

XÁC ĐỊNH CÁC ACID BÉO CHUỖI NGẮN ĐƯỢC CHUYỂN HÓA TỪ TINH BỘT ĐỀ KHÁNG TRONG PHÂN CHUỘT BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

Nguyễn Hữu Tiến¹, Nguyễn Thị Mai Khanh², Trần Hữu Dũng¹

(1) Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(2) Bệnh viện Đa khoa Hoàn Mỹ Sài Gòn

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) là các sản phẩm chuyển hoá quan trọng từ quá trình lên men kỵ khí các carbohydrat của vi khuẩn ruột. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xác định các SCFAs được chuyển hóa từ tinh bột đề kháng trong phân chuột. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Phân chuột được ăn tinh bột tự nhiên hoặc tinh bột đề kháng; các SCFAs trong phân được tạo dẫn xuất hydrazid và phân tích bằng HPLC. Sau khi được thẩm định theo US-FDA, phương pháp được ứng dụng để xác định SCFAs trong phân chuột ăn hai loại tinh bột. **Kết quả:** Điều kiện sắc ký: cột Eclipse XDB-C8 (4,6mmx150mm, 5µm); pha động MeOH, ACN và đệm TFA 0,057mM (pH 4,5) theo chương trình gradient, bước sóng 396nm. Phương pháp được thẩm định đạt các tiêu chí theo US-FDA. Sử dụng phương pháp này để phân tích cho thấy đã có sự gia tăng rất lớn hàm lượng các SCFAs được chuyển hóa từ tinh bột đề kháng trong thức ăn. **Kết luận:** Phương pháp có thể ứng dụng để định lượng SCFAs trong các phân đoạn tiêu hóa của cơ thể.

Từ khóa: SCFAs, HPLC, tinh bột đề kháng, phân.

Abstract

DETERMINATION OF SHORT CHAIN FATTY ACIDS IN RAT FECES TREATED WITH RESISTANT STARCH BY HPLC

Nguyen Huu Tien¹, Nguyen Thi Mai Khanh², Tran Huu Dung¹

(1) Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital, Hue University

(2) Hoan My Saigon Hospital

Background: Short-chain fatty acids (SCFAs), mostly found in colon feces, is an important group of gut microbial metabolites from anaerobic fermentation of indigestible carbohydrates. **Objectives:** To develop an HPLC method to determine SCFAs in rat feces treated with resistant starch. **Materials and methods:** Sample is the rat feces fed with acetate wheat starch and normal starch; fatty acid hydrazides are derived from SCFAs in feces and measured by HPLC. After validated as guidance of US-FDA, method is applied to identify SCFAs in rat treated two types of starch. **Results:** the HPLC condition was optimized as follow: Eclipse XDB-C8 (4.6mmx150mm, 5µm) column; mobile phase: methanol, acetonitrile and 0,057 mM acid trifluoroacetic (pH 4.5) (0:13:87 – 10:20:70 – 0:13:87, v/v/v) in 40 mins; examined wavelength: 396 nm. Method was validated with parameters: system suitability, specificity, linearity, precision, accuracy and stability. The result showed amount ratio of SCFAs in feces of mice group treated with acetate wheat starch containing resistant starch higher than from the diet containing normal starch significantly. **Conclusion:** This method can be used to investigate SCFAs in the gastrointestinal segments of the living organism.

Key words: SCFAs, HPLC, resistant starch, feces.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu về tinh bột đề kháng (RS: resistant starch) và đã khẳng định được vai trò của loại tinh bột này nhờ vào tác dụng đề kháng với enzym amylase nên không được tiêu hóa ở ruột non, góp phần hạn chế đáng kể sự gia tăng đột ngột glucose máu sau bữa ăn. Không những vậy, sau khi thoát khỏi ruột non và đi vào

ruột già, RS sẽ được lên men tạo thành các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs), chứa mạch hydrocarbon ngắn (1C-6C) được chuyển hoá từ quá trình lên men kỵ khí bởi vi khuẩn đường ruột, được tìm thấy nhiều nhất trong phân đại tràng. Các SCFAs có vai trò như một nguồn cung cấp năng lượng cho cơ thể chủ. Bên cạnh đó các SCFAs còn tham gia vào nhiều quá trình khác trong cơ thể sống như điều hoà pH

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Hữu Tiến, email: huutien.pharm181@gmail.com

