

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG GABA (GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID) TRONG MỘT SỐ SẢN PHẨM TRÀ BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ

Nguyễn Tấn Khanh^{1,2*}, Nguyễn Phong Phú³, Nguyễn Thị Mai Quỳnh³,
Lê Nguyễn Thảo Nguyên³, Nguyễn Việt Khấn³

¹ Phòng Quản lý Khoa học, Trường Đại học Đông Á
33 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Quận Hải Châu, Đà Nẵng

² Viện Ứng dụng Khoa học và Sự sống, Trường Đại học Đông Á
33 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Hòa Cường Nam, Hải Châu, Đà Nẵng

³ Khoa Dược, Đại học Y Dược Huế, Đại học Huế
06 Ngô Quyền, Huế

* Tác giả chịu trách nhiệm chính: khanhnt2501@gmail.com

Ngày nhận bài: 05.10.2021, Ngày chấp nhận: 04.11.2021, Ngày đăng: 30.03.2022

TÓM TẮT:

Gaba (γ -aminobutyric acid) là một amino acid tự nhiên đóng vai trò rất quan trọng đối với hệ thần kinh của cơ thể người, giúp làm giảm căng thẳng về tinh thần và thể chất, giảm bớt lo lắng, tạo tâm trạng bình tĩnh và dễ ngủ. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình xác định hàm lượng Gaba có trong các sản phẩm trà bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Mẫu trà được thu mua trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, sau đó được chiết bằng ethanol 96° và tiến hành loại bỏ tạp chất bằng dung môi hữu cơ và loại màu bằng than hoạt tính. Dung dịch thu được tiến hành phản ứng tạo màu berthelot và đo mức độ hấp thụ phân tử tại bước sóng 630 nm. Kết quả cho thấy phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu này có độ chọn lọc, độ chính xác cao. Vì vậy, quy trình này có thể sẽ phù hợp với các phòng thí nghiệm nhỏ và vừa trên cả nước.

Từ khóa: Gaba, quang phổ hấp thụ phân tử, trà

DEVELOPING A METHOD FOR QUANTIFYING GABA (GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID) IN TEA PRODUCTS BY MOLECULAR ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Tan Khanh Nguyen^{1,2*}, Phong Phu Nguyen³, Mai Quynh Thi Nguyen³,
Thao Nguyen Le Nguyen³, Khan Viet Nguyen³

¹ Scientific Management Department, Dong A University
33 Xo Viet Nghe Tinh, Hoa Cuong Nam, Hai Chau, Da Nang 55000, Vietnam

² Institute of Applied Life Sciences, Dong A University

33 Xo Viet Nghe Tinh, Hoa Cuong Nam, Hai Chau, Da Nang 55000, Vietnam

³ Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University
06 Ngo Quyen, Hue, 530000, Vietnam

* Corresponding author: khanhnt2501@gmail.com

Received: October 05, 2021, Accepted: November 04, 2021, Published: March 30, 2022

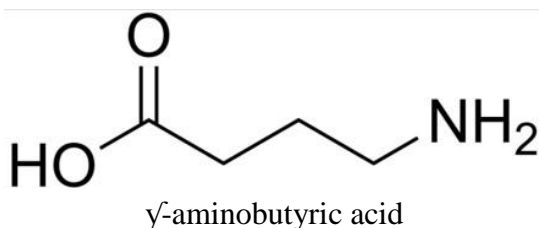
ABSTRACT:

Gaba (γ -aminobutyric acid) is a natural amino acid that plays an important role in the human nervous system, which decreases mental and physical stress, anxiety, and sleeplessness by comforting the body and brain. Therefore, in this study we developed the process of determination of Gaba content in tea products by molecular UV-Vis absorption spectroscopy method. After the

samples were collected from Thua Thien Hue province, they were extracted with ethanol 96° and removed impurities with organic solvents and color with activated carbon. Then the obtained solution was subjected to berthelot coloration reaction and the molecular absorption was measured at 630 nm. The results show that the method in this study has high selectivity and accuracy. Taken together, this process could be relevant to small and medium-sized laboratories across the country.

