

Nghiên cứu gốc

TỐI ƯU HOÁ VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT LỰC ENZYM NATTOKINASE TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHOẺ BẰNG QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ

Nguyễn Văn Sỹ, Lê Hồng Dũng

Viện Dinh dưỡng, Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS).

Phương pháp: Hoạt lực enzyme Nattokinase trong mẫu thử được xác định gián tiếp thông qua việc ước tính dịch thủy phân của nó. Sau phản ứng tiêu sợi huyết, sản phẩm thủy phân hoà tan của Nattokinase được đo ở bước sóng 275 nm.

Kết quả: Các điều kiện tối ưu của quá trình chiết tách đã được khảo sát, phản ứng được tiến hành ở pH 8,5, nhiệt độ phản ứng là 37 °C và thời gian phản ứng là 60 phút. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp lần lượt là 4,4 (FU/g) và 14,8 (FU/g). Độ lặp lại (RSD_r) và độ tái lập nội bộ (RSD_R) của phương pháp nằm trong khoảng từ 1,9 đến 5,4 %. Phương pháp được ứng dụng để xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập tại Hà Nội, kết quả phân tích cho thấy hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu nằm trong khoảng từ 77,0 đến 96,2 % so với giá trị công bố trên nhãn sản phẩm.

Kết luận: Các thông số thẩm định của phương pháp đạt yêu cầu theo Hiệp hội hợp tác phân tích chính thống (AOAC). Phương pháp sử dụng thiết bị đơn giản, kết quả thẩm định có độ tin cậy cao do vậy có thể sử dụng để nghiên cứu sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa enzyme Nattokinase cũng như kiểm soát chất lượng của các loại thực phẩm bảo vệ sức khỏe trên thị trường.

Từ khóa: enzyme Nattokinase, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, quang phổ hấp thụ phân tử

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHOD FOR DETERMINATION OF NATTOKINASE ACTIVITY IN DIETARY SUPPLEMENTS BY ULTRAVIOLET SPECTROPHOTOMETRY

ABSTRACT

Aims: To development of method for determination of nattokinase activity in dietary supplements by ultraviolet spectrophotometry.

Methods: Nattokinase activity determination indirectly through the estimation of its hydrolysate. After the fibrinolytic reaction, the soluble hydrolysate products of Nattokinase are measured at 275 nm.

Results: The optimal conditions of the extraction process were investigated, the reaction was carried out at pH 8.5, the reaction temperature was 37 °C and the reaction time was 60 minutes. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the method were 4.4 (FU/g) and 14.8 (FU/g), respectively.

✉ Tác giả liên hệ: Nguyễn Văn Sỹ
Email: nguyenvansy.ninvn@gmail.com
Doi: 10.56283/1859-0381/953

Nhận bài: 28/8/2025 Chính sửa: 17/10/2025
Chấp nhận đăng: 28/10/2025
Công bố online: 28/10/2025

The repeatability (RSD_r) and internal reproducibility (RSD_R) of the method ranged from 1.9 to 5.4 %. The method was applied to determine the activity of Nattokinase enzyme in 10 dietary supplement samples collected in Hanoi. The analysis results showed that the activity of Nattokinase enzyme in 10 samples ranged from 77.0 to 96.2 % compared to the value declared on the product label.

Conclusion: The validated parameters have met the requirement of Association of Official Analytical Collaboration (AOAC). The method uses simple equipment, the validation results are highly reliable, so it can be used to research the production of dietary supplement containing Nattokinase enzyme as well as control the quality of dietary supplement on the market.