Ngày nhận bài: 12/1/2019, Ngày đồng ý đăng: 8/2/2019; Ngày xuất bản: 25/2/2019

DOI: 10.34071/jmp.2019.1.11

ruột và các hoạt động của enzym đường ruột [2]; có hoạt tính kháng viêm, điều hoà nhu động ruột [3]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra việc xác định được thành phần và hàm lượng các SCFAs có thể cho biết rõ hơn về mối quan hệ giữa chế độ ăn, thành phần các vi khuẩn ruột, các chuyển hoá sinh hoá trong quá trình tiêu hoá thức ăn ở cơ thể chủ cũng như một số bệnh có liên quan đến đại tràng [2][4]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã áp dụng các phương pháp định lượng các SCFAs trong các mẫu sinh học bằng điện di mao quản [5],[6], sắc ký lỏng khối phổ [2], sắc ký khí khối phổ [4], sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [7]. Trong đó phương pháp HPLC với detector UV được quan tâm hơn cả do có độ nhạy tương đối cao, phổ biến và kinh tế. Tuy nhiên hiện nay tại Việt Nam chưa có công trình nào tiến hành định lượng các SCFAs trong mẫu sinh học bằng một trong các phương pháp trên.

Năm 2018, Trần Hữu Dũng và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu chế biến tinh bột lúa mì acetat (TBAC) định hướng dùng trong hỗ trợ điều trị bệnh đại tháo đường. Đây là loại tinh bột đề kháng RS₄ được hình thành do biến đổi cấu trúc hóa học và có khả năng đề kháng với enzyme amylase rất rõ rệt trên *in-vitro* [1]. Với mong muốn nghiên cứu sâu hơn về sự chuyển hóa của loại tinh bột này sau khi thoát khỏi sự tiêu hóa của ruột non liệu có chuyển hóa tạo ra các SCFAs hay được đào thải nguyên vẹn như các chất xơ cellulose, nhóm nghiên cứu tiếp tục thực hiện đề tài này với mục tiêu xây dựng được phương pháp định lượng các SCFAs được chuyển hóa từ TBAC trong phân chuột thí nghiệm so với tinh bột tự nhiên bằng phương pháp HPLC nhằm làm cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về y sinh và dược lý về các loại SCFAs.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Mẫu tinh bột lúa mì tự nhiên (TBTN) được tinh chế từ tinh bột mì thương mại của Công ty trách nhiệm hữu hạn bột mì Meizan và tinh bột lúa mì acetate TBAC₁₅₀₋₉ được tạo thành bằng phương pháp acetyl hóa có hàm lượng acetyl là 2,4% và chứa hàm lượng tinh bột đề kháng (RS) là 34,5%.

Chuột nhắt trắng đặc thuần chủng dòng Swiss, có thể trọng 20-24g, 4 tuần tuổi, trưởng thành, khỏe mạnh do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Pasteur Nha Trang cung cấp. Chuột được nuôi một tháng để thích nghi với môi trường thí nghiệm.

- *Hóa chất – dung môi*: Các chất chuẩn gồm các acid acetic (100%), propionic (99%), n-butyric (99%),

valeric (98%) và chất nội chuẩn (IS) 2-ethylbutyric acid (98%) đều của Merck, Đức; acid succinic (99%) của HiMedia, Ấn Độ. Methanol (MeOH), acetonitril (ACN), acid trifluoroacetic 100% (TFA) tinh khiết dùng chạy HPLC của Merck, Đức. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (1-EDC-HCl) (HiMedia, Ấn Độ), 2-nitrophenylhydrazine (2-NPH-HCl) (TCI, Nhật) và các hóa chất đạt tinh khiết phân tích.

- *Thiết bị - dụng cụ*: Hệ thống HPLC Shimadzu LC20A – Detector PDA (Nhật), máy ly tâm Z326K Hermle Labortechnik GmbH (Đức), cân phân tích Mettler Toledo ME 204, máy đo pH SENSION™ PH3, tủ lạnh âm sâu Sanyo MDF 293AT, micropipet Labnet (Mỹ) và các dụng cụ thủy tinh chính xác.

Phương pháp nghiên cứu

Chuột được phân thành ngẫu nhiên 2 lô, mỗi lô 8 con (Lô TBTN và Lô TBAC). Hàng ngày cho các chuột mỗi lô ăn huyền phù tinh bột mỗi loại khác nhau bằng đường bơm mẫu xuống thực quản với kim đầu tù lần lượt:

- Lô TBTN: cho ăn huyền phù chứa TBTN với liều 5g/kg cân nặng x 2 liều/ngày (buổi sáng và chiều).

- Lô TBAC: cho ăn huyền phù chứa TBAC₁₅₀₋₉ với liều 5g/kg cân nặng x 2 liều/ngày (buổi sáng và chiều).