Keywords: *Gaba, spectrophotometric method, tea*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ



Gaba có tên khoa học là γ-aminobutyric acid (C₄H₉NO₂) là một amino acid có trong trà. Đây là một amino acid không thể thiếu đối với cơ thể người để duy trì sự hoạt động của não bộ, đóng vai trò chính trong việc ức chế sự lan truyền của các tế bào dẫn truyền (Gottesmann, 2002). Gaba có tác dụng ngăn cản các truyền dẫn căng thẳng và bất an đến vùng thần kinh trung ương bằng việc chiếm giữ các vùng tiếp nhận tin các tế bào này, không chế các vùng tiếp nhận tin. Thiếu Gaba con người sẽ trở nên căng thẳng, mệt mỏi, lo lắng, mất ngủ, trầm cảm (Watanabe và cộng sự, 2002). Trong các nghiên cứu trước đây, Gaba được ứng dụng rộng rãi trong việc chữa các bệnh động kinh, trầm cảm lo âu, làm cân bằng huyết áp, giảm cholesterol, tăng cường chức năng thận và làm đẹp da (Wu và cộng sự, 2015; Sasaki và cộng sự, 2006).

Nhờ tác dụng tuyệt vời đó, hiện nay trên thị trường xuất hiện nhiều thực phẩm chức năng có chứa hoạt chất Gaba với tên khoa học là Gamma Aminobutyric được chiết xuất từ các nông sản, được liệu như: gạo nâu, trà, chè (Tiansawang và cộng sự, 2016; Zhao và cộng sự, 2011). Điều đó dẫn tới việc xác định hàm lượng Gamma Aminobutyric đóng vai trò quan trọng trong việc quản lý chất lượng của các sản phẩm trên, với mục đích đảm bảo sức khỏe và tối đa hiệu quả sử dụng cho người tiêu dùng.

Tuy nhiên, định lượng Gaba trong các sản phẩm này tương đối phức tạp, trên thế giới sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sau khi tạo dẫn xuất, LC-MS (Hayat và cộng sự, 2015). Những phương pháp này chi phí cao chỉ phù hợp cho các phòng thí nghiệm hiện đại. Để giải quyết vấn đề trên, chúng tôi thực hiện đề tài: “Xây dựng quy trình định lượng Gaba (gamma-aminobutyric acid) trong một số sản phẩm trà bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử” với mới mục đích giảm chi phí và thời gian phân tích. Phương pháp này đặc biệt phù hợp với các nhà sản xuất trà Gaba vừa và nhỏ trong việc nghiên cứu và kiểm nghiệm thành phẩm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất và thiết bị

Chuẩn bị than hoạt tính và ethanol 96°. Dung dịch phenol 6%, NaClO 7,5% và đệm Borat pH = 9 được pha chế và bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 tháng (Zhang và cộng sự, 2014). Thiết bị sử dụng cho quá trình thí nghiệm bao gồm. Sử dụng máy đo pH, cân phân tích Mettler Toledo, Thủy Sĩ (d = 0,1mg), các dụng cụ thí nghiệm cần thiết để chiết các mẫu trà và tiến hành loại

tạp và máy quang phổ hấp thụ UV-vis (Đức).

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Một số sản phẩm trà được sử dụng phổ biến bao gồm trà bắc, trà xanh, trà ô long và trà hoa lài hiện đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Áp dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis, tạo phức có màu dựa trên phản ứng Berthelot.

- Chuẩn bị các hóa chất cần thiết: cồn ethanol 96⁰, than hoạt tính, đệm Borat, phenol và NaClO.
- Trà được nghiền mịn, sấy khô và bảo quản ở nơi khô ráo.
- Xử lý mẫu: Cân chính xác 2g mẫu cho vào cốc, chiết bằng cồn được đun nóng ở nhiệt độ vừa phải, để trong một ngày. Lọc lấy dịch chiết rồi đem đi cô cạn, sau khi hòa tan cần, tiến hành loại màu bằng dung môi hữu cơ và than hoạt tính.
- Tạo dẫn xuất: Lấy 1ml dịch thu được cho vào ống nghiệm, thêm 1ml đệm Borat pH = 9 và 5ml phenol 6% rồi đem lắc trong nước lạnh 5 phút. Sau đó thêm 2ml dung dịch NaClO 6%, đun nóng trong 10 phút rồi lắc trong nước đá 10 phút (Zhang và cộng sự, 2014).
- Mẫu trắng : Hút 1ml nước cất rồi cho tham gia phản ứng tạo dẫn xuất (Zhang và cộng sự, 2014).