Keywords: *enzyme Nattokinase, dietary supplement, ultraviolet spectrophotometry.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, ở Việt Nam nói riêng cũng như trên thế giới nói chung, tỷ lệ người mắc các bệnh liên quan đến tim mạch ngày càng tăng cao như bệnh nhồi máu cơ tim, nhồi máu não, đột quỵ.... Theo số liệu thống kê của tổ chức Y tế Thế giới (WHO), hàng năm có khoảng 17,9 triệu người chết do mắc phải các bệnh nói trên, nguyên nhân chính là tắc nghẽn động mạch do huyết khối [1]. Sự ngăn ngừa hình thành huyết khối và phân hủy huyết khối tích lũy trong máu có vai trò quan trọng trong việc phòng ngừa và điều trị các bệnh này. Trên thị trường hiện nay có nhiều loại thuốc và thực phẩm chức năng làm tan huyết khối như Urokinase, Streptokinase, Ataphylokinase...nhưng chỉ có tác dụng lên những nơi đã hình thành huyết khối, thời gian tác dụng ngắn và có thể gây phản ứng phụ. Trong khi đó Nattokinase có tác dụng phòng ngừa và làm tan huyết khối mạnh gấp 4 lần plasmin (enzym duy nhất trong cơ thể có khả năng làm tan huyết khối) [2], ngoài ra nhiều nghiên cứu đã chứng minh enzym Nattokinase còn có khả năng làm giảm huyết áp, giảm cholesterol, hạ mỡ máu và cải thiện trí nhớ [3].

Nattokinase là enzym hoạt huyết mạnh có trong một món ăn truyền thống của người Nhật có tên là natto, tức là đậu nành lên men. Hạt đậu nành được ủ ấm với *B. subtilis natto* khi lên men sẽ tạo ra enzym Nattokinase. Nattokinase được bác sỹ Hyroyuki Sumi phát hiện vào năm 1980 tại Nhật Bản khi cho natto vào cục máu đông trong đĩa thí nghiệm ở điều kiện nhiệt độ tương đương nhiệt độ cơ thể [1].

Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS) là một phương pháp phổ biến nhất được áp dụng để xác định hoạt tính Nattokinase một cách gián tiếp thông qua việc ước tính lượng dịch thủy phân của nó. Sau phản ứng tiêu sợi huyết, OD₂₇₅ của sản phẩm thủy phân hòa tan của Nattokinase được đo và so sánh với đơn vị chuẩn [4-5]. Phương pháp này không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố bên ngoài và đã được chứng minh là chính xác và nhạy, vì vậy chúng tôi đã chọn phương pháp quang phổ cho nghiên cứu này.

Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng thực phẩm bảo vệ sức khỏe của người dân ngày càng tăng để hỗ trợ và phòng ngừa bệnh tật. Trong đó thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa enzym

Nattokinase thường được sử dụng để hỗ trợ chức năng của não bộ nên cần phải có một phương pháp có độ nhạy, độ chính xác cao để góp phần nghiên cứu sản xuất những sản phẩm có chất lượng, đảm bảo an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng cũng như giám sát kiểm tra những sản phẩm không rõ nguồn gốc trên thị trường. Bên cạnh đó, với vai trò là Viện đầu ngành về lĩnh vực kiểm nghiệm an toàn thực phẩm ở Việt Nam, được Bộ Y tế chỉ định là cơ sở kiểm nghiệm thực phẩm phục vụ quản lý nhà nước về an toàn thực

phẩm, là cơ sở kiểm nghiệm kiểm chứng đủ điều kiện hoạt động về an toàn thực phẩm thuộc phạm vi quản lý của Bộ Y tế thì việc xây dựng và phát triển các phương pháp kiểm nghiệm mới là việc cần phải làm. Bên cạnh đó phương pháp sau khi nghiên cứu thành công có thể chuyển giao kỹ thuật cho các phòng thí nghiệm tuyến tỉnh có trang bị máy UV-VIS góp phần mở rộng và nâng cao chất lượng cho hệ thống phòng kiểm nghiệm thực phẩm ở Việt Nam.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu và các loại hóa chất

Đối tượng nghiên cứu là thực phẩm bảo vệ sức khỏe có công bố giá trị hoạt lực enzyme Nattokinase trên nhãn sản phẩm.