Trong suốt thời gian thử nghiệm các lô chuột được cung cấp thức uống hàng ngày là sữa Vinamilk và nước cất cho uống tự do. Tại các thời điểm 5; 10; 15, 18 và 20 ngày, tiến hành thu gom phân chuột mỗi lô để tiến hành định lượng các SCFAs thu được.

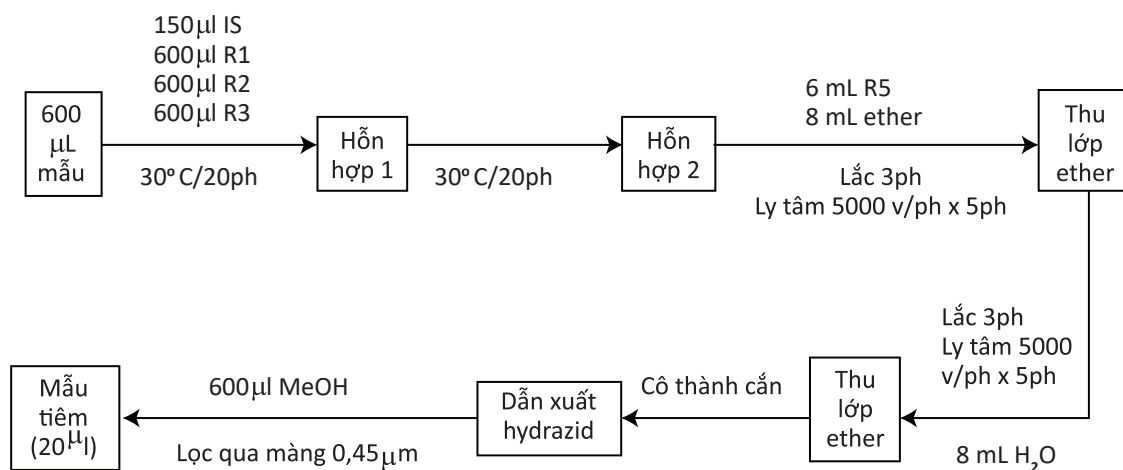
- *Chuẩn bị các thuốc thử tạo dẫn xuất*: Pyridin 3% (tt/tt) (R1), 1-EDC-HCl 250 mmol/L (R2), 2-NPH-HCl 20 mmol/L (R3) được pha trong methanol; NaOH 15% (kl/tt) pha trong nước cất, thêm methanol vào dung dịch NaOH theo tỉ lệ thể tích NaOH/methanol = 80/20 (R4); H₃PO₄ 0,5 M (R5).

- *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn* làm việc: Các dung dịch chuẩn SCFAs và chất nội chuẩn gốc nồng độ 200 mM được pha trong dung dịch MeOH 50% (tt/tt). Từ đó pha thành các dung dịch chuẩn SUC (0,4 mM), ACE (1,6 mM), PRO (0,4 mM), BUT (0,16 mM), VAL (0,05 mM), IS (0,8 mM) trong MeOH.

- Xử lý mẫu

Đối với mẫu chuẩn acid: pha loãng các dung dịch chuẩn gốc đến nồng độ cần thiết, sau đó thực hiện phản ứng tạo dẫn xuất theo quy trình như Hình 1.

Đối với các mẫu phân: Cân 0,5g phân chuột tươi đựng vào falcon 15ml và phân tán trong 5ml MeOH, ly tâm 10.000 vòng/phút x 10 phút ở nhiệt độ 20°C. Thu lớp dịch ở trên để thực hiện phản ứng tạo dẫn xuất, theo quy trình như Hình 1.



Hình 1. Quy trình xử lý mẫu bằng phản ứng tạo dẫn xuất của các SCFAs

- Điều kiện sắc ký: Phương pháp phân tích được tiến hành ở nhiệt độ phòng trên cột Zorbax Eclipse XDB – C8 (4,6 x 150mm, 5µm); pha động gồm MeOH, ACN và đệm TFA 0,057mM pH 4,5 với tỷ lệ dung môi thay đổi theo chương trình gradient 40 phút (0:13:87 – 10:20:70 – 0:13:87), tốc độ dòng 1,4 ml/phút, nhiệt độ cột 40°C, thể tích tiêm 20 µl, detector PDA với bước sóng 396 nm.

Các số liệu phân tích thống kê dựa vào phần mềm Microsoft Excel 2013. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của FDA về thẩm định quy trình phân tích mẫu sinh học [8].