2.4. Phương pháp xử lý kết quả

Sử dụng phương pháp tính toán thống kê có sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện tối ưu cho việc xử lý mẫu

3.1.1. Lựa chọn dung môi tách chiết

Trải qua nhiều quá trình khảo sát, nhận thấy rằng tính chất của Gaba là amino acid nên dễ dàng hòa tan trong nước cất. Tuy nhiên trong trà gồm nhiều thành phần tạp chất khác như gôm nhầy, chất tạo màu. Đây là những chất dễ tan trong nước và rất khó để loại bỏ, có thể ảnh hưởng đến quá trình tạo dẫn xuất. Do đó việc lựa chọn chiết bằng cồn thu được dịch chiết trong suốt, loại bỏ gần hết các tạp chất kể trên nên có thể hạn chế được những nhược điểm đã nêu (“Một số kiến thức cơ bản về chiết xuất dược liệu, 2007”).

3.1.2. Thời gian chiết

Sau quá trình khảo sát, nhận thấy rằng việc chiết bằng cồn có đun nóng tăng lượng Gaba hòa tan. Quá trình chiết một ngày có lượng Gaba tăng đáng kể, nếu kéo dài quá trình chiết thì hàm lượng lại hầu như không thay đổi.

3.1.3. Lựa chọn phương pháp loại màu

Qua quá trình khảo sát, nhận thấy màu sắc của dung dịch chiết là do có chứa các chất như flavonoid, anthranoid có tính chất chung là các glycoside và có thể loại bỏ được bằng dung môi hữu cơ nếu bị thủy phân trong môi trường acid. Sau khi loại các chất trên bằng dung môi hữu cơ, dung dịch còn lại còn màu đỏ nhạt tiếp tục được loại bỏ bằng than hoạt tính. Sử dụng khoảng 0,1g bột than hoạt tính và tiến hành lọc nóng qua giấy lọc để hạn chế sự hấp phụ của than đối với hoạt chất Gaba (Cermakova và cộng sự, 2017).

Quá trình tạo dẫn xuất dựa trên nguyên lý của phản ứng Berthelot và việc khảo sát tỉ lệ các

dung môi phù hợp để thu được độ hấp thụ cao nhất tại bước sóng 630 nm.

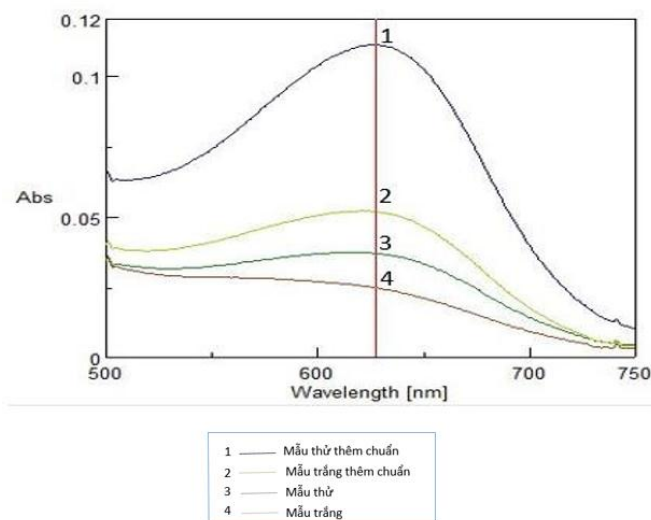
Từ các quá trình khảo sát trên, chúng tôi đã chọn được điều kiện tối ưu như đã trình bày cho việc xác định hàm lượng Gaba có trong trà.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Tính chọn lọc

Tiến hành đo độ hấp thụ của 4 mẫu bao gồm mẫu trắng, mẫu trắng thêm chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn ta được hình dạng phổ quét như **Hình 1**.

