 phút. Độ hấp thụ của dung dịch được đo ở bước sóng 595nm.

c. Điều kiện phân tích: Máy Hitachi L-8800, thời gian phân tích: 53 phút; cột phản ứng 4.6mm x 60mm, nhiệt độ cột 70°C; tốc độ dòng 0.4ml/phút;

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Dựng đường chuẩn tryptophan

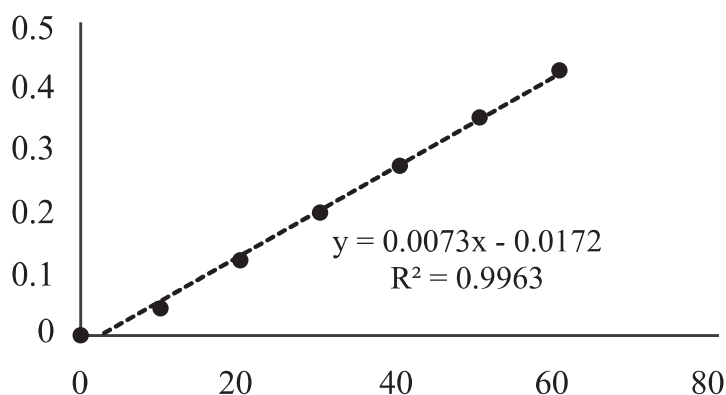
Căn cứ vào mục 2.2.b tiến hành xây dựng đường chuẩn, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Xây dựng đường chuẩn tryptophan

Ký hiệu ống nghiệm	0	1	2	3	4	5	6
Dung dịch chuẩn (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Dung dịch chuẩn (μg)	0	10	20	30	40	50	60
H ₂ O (ml)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4
KOH (10%) (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DMAB (1%) (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
NaNO ₂ (0.2%) (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
V (ml)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
DO	0	0.044	0.120	0.196	0.271	0.348	0.424

Từ số liệu ở Bảng 1, dùng phần mềm Origin xuất được đường cong tiêu chuẩn có dạng $y = 0.0073x - 0.0172$ ($R^2 = 0.9963$).

Trong đó y là giá trị OD, x là khối lượng của tryptophan (μg).

**Hình 1.** Đường chuẩn xác định hàm lượng tryptophan

Về mặt lý thuyết thì đường chuẩn phải đi qua gốc tọa độ, tuy nhiên trong hầu hết các trường hợp đường chuẩn không đi qua gốc tọa độ, trong đó có đường chuẩn tryptophan của thí nghiệm này.

3.2. Phân tích hàm lượng tryptophan tổng số và tryptophan tự do

Kết quả cho thấy, hàm lượng tryptophan tổng số (mẫu thủy phân) là 0.0643% và hàm lượng tryptophan tự do chiếm 0.0383%. Số liệu cụ thể của các tryptophan thủy phân và tryptophan tự do của sâm Bó Chính được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Kết quả phân tích hàm lượng tryptophan tổng số

Số TT mẫu	Trọng lượng mẫu (mg)	Giá trị đo	Hàm lượng Tryptophan (μg)	Hàm lượng Tryptophan (%)
1	24	0.094	15.233	0.063
2	24	0.092	14.959	0.062
3	24	0.096	15.507	0.065
4	24	0.098	15.781	0.066
5	24	0.101	16.192	0.067
6	24	0.094	15.233	0.063
Trung bình				0.0643

Kết quả cho thấy trong 6 mẫu thì sai số kết quả giữa các mẫu không đáng kể, nằm trong giới hạn cho phép, kết quả trung bình cho thấy hàm lượng tryptophan tổng số

trong sâm tương đối thấp, chỉ chiếm 0.0643%, cần phân tích thành phần các axit amin khác để đánh giá hết về giá trị dinh dưỡng của loài sâm này.