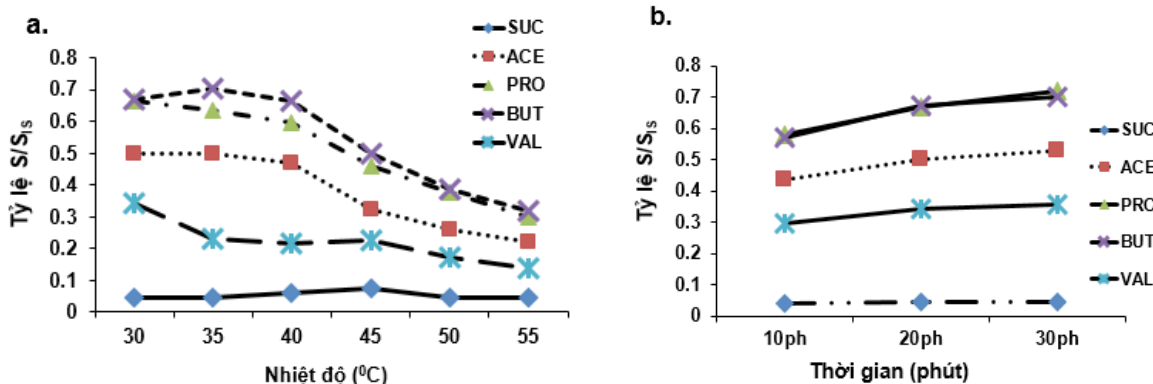
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Khảo sát điều kiện sắc ký

Qua tham khảo tài liệu [7],[9] và với điều kiện

hiện có của phòng thí nghiệm, chúng tôi sử dụng cột Zorbax Eclipse XDB C8 (4,6 x 150 mm, 5µm) trong nghiên cứu này. Nghiên cứu khảo sát trên 2 hệ dung môi pha động: hệ 1 gồm MeOH, ACN và H₂O; hệ 2 gồm MeOH, ACN và đệm TFA 0,057 mM (pH 4,5). Kết quả cho thấy với hệ dung môi MeOH – ACN – đệm TFA 0,057 mM cho pic các chất cân đối, sắc nhọn, tách rời tốt. Để lựa chọn tỷ lệ pha động và thời gian phân tích hợp lý, nghiên cứu đã khảo sát các tỷ lệ khác nhau của 3 dung môi trên và lựa chọn được hệ pha động phù hợp nhất dung phân tích các SCFAs là hệ pha động MeOH – ACN – đệm TFA 0,057 mM (pH 4,5) với chương trình dung môi như sau: 0:13:87 (0 – 9 phút) – 10:20:70 (10 – 35 phút) – 0:13:87 (36 – 40 phút). Sau khi lựa chọn điều kiện sắc ký, phương pháp được thẩm định.

Khảo sát điều kiện tối ưu cho phản ứng tạo dẫn xuất



Hình 2. Tỷ lệ diện tích pic các SCFA với IS theo nhiệt độ (a) và thời gian phản ứng (b).

Kết quả thực nghiệm cho thấy nhiệt độ và thời gian phản ứng tạo dẫn xuất có ảnh hưởng đến hàm lượng SCFAs thu được. Tiến hành xử lý và sắc ký một số mẫu hỗn hợp chuẩn có nồng độ chất như nhau, thực hiện 3 lần và lấy kết quả trung bình ở mỗi điều kiện khảo sát. Các kết quả khảo sát được thể hiện qua các đồ thị ở Hình 2.

Kết quả khảo sát các nhiệt độ phản ứng 30, 35, 40, 45, 50, 55°C với biến đầu ra là tỷ lệ của diện tích pic các chất phân tích với IS cho thấy nhiệt độ tối ưu cho phản ứng tạo dẫn xuất là 30°C.

Kết quả khảo sát thời gian phản ứng tạo dẫn xuất 10, 20, 30 phút với biến đầu ra là tỷ lệ diện tích pic

chất phân tích với IS cho thấy thời gian tối ưu cho phản ứng tạo dẫn xuất là 20 phút (không có sự khác biệt rõ rệt giữa 20 phút và 30 phút). Do đó, điều kiện nhiệt độ 30°C và thời gian 20 phút được chọn làm điều kiện tối ưu cho phản ứng.

Thẩm định phương pháp

- Tính phù hợp hệ thống

Chuẩn bị mẫu hỗn hợp chuẩn 5 acid với nồng độ từng acid trong hỗn hợp lần lượt như sau: SUC (0,4 mM), ACE (1,6 mM), PRO (0,4 mM), BUT (0,16 mM), VAL (0,05 mM); tiến hành xử lý mẫu theo quy trình, tiêm lặp lại 6 lần vào hệ thống sắc ký. Kết quả được trình bày tại Bảng 1.