Các loại hóa chất được dùng trong nghiên cứu gồm:

- di-sodium tetraborate decahydrate, hãng Supacol, code 1.06308.
- sodium chloride, hãng Supacol, code 1.06404.
- hydrochloric acid, hãng Supacol, code 1.00317.
- trichloroacetic acid, hãng Supacol, code 1.00807.
- acetic acid, hãng Supacol, code 1.01830.
- sodium acetate trihydrate, hãng Supacol, code 1.06267.
- calcium sulfate dihydrate, hãng Supacol, code 255548.
- fibrinogen from human plasma, hãng Supacol, code F4883.
- thrombin from human plasma, hãng Supacol, code T1063.
- triton X-100, hãng Supacol, code 1.08603.
- Dung dịch đệm borate 0,05 mol/l (pH 8.5, chứa NaCl): Hòa tan 19,07 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ và 9,0 g NaCl vào khoảng 900 ml nước cất 2 lần. Dung dịch này được chỉnh pH đến 8,5 bằng HCl và thêm nước cất 2 lần vừa đủ 1000 ml.
- Dung dịch trichloroacetic acid (TCA) 0,2 mol/l: Hòa tan 32,68g TCA vào nước cất 2 lần và thêm nước cất 2 lần vừa đủ 1000 ml.
- Dung dịch fibrinogen 0,72%: Dùng pipet hút chính xác 10 ml dung dịch đệm borate 0,05 mol/l vào cốc thủy tinh, thêm 96 mg fibrinogen và để yên trong vài phút. Dung dịch được lọc qua giấy lọc để loại bỏ các chất không tan. Chuẩn bị dung dịch trước khi sử dụng.
- Dung dịch thrombin 1000 U/ml: Hòa tan thrombin trong dung dịch đệm borate 0,05 mol/l tới nồng độ 1000 U/ml. Phân phối dung dịch này vào các ống eppendorf và bảo quản ở nhiệt độ -20°C . Dung dịch được pha loãng 50 lần bằng đệm borate 0,05 mol/l trước khi sử dụng.

- Dung dịch acetic acid 1 mol/l: Hòa tan 60,1 g acetic acid (CH_3COOH) trong nước cất 2 lần và thêm nước cất 2 lần vừa đủ 1000 ml.
- Dung dịch đệm acetat 1 mol/l (pH 6.0): Hòa tan 129,6 g đệm acetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) trong nước cất 2 lần. Thêm tiếp 47,6 ml acetic acid 1 mol/l và thêm nước cất 2 lần vừa đủ 1000 ml.
- Dung dịch triton X-100 nồng độ 10 %: Hòa tan 10 g triton X-100 vào nước cất 2 lần và thêm nước cất 2 lần vừa đủ 100 ml.
- Dung dịch pha loãng mẫu: Hòa tan 0,334 g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 0,585 g NaCl trong nước cất. Thêm 2 ml đệm acetat 1 mol/l (pH 6.0) và 0,5 ml dung dịch triton X-100 10%, thêm nước cất 2 lần vừa đủ 1000 ml. Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ phòng và sử dụng trong 15 ngày.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

- Máy quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS) 1240 hãng Shimadzu (Nhật Bản)
- Cân phân tích ME 204T/00, máy đo pH Seven Excellence của hãng Mettler Toledo (Thụy Điển), máy siêu âm S120H của hãng Elma (Đức), máy lắc vortex VM-10 của hãng Daihan (Hàn Quốc), máy ly tâm 3R của hãng Hettich (Đức).
- Các loại dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm như: bình định mức, bình tam giác, pipet tự động, cuvet thủy tinh, ống ly tâm 50ml...

2.4. Quy trình phân tích

Quy trình xử lý mẫu được tham khảo theo quy trình của Hiệp hội Nattokinase Nhật Bản (Japan Nattokinase Association, JNKA) [4] như sau: Cân 0,1 – 0,2g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 15 ml. Hoà tan mẫu bằng 10ml dung dịch pha loãng mẫu. Lắc đều bằng máy lắc ngang ở tốc độ 100 vòng/phút trong 10 phút và ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút để thu được dung dịch mẫu thử. Mẫu thử và mẫu trắng được thêm tiếp 1,4 ml sodium borate buffer 50 mM và 0,4 ml dung dịch fibrinogen. Đặt trên bếp cách thủy ở 37 °C trong 5 phút. Thêm tiếp 0,1 ml dung dịch thrombin, lắc đều. Sau 10 phút, dùng pipet thêm 0,1 ml dung dịch mẫu thử, lắc đều trong 5 giây và đặt ở bếp cách thủy ở 37 °C. Sau 20 phút và 40 phút, tính từ thời điểm phản ứng, trộn đều trong 5 giây. Sau 60 phút, dùng pipet thêm 0,2 ml dung dịch acid trichloroacetic để dừng phản ứng, trộn