Kết quả cho thấy tại bước sóng 630 nm có xuất hiện peak tại các mẫu có chứa hàm lượng Gaba.



Hình 1. Phổ hấp thụ của các mẫu

Mẫu trắng được lựa chọn là trà không có chứa hàm lượng Gaba. Hàm lượng Gaba ở mẫu trắng được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (Zhao và cộng sự, 2011). Tại bước sóng 630 nm, đỉnh hấp thụ đặc trưng của Gaba, mẫu trắng có độ hấp thụ hầu như không đáng kể. Trong khi đó mẫu trắng thêm chuẩn, mẫu thử thêm chuẩn và mẫu thử đều có độ hấp thụ tăng đáng kể tại bước sóng 630 nm. Do vậy, phương pháp được xem là có tính chọn lọc.

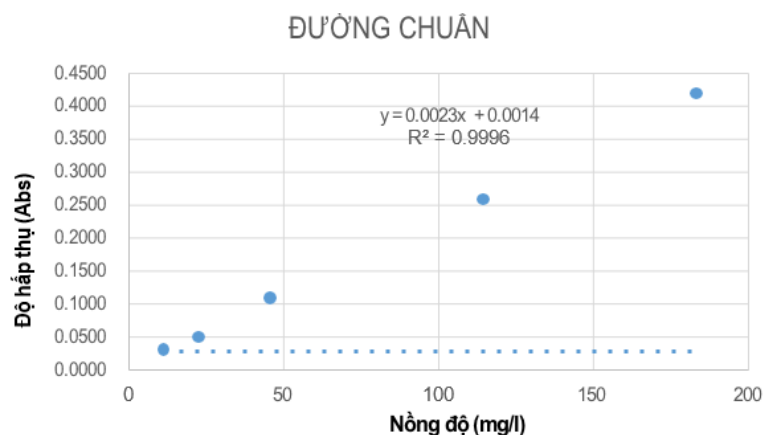
3.2.2. Khoảng nồng độ tuyến tính - Đường chuẩn

Từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 229 mg/l, tiến hành pha loãng thành các dung dịch thứ cấp có nồng độ chính xác từ 11,45 – 183,2 mg/l.

Tiến hành đo độ hấp thụ phân tử tại bước sóng 630 nm ta được kết quả **Bảng 1**.

Bảng 1. Các nồng độ khảo sát và đường chuẩn.

Nồng độ(mg/l)	11,45	22,9	45,8	114,5	183,2	$y = 0,0023x + 0,0014$ $R^2 = 0,9996$
A (Abs)	0,0304	0,0491	0,1078	0,2577	0,4182	



Hình 2. Nồng độ khảo sát và đường chuẩn

Kết quả cho thấy $R^2 = 0,9996$ là đáng tin cậy (Ảnh 2), có thể kết luận rằng trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất chuẩn và độ hấp thụ (**Hình 2**).

3.2.3. Độ chính xác

3.2.3.1. Độ chụm

Để đánh giá độ đúng của phương pháp trên ta tiến hành đồng nhất để định lượng 6 mẫu thử riêng biệt. Kết quả thu được được trình bày ở **Bảng 2**. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại (%RSD = 2,26%) nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn của AOAC.

Bảng 2. Giá trị khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Khối lượng trà (mg)	Độ hấp thụ (Abs)	Khối lượng Gaba (mg)	% Khối lượng
1	2006,3	0,1032	1,1068	0,06
2	2004,1	0,0974	1,0431	0,05
3	2001,7	0,0965	1,0341	0,05
4	2002,2	0,0999	1,0707	0,05
5	2001,0	0,0965	1,0341	0,05
6	2002,8	0,0955	1,0223	0,05
Trung bình				0,05
RSD %				2,26

3.2.3.2. Độ thu hồi

Độ thu hồi được xác định bằng cách thêm chuẩn. Thêm chính xác lượng chuẩn có phần trăm xấp xỉ tương đương 80%, 100%, 120% của lượng chất có trong mẫu thử. Mỗi lượng chuẩn thêm vào được thực hiện trên 3 mẫu độc lập khác nhau. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3**.