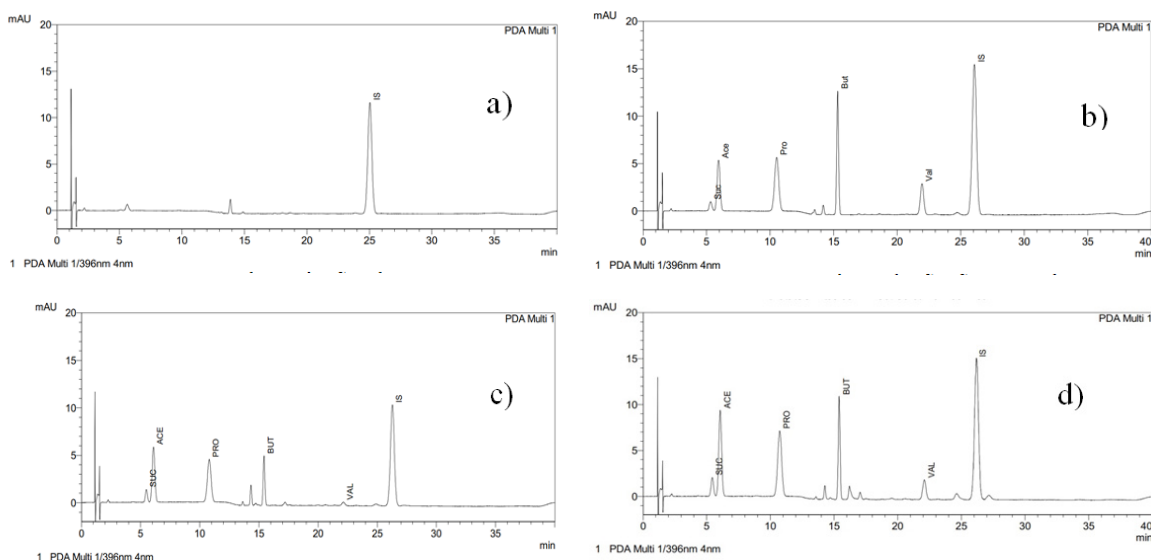
Bảng 1. Kết quả khảo sát độ phù hợp hệ thống

Chất phân tích	Thông số thẩm định							
	t_R		S/S_{IS}		N		R_s	
	TB	RSD%	TB	RSD%	TB	RSD%	TB	TB
SUC	5,25	0,13	0,049	1,63	2407	1,99	9,54	1,38
ACE	5,95	0,10	0,268	0,30	2762	0,75	1,60	1,70
PRO	10,53	0,12	0,380	0,26	4585	1,53	8,52	3,78
BUT	15,31	0,02	0,392	0,20	44243	0,47	10,47	5,91
VAL	21,93	0,01	0,172	0,70	29287	0,67	16,48	8,95
IS	26,04	0,02			26096	0,78	7,10	10,81

Các số liệu thu được cho thấy hệ thống và các điều kiện sắc ký chọn lựa là tương thích cho việc phân tích định lượng các SCFAs trong phân chuột.

- Tính chọn lọc

Tiến hành sắc ký 10 mẫu gồm: 5 mẫu đơn từng acid, mẫu trắng MeOH, mẫu hỗn hợp chuẩn, mẫu phân, mẫu phân thêm chuẩn. Sắc ký đồ của các mẫu được trình bày ở Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ các mẫu: a) Mẫu trắng MeOH có IS; b) Mẫu hỗn hợp chuẩn; c) Mẫu phân; d) Mẫu phân thêm chuẩn

Từ kết quả thực nghiệm cho thấy các pic sắc gọn, cân đối, tách nhau, trên mẫu trắng tại thời gian lưu của các chất không có pic lạ. Kiểm tra độ tinh khiết pic bằng công cụ Purity View trên phần mềm đi kèm cho thấy các pic đều có giá trị Purity Index từ 0,9999 đến 1,0000. Do đó phương pháp có độ chọn lọc tốt.

- Khoảng nồng độ tuyến tính

Chuẩn bị một dãy mẫu hỗn hợp chuẩn 5 acid với các nồng độ giảm dần, xử lý và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã xác định. Kết quả được trình bày ở *Bảng 2* và *Hình 4*.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính

SCFAs	SUC	ACE	PRO	BUT	VAL
Khoảng nồng độ (mM)	0,05 - 1,6	0,2 - 6,4	0,05 - 1,6	0,02 - 0,64	0,00625 - 0,2
Đường tuyến tính	$y = 0,0811x + 0,0089$	$y = 0,1404x + 0,0209$	$y = 0,845x + 0,0094$	$y = 1,842x + 0,0362$	$y = 2,9494x + 0,0065$
Hệ số tương quan (r^2)	0,9974	0,9994	0,9991	0,9955	0,9982

Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát của từng acid có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ với tỷ lệ diện tích pic chuẩn và chuẩn nội (với $r^2 > 0,995$).