Bảng 3. Kết quả phân tích hàm lượng tryptophan tự do

Số TT mẫu	Trọng lượng mẫu (mg)	Giá trị đo	Hàm lượng Tryptophan (μg)	Hàm lượng tryptophan (%)
1	100	0.234	34.411	0.034
2	100	0.259	37.836	0.038
3	100	0.238	34.959	0.035
4	100	0.286	41.534	0.042
5	100	0.278	40.438	0.04
6	100	0.283	41.123	0.041
Trung bình				0.0383

Từ kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng tryptophan tự do thấp hơn nhiều so với tryptophan tổng số, kết quả trung bình của 6 mẫu chỉ bằng 60%.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Bài báo đã đưa ra được quy trình phù

hợp để xác định hàm lượng tryptophan trong sâm Bồ Chính bằng hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp thuốc thử p-dimethylaminobenzaldehyd.

- Bài báo kế thừa các kết quả nghiên cứu về phân tích hàm lượng axit amin để đưa ra quy trình phân tích cho sâm Bồ Chính với

các điều kiện đã được khảo sát tối ưu như: độ pH, nhiệt độ, thời gian, nồng độ...

- Kết quả cho thấy, hàm lượng tryptophan tổng số (mẫu thủy phân) là 0.0643% và hàm lượng tryptophan tự do chiếm 0.0383%. Hàm lượng tryptophan tự do thấp hơn nhiều so với tryptophan tổng số.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hudson, C., S. Hudson, and J. MacKenzie (2007), Protein-source tryptophan as an efficacious treatment for social anxiety disorder: a pilot study. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(9): pp. 928-932.
- [2] Miller, R.P. (2010), Nutrition in addiction recovery. *Many Hands Sustainability Center*.
- [3] Robinson, O.J., et al. (2012), Acute tryptophan depletion increases translational indices of anxiety but not fear: serotonergic modulation of the bed nucleus of the stria terminalis? *Neuropsychopharmacology*, 37(8): pp. 1963-1971.
- [4] Schruers, K., et al. (2002), Acute L-5-hydroxytryptophan administration inhibits carbon dioxide-induced panic in panic disorder patients. *Psychiatry research*, 113(3): pp. 237-243.
- [5] Wirleitner, B., et al. (2003), Interferon- γ -induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Current medicinal chemistry*, 10(16): pp. 1581-1591.
- [6] Ebert, R.F. (1986), Amino acid analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives. *Analytical biochemistry*, 154(2): pp. 431-435.
- [7] Haynes, P.A., et al. (1991), Amino acid analysis using derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 540: pp. 177-185.
- [8] Heems, D., et al. (1998), Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff. *Journal of Chromatography A*, 798(1-2): pp. 9-17.
- [9] HU, N.-b., et al. (2009), Influence of Exo-auxins on Seeds Germination and Seedlings Antioxidant Enzyme System of *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 3.
- [10] Neng-bing, H., et al. (2009), Influence of Exo-auxins on Seeds Germination and Seedlings Antioxidant Enzyme System of *Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 3.
- [11] Strydom, D.J., et al. (1993), Cysteine and tryptophan amino acid analysis of ABRF92-AAA, in *Techniques in Protein Chemistry IV*, Elsevier. p. 279-288.
- [12] 中国科学院中国植物志. 1984, 北京: 科学出版社. pp. 49:59.

4.2. Kiến nghị

- Cần phân tích hàm lượng theo mùa vụ thu hoạch, theo tuổi thu hoạch và trên các loại lập địa khác nhau.

- Cần khảo sát lại ảnh hưởng của các điều kiện môi trường như nồng độ, nhiệt độ, thời gian, độ pH... tới kết quả nghiên cứu.

- [13] 孙德夫, 人参伪品箭叶秋葵的鉴别. 安徽医药, 2003. 7(2): pp. 86-86. [14] Lê, T.H.H. (2008), Nghiên cứu tối ưu hoá các điều kiện để tách và xác định

Liên hệ:

TS. Trần Lý Tường

Viện Nông nghiệp và Môi trường, Trường Đại học Quảng Bình

Địa chỉ: 312 Lý Thường Kiệt, Đồng Hới, Quảng Bình

Email: tranlytuong@gmail.com

Ngày nhận bài: 06/10/2020

Ngày gửi phản biện: 08/10/2020

Ngày duyệt đăng: 08/03/2021