Bảng 3. Giá trị khảo sát độ thu hồi của phương pháp

STT	Khối lượng mẫu (mg)	Dung dịch chuẩn thêm nồng độ 229 mg/l (ml)	Khối lượng Gaba đo được (mg)	Độ thu hồi (%)

1	2000,7	0	1,034	0
2	2000,8	3	1,620	94,14
3	2000,2	3	1,652	95,98
4	2003,3	3	1,633	94,90
5	2006,8	5	2,093	96,07
6	2006,9	5	2,109	96,77
7	2006,5	5	2,272	104,29
8	2003,2	7	2,509	95,13
9	2001,5	7	2,406	91,23
10	2004,1	7	2,479	93,99
Trung bình				95,83

Kết quả cho thấy phương pháp có độ đúng 95,83%, phù hợp với tiêu chuẩn đề ra của AOAC.

Nhận xét: Kết quả thẩm định tính chọn lọc, độ chính xác, khoảng nồng độ tuyến tính và giới hạn đo, giới hạn phát hiện của phương pháp cho thấy phương pháp này hoàn toàn có thể sử dụng để định lượng hàm lượng Gaba có trong trà tại các phòng thí nghiệm.

3.2.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành pha loãng nồng độ của mẫu chuẩn, lập đường chuẩn với nồng độ nhỏ hơn và xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) dựa trên quy tắc 3 σ . Số liệu đo được thể hiện ở **Bảng 4**.

Bảng 4. Giá trị khảo sát LOD và LOQ của phương pháp

Nồng độ (mg/l)	4,58	11,45	18,32	22,9	45,8	$y = 0,0018x + 0,0127$ $R^2 = 0,9931$
A (Abs)	0,0220	0,0344	0,0443	0,0492	0,0948	

Giá trị σ là độ lệch chuẩn của đường hồi quy, được tính dựa trên phần mềm excel, ta được $\sigma = 0,002647$.

Giá trị LOD và LOQ được tính dựa theo cơ quan y tế châu Âu (EMA, 1995)

$$LOD = 3,3 * \sigma / a \text{ và } LOQ = 10 * \sigma / a$$

Với a là độ dốc của đường tuyến tính.

$$\text{Ta được } LOD = 4,85 \text{ mg/l; } LOQ = 14,71 \text{ mg/l.}$$

Như vậy LOD và LOQ của phương pháp tương đối nhỏ, phù hợp với việc định lượng nồng độ Gaba có trong các mẫu trà trên thị trường.

3.3. Phân tích mẫu thực tế

Nghiên cứu tiến hành thu mua các sản phẩm trà lưu hành trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Thông tin về các mẫu thử được trình bày ở phụ lục 1. Các mẫu thu mua được bảo quản ở điều kiện cơ bản, và tiến hành xử lý theo quy trình đã xây dựng. Kết quả xác định hàm lượng Gaba trong các mẫu trà thu mua được trình bày ở **Bảng 5**.

Bảng 5. Kết quả đo được từ các mẫu khảo sát

STT	Khối lượng trà (mg)	Độ Hấp Thụ (Abs)	Khối lượng GaBa (%)
-----	---------------------	------------------	---------------------

1	2003,5	0,0113	0,01
2	2006,0	0,0984	0,05
3	2000,5	0,0051	0,00
4	2008,1	0,0057	0,00
5	2001,7	0,0104	0,00
6	2008,8	0,0588	0,04
7	2009,5	0,0052	0,00
8	2008,8	0,0057	0,00
9	2004,5	0,0065	0,00
10	2008,7	0,3223	0,17
11	2000,0	0,2863	0,15
12	2009,6	0,1583	0,08
13	2000,3	0,0714	0,04
14	2,0033	0,2260	0,12
15	2,0071	0,2481	0,13

Có thể nhận thấy rằng, hầu hết các loại trà đều chứa hàm lượng Gaba tương đối thấp. Điều này có thể giải thích được bởi vì chất lượng của hầu hết các loại trà được thu mua vẫn chưa đảm bảo về mặt đóng gói và thương hiệu. Một số loại trà có giá thành cao, được chế biến đặc biệt như trà ô long, trà hoa lài lại cho hàm lượng Gaba có tỷ lệ tương đối cao. Các sản phẩm này có thể xem có giá trị đối với người tiêu dùng với các tác động tích cực lên hệ thần kinh.