- Xác định LOD – LOQ

Chuẩn bị các mẫu hỗn hợp chuẩn có nồng độ giảm dần, xử lý và tiến hành sắc ký. Xác định tỉ số tín hiệu/nhiều nền (S/N), giá trị LOD được xác định khi S/N=3, giá trị S/N=10. Kết quả các giá trị LOD và LOQ của các acid được thể hiện trong *Bảng 3*.

Bảng 3. Kết quả khảo sát LOD - LOQ

SCFAs	SUC	ACE	PRO	BUT	VAL
LOD (μM)	2,97	7,56	1,57	0,55	0,55
LOQ (μM)	9,9	25,19	5,22	1,85	1,84

- Độ chính xác

Tiến hành xử lý và sắc ký 6 mẫu phân ngay sau khi lấy ở chuột. Hàm lượng SCFAs trong phân ($\mu\text{mol/g}$) trong các mẫu được tính từ đường chuẩn được thiết lập trong cùng ngày và lặp lại quy trình này trong ngày thứ hai trên cùng mẫu. Kết quả được thể hiện trong *Hình 4*.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chính xác

SCFAs		SUC	ACE	PRO	BUT	VAL
Trong ngày	TB ($\mu\text{mol/g}$)	13,57	28,52	5,98	1,58	0,16
	RSD %	7,05	6,74	6,00	6,09	5,52
Khác ngày	TB ($\mu\text{mol/g}$)	13,48	25,79	5,31	1,40	0,12
	RSD %	5,86	5,35	7,45	7,59	5,44

Phương pháp có độ chính xác tốt với giá trị RSD đều dưới 15%, đáp ứng yêu cầu về độ chính xác của phương pháp phân tích trong mẫu sinh học.

- Độ đúng

Từ mẫu phân đã xác định hàm lượng các SCFAs, chuẩn bị các mẫu phân thêm 10; 20 và 100% chuẩn, tiến hành xử lý và sắc ký các mẫu. Tỷ lệ thu hồi của các SCFAs chuẩn thêm vào được trình bày ở *Bảng 5*.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng (n=3)

SCFAs	Tỷ lệ thu hồi (%) $\pm$ SD				
	SUC	ACE	PRO	BUT	VAL
Phân thêm 10% chuẩn	101,0 $\pm$ 8,5	94,4 $\pm$ 3,5	101,5 $\pm$ 4,8	98,8 $\pm$ 7,5	104,4 $\pm$ 6,9
Phân thêm 20% chuẩn	101,0 $\pm$ 2,5	104,8 $\pm$ 3,6	98,7 $\pm$ 7,3	103,7 $\pm$ 4,2	100,5 $\pm$ 3,5
Phân thêm 100% chuẩn	93,2 $\pm$ 26	98,8 $\pm$ 5,2	97,1 $\pm$ 2,3	96,9 $\pm$ 2,4	99,8 $\pm$ 5,0

Phương pháp có độ đúng tốt với tỷ lệ thu hồi từ 93,2% - 104,8%, đáp ứng yêu cầu về độ đúng của phương pháp phân tích trong mẫu sinh học.

- Độ ổn định của mẫu

Độ ổn định mẫu trước xử lý: Bảo quản mẫu phân trong tủ lạnh âm sâu (-80°C). Lấy mẫu tại các thời điểm

ngày thứ 0, 1, 5, 10, xử lý mẫu và tiến hành sắc ký để đánh giá độ ổn định của mẫu trước xử lý. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ ổn định của mẫu phân trước khi xử lý

Thời điểm	C _{SUC} (mM)	C _{ACE} (mM)	C _{PRO} (mM)	C _{BUT} (mM)	C _{VAL} (mM)
Ngày 0	1,353	2,967	0,610	0,159	0,018
Ngày 1	1,213	2,618	0,608	0,159	0,017
Ngày 5	1,327	3,139	0,534	0,186	0,015
Ngày 10	1,400	2,900	0,572	0,161	0,016
TB	1,323	2,906	0,581	0,166	0,017
RSD%	6,00	7,46	6,15	7,96	6,33

Độ ổn định mẫu sau xử lý: Thực hiện phản ứng tạo dẫn xuất trên các mẫu phân chuột. Xử lý các mẫu trên, đặt trong buồng tiêm mẫu và tiến hành sắc ký tại các thời điểm 0, 6, 12, 18 và 24 giờ để đánh giá độ ổn định mẫu sau xử lý. Kết quả được thể hiện ở Bảng 7.