đều và đặt trong bếp cách thủy ở 37 °C trong 20 phút. Ly tâm dịch chiết ở 15000 vòng/phút trong 5 phút. Chuyển 1 ml dung dịch phía trên vào cuvet và đo độ hấp thụ ở bước sóng 275 nm.

Hoạt lực của enzyme Nattokinase được tính toán theo công thức sau:

Hoạt lực enzym (FU/g) =

$$\frac{(A_1 - A_0) \times V \times d}{0,01 \times T \times 0,1 \times m}$$

Trong đó: A_0 : độ hấp thụ của mẫu thử trắng, A_1 : độ hấp thụ của mẫu thử, V: thể tích của dịch chiết hoà tan mẫu (ml), d: độ pha loãng mẫu thử (nếu có), m: khối lượng mẫu thử (g).

Một đơn vị (1 FU) enzyme Nattokinase được định nghĩa là số lượng enzym phân giải sợi fibrin mà làm tăng sự hấp thụ của dịch thủy phân ở bước sóng 275 nm bằng 0,01 trong thời gian một phút dưới các điều kiện phản ứng.

2.5. Tối ưu hoá điều kiện chiết tách

- *Tối ưu hoá pH của đệm borate.*

Chuẩn bị các dung dịch đệm borate 0,05 M ở các giá trị pH 5,5; 7,0; 8,0; 10. Tiến hành các bước theo quy trình phân tích ở mục 2.3 với điều kiện cố định thời gian phản ứng trong 60 phút và nhiệt độ phản ứng là 40 °C. Kết quả được biểu thị bằng biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa giá trị pH và hoạt lực enzyme tính toán được. Giá trị pH được chọn khi mà hoạt lực enzyme xác định được là cao nhất.

- *Tối ưu hoá thời gian phản ứng.*

Tiến hành khảo sát các thời gian phản ứng sau 40, 50, 60, 70 và 80 phút với điều kiện cố định giá trị pH của dung dịch đệm

pH là 8,5 và nhiệt độ phản ứng là 40 °C. Kết quả biểu thị bằng biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa các thời gian phản ứng và hoạt lực enzyme tính toán được. Giá trị thời gian được chọn khi mà hoạt lực enzyme xác định được là cao nhất.

- *Tối ưu hoá nhiệt độ phản ứng.*

Tiến hành khảo sát các điểm nhiệt độ phản ứng là 35, 37, 40 và 45 °C với điều kiện cố định giá trị pH của dung dịch đệm pH là 8,5 và thời gian phản ứng là 60 phút. Kết quả biểu thị bằng biểu đồ thể hiện mối tương quan giữa các nhiệt độ phản ứng và hoạt lực enzyme tính toán được. Giá trị nhiệt độ được chọn khi mà hoạt lực enzyme xác định được là cao nhất.

2.6. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Các thông số xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp thực hiện theo hướng dẫn của AOAC 2016 [6] bao gồm:

- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Tiến hành phân tích mẫu (mẫu thử có hàm lượng thấp có xuất hiện tín hiệu của chất phân tích. Phân tích mẫu 10 lần song song, tính độ lệch chuẩn. Độ lệch chuẩn này phải khác 0. Giá trị LOD và LOQ được tính toán theo công thức sau: $LOD = x_0 + 3SD_0$ và $LOQ = x_0 + 10SD_0$, với SD tính toán theo công thức sau:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Trong đó: x_0 là hàm lượng trung bình của chất phân tích có trong mẫu thử, SD_0 là độ lệch chuẩn của mẫu trắng