IV. KẾT LUẬN

Việc áp dụng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử và ứng dụng phản ứng tạo phức Berthenot đã đưa ra một quy trình định lượng hàm lượng Gaba có trong trà đạt tiêu chuẩn của AOAC. Phương pháp có độ chọn lọc, độ chính xác và độ đúng cao, yêu cầu về máy móc và hóa chất khá phù hợp với các phòng thí nghiệm nhỏ và vừa trên cả nước.

* Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Quỹ nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, mã số 06SV/18 đã hỗ trợ kinh phí thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cermakova, L., Kopecka, I., Pivokonsky, M., Pivokonska, L., & Janda, V. Removal of cyanobacterial amino acids in water treatment by activated carbon adsorption. *Separation and Purification Technology*, 173, 330-338, 2017.
- EMA. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ema.europa.eu, 1995.
- Gottesmann, C. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience*, 111(2), 231-239, 2002.
- Hayat, A., Jahangir, T. M., Khuhawar, M. Y., Alamgir, M., Hussain, Z., Haq, F. U., & Musharraf, S. G. HPLC determination of gamma amino butyric acid (GABA) and some biogenic amines (BAs) in controlled, germinated, and fermented brown rice by pre-column derivatization. *Journal of Cereal Science*, 64, 56-62, 2015.
- Một số kiến thức cơ bản về chiết xuất dược liệu trong Kỹ thuật sản xuất dược phẩm. NXB Y học, 2007.
- Sasaki, S., Yokozawa, T., Cho, E., J., Oowada, S., & Kim, M. Protective role of gamma-aminobutyric acid against chronic renal failure in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(11), 1515-1525, 2006.
- Tiansawang, K., Luangpituksa, P., Varanyanond, W., & Hansawasdi, C. GABA (γ -aminobutyric acid)

production, antioxidant activity in some germinated dietary seeds and the effect of cooking on their GABA content. *Food Science and Technology*, 36(2), 313-321, 2016.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., & Hayasaki, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology*, 213, 1-47, 2002.

Wu, C., & Sun, D. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metabolic Brain Disease*, 30(2), 367, 2015.

Zhang, Q., Xiang, J., Zhang, L., Zhu, X., Evers, J. B., Werf, W. van der, & Duan, L. Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice. *Journal of Functional Foods*, 10, 283-291, 2014.

Zhao, M., Ma, Y., Wei, Z. Z., Yuan, W. X., Li, Y. L., Zhang, C. H., Xue, X. T., & Zhou, H. J. Determination and comparison of γ -aminobutyric acid (GABA) content in Pu-erh and other types of Chinese tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3641-3648, 2011.

Phụ lục bổ sung

Số thứ tự	Tên sản phẩm	Địa điểm thu mua	Ngày thu mua
1	Trà Bắc	Chợ Đông Ba	01/07/2019
2	Trà Bắc	Chợ Bến Ngự	02/07/2019
3	Trà Thái Nguyên	Chợ Tây Lộc	05/07/2019
4	Trà xanh loại 1	Chợ Đông Ba	01/07/2019
5	Trà xanh loại 2	Chợ An Cựu	01/07/2019
6	Trà xanh	Chợ Bến Ngự	02/07/2019
7	Trà xanh	Chợ Trường An	02/07/2019
8	Trà xanh	Chợ Tây Lộc	05/07/2019
9	Trà xanh	Chợ Vĩ Dạ	05/07/2019
10	Trà ô long	Chợ Đông Ba	01/07/2019
11	Trà ô long	Chợ An Cựu	01/07/2019
12	Trà hoa nhài	Chợ Đông Ba	01/07/2019
13	Trà hoa nhài	Chợ Bến Ngự	02/07/2019
14	Trà ô long	Chợ Bến Ngự	02/07/2019
15	Trà ô long	Chợ Trường An	02/07/2019