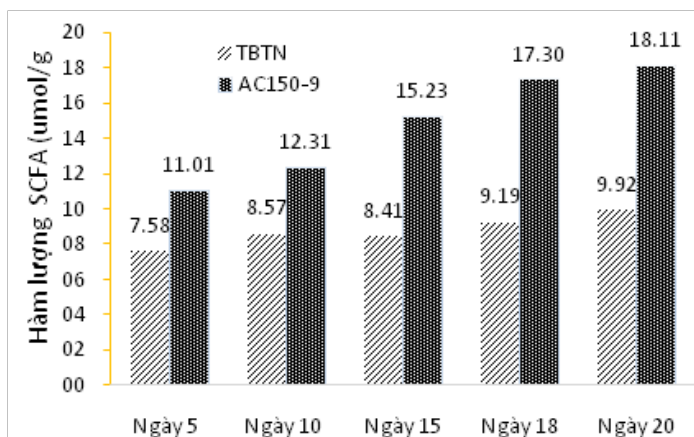
Bảng 7. Kết quả khảo sát độ ổn định của mẫu phân sau khi xử lý

Thời điểm (giờ)	C _{SUC} (mM)	C _{ACE} (mM)	C _{PRO} (mM)	C _{BUT} (mM)	C _{VAL} (mM)
0	1,353	2,967	0,610	0,159	0,016
6	1,353	2,973	0,610	0,160	0,018
12	1,360	2,979	0,610	0,160	0,018
18	1,360	2,973	0,609	0,159	0,018
24	1,347	2,973	0,608	0,159	0,017
TB	1,356	2,972	0,609	0,159	0,018
RSD%	0,40	0,15	0,16	0,25	1,69

Hàm lượng các SCFAs trên các mẫu phân chưa xử lý không thay đổi đáng kể sau 10 ngày bảo quản ở nhiệt độ -80 °C và các mẫu phân đã xử lý không thay đổi đáng kể trong thời gian 24 giờ (RSD ≤ 15%). Điều đó cho thấy các SCFAs trong mẫu phân có độ ổn định tốt trong thời gian dài khi được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu và mẫu đã xử lý có độ ổn định trong vòng 24 giờ.

- *Xác định hàm lượng SCFAs trong phân chuột ăn tinh bột tự nhiên và tinh bột acetat*

Các mẫu phân của các lô chuột thí nghiệm cho ăn TBTN và TBAC₁₅₀₋₉ tại các ngày thứ 5; 10; 15; 18 và 20 được tạo dẫn xuất hydrazide trong pyridin và phân tích trên HPLC với quy trình đã được thẩm định. Hàm lượng tổng SCFAs bao gồm acid acetic, propionic, butyric, succinic và valeric trong phân của các lô chuột thí nghiệm theo thời gian được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Sự biến thiên hàm lượng SCFAs theo thời gian của lô ăn TBTN và TBAC₁₅₀₋₉

4. BÀN LUẬN

Các SCFAs đều có đặc tính hấp thụ UV kém, do đó việc tạo dẫn xuất hydrazid là phù hợp để thu được sản phẩm hấp thụ UV ở bước sóng cao. Nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện phản ứng tối ưu, cách xử lý mẫu phân đơn giản, nhanh, tiện lợi, tiết kiệm; quá trình tạo dẫn xuất không mất quá nhiều thời gian, thích hợp cho các nghiên cứu đánh giá chuyển hóa sinh học về sau.

Nghiên cứu sử dụng cột Eclipse XDB - C8 (150 x 4,6 mm, 5 μ m), đây là loại cột khá phổ biến trong các phòng thí nghiệm phân tích, không sử dụng cột phân tích chuyên dùng cho acid béo có giá thành cao như nghiên cứu [7], cột trao đổi ion [10]. Về bước sóng phát hiện, bước sóng 396 nm cho hấp thụ cực đại của hầu hết các dẫn xuất SCFAs trong môi trường acid, tránh hấp thụ của các tạp và dung môi do bước sóng khá cao. Thời gian phân tích là 40 phút, tuy không ngắn nhưng giúp rửa giải được tối đa các tạp chất trong mẫu phân giúp bảo vệ tuổi thọ cột. Hơn nữa đối với mẫu sinh học phức tạp như mẫu phân thì thời gian phân tích này có thể chấp nhận được.

Phương pháp phân tích bằng HPLC để định lượng SCFAs trong phân chuột có tính chọn lọc cao, khoảng nồng độ tuyến tính khá rộng, độ đúng và độ chính xác cao, mẫu sau xử lý khá ổn định trong vòng 24h, thích hợp cho việc phân tích liên tục nhiều mẫu.