- Độ chụm: Thể hiện qua việc đánh giá độ lặp lại và độ tái lập nội bộ thực hiện

ở 3 mức nồng độ khác nhau (mỗi mức thực hiện lặp lại 7 lần). Tính độ lệch chuẩn SD và độ lệch chuẩn tương đối RSD hay hệ số biến thiên CV theo các công thức sau:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$RSD\% = CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Trong đó: SD là độ lệch chuẩn, n: số lần tiến hành thí nghiệm, x_i : giá trị tính được của lần thử nghiệm thứ i, $\bar{x}$: giá trị trung bình của các lần thử nghiệm, RSD%: độ lệch chuẩn tương đối, CV%: hệ số biến thiên

Độ lặp lại được thực hiện bởi 1 kiểm nghiệm viên và độ tái lập nội bộ được thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau.

2.7. Phân tích mẫu thực tế

Quy trình phân tích sau khi được tối ưu hoá và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp sẽ được ứng dụng để xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khoẻ được mua trên thị trường Hà

Nội. Mỗi mẫu được đo lặp lại 3 lần, kết quả trung bình được so sánh với giá trị công bố trên nhãn sản phẩm để bước đầu đánh giá chất lượng của sản phẩm.

2.8. Phân tích số liệu

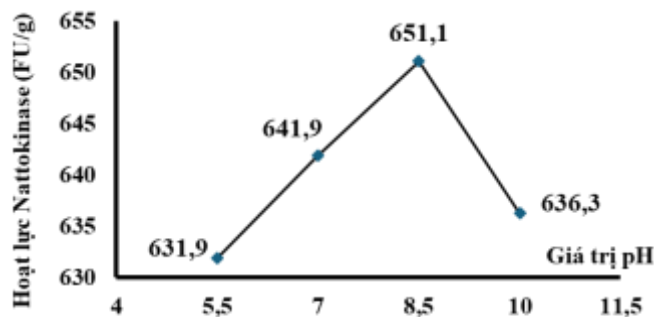
Sử dụng phần mềm đi kèm theo thiết bị UV-VIS để thu được độ hấp thụ của mẫu. Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để tính tỉ lệ thu hồi, độ lệch chuẩn, tính

toán hoạt lực enzyme Nattokinase trong các mẫu thử. Kết quả các thông số thẩm định phương pháp được đánh giá dựa theo tiêu chuẩn AOAC 2016 [6].

III. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả tối ưu hoá điều kiện chiết tách

3.1.1. Kết quả tối ưu hoá pH của đệm borate

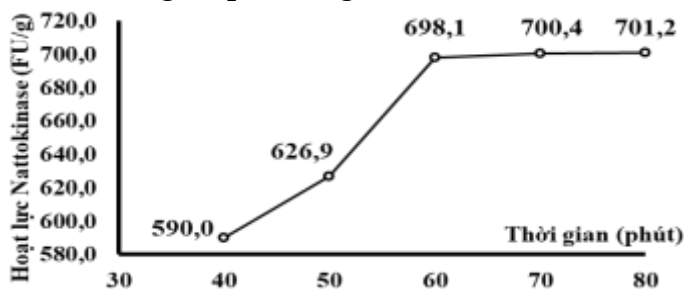


Hình 1: Hoạt lực Nattokinase (FU/g) phụ thuộc vào giá trị pH

Trong nghiên cứu này, giá trị pH của dung dịch đệm borate từ 5,5 đến 10 được chọn để tối ưu hóa pH, thời gian phản ứng cố định là 60 phút ở nhiệt độ 37 °C, kết quả thể hiện ở Hình 1. Hoạt lực của Nattokinase tăng khi tăng pH từ 5,5 đến

8,5 nhưng giảm khi tăng pH đến 10,0. Hoạt lực của Nattokinase đạt giá trị cao nhất tại pH 8,5. Theo kết quả này, pH 8,5 là giá trị pH tối ưu để tiến hành thực hiện các nội dung tiếp theo.

3.1.2. Kết quả tối ưu hoá thời gian phản ứng