Về ứng dụng của phương pháp, kết quả trên hình 4 cho thấy, trong khi với lô cho ăn TBTN trong một thời gian dài, mặc dù hàm lượng các SCFAs có thay đổi (từ 7,58 lên 9,92 μ mol/g) nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) trong suốt 20

ngày thử nghiệm. Tuy nhiên với lô cho ăn TBAC₁₅₀₋₉, hàm lượng các SCFAs lại biến thiên rất lớn theo thời gian (từ 11,01 lên 17,30 μ mol/g) trong suốt 18 ngày thử nghiệm ($p < 0,05$). Sau đó vẫn có sự tăng lên cho đến ngày thứ 20 (lên 18,11 μ mol/g), tuy nhiên sự gia tăng tại thời điểm này không còn ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả khảo sát cho thấy sau 20 ngày thử nghiệm, TBAC₁₅₀₋₉ đã được lên men hầu như hoàn toàn để chuyển hóa thành các SCFAs với hàm lượng lớn nhất. Kết quả này bước đầu đã cho phép nhóm nghiên cứu nhận định đúng đắn về sự chuyển hóa rất lớn của TBAC trong hệ tiêu hóa chuột thí nghiệm để tạo thành các SCFAs, chiếm tỉ lệ lớn hơn rất nhiều so với TBTN. Điều này được giải thích bởi vẫn còn một lượng rất lớn của RS trong TBAC₁₅₀₋₉ đã đề kháng rất hiệu quả sự tác động của enzyme amylase nên không bị thủy phân trong ruột non được chuyển hóa thành các SCFAs trong ruột già.

5. KẾT LUẬN

Như vậy, phương pháp định lượng các SCFAs trong phân chuột bằng HPLC với độ đúng tốt, khoảng tuyến tính khá rộng, tính chọn lọc cao đã được xây dựng với quy trình xử lý mẫu khá đơn giản. Sử dụng phương pháp này để phân tích cho thấy đã có sự gia tăng rất lớn hàm lượng các SCFAs được chuyển hóa từ tinh bột đề kháng trong thức ăn. Phương pháp này có thể ứng dụng để định lượng các acid béo trong các phân đoạn tiêu hóa đường ruột của cơ thể sống, nhằm đánh giá mối quan hệ giữa chế độ ăn và các chuyển hóa sinh học trong cơ thể, phục vụ cho việc nghiên cứu về tác dụng dược lý của các loại tinh bột đề kháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Ngọc Uyên, Nguyễn Khắc Nam, Trần Hữu Dũng (2018), "Điều chế và xác định các đặc tính lý hóa của tinh bột mì acetat định hướng dùng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường", *Tạp chí Y Dược học*, số 5 tập 8/2018, tr 78-83.
2. S.R. Christoffersen (2017), "LC – MS/MS method for quantification of short chain fatty acids in biological samples". *Bachelor's thesis, Professional bachelor in Laboratory technology*.
3. John L. Rombeau (2004), "Investigations of short-chain fatty acids in humans", *Clinical Nutrition Supplements*, Vol. 1, Issue 2, pp. 19–23.
4. Elyssa Rautiola (2013), "Short chain fatty acids production by Probiotic organisms in the gastrointestinal tract", *Journal of Chromatography A*, Vol. 781, pp.233-238.
5. R.G. Peres, E.P. Moraes, G.A. Micke, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya (2008), "Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection", *Food Control*, Vol. 20, Issue 6, pp. 548–552.
6. Christian W. Klampfl, Wolfgang Buchberger, Paul R. Haddad (2000), "Determination of organic acids in food samples by capillary zone electrophoresis", *Journal of*

Chromatography A, Vol 881, Issue 1-2, pp. 357-364.

7. T Torii, K Kanemitsu, T Wada, S Itoh, A Hagiwara (2010), "Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability". *Annals of Clinical Biochemistry*, Vol.47, Issue 5, pp. 447-452.

8. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, CDER, CVM. (2013), "Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation".

9. Rikizo Horikawa, Takenori Tanimura (1982), "Spectrophotometric determination of carboxylic acids with 2-nitrophenylhydrazine in aqueous solution", *Analytical Letters*, Vol. 15, Issue 20, pp. 1629-1642.

10. Kotani Akira, Miyaguchi Y, Kohama M, Ohtsuka T, Shiratori T, Kusu F. (2009), "Determination of short-chain fatty acids in rat and human feces by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection", *Analytical Sciences*, 25, pp.1007-1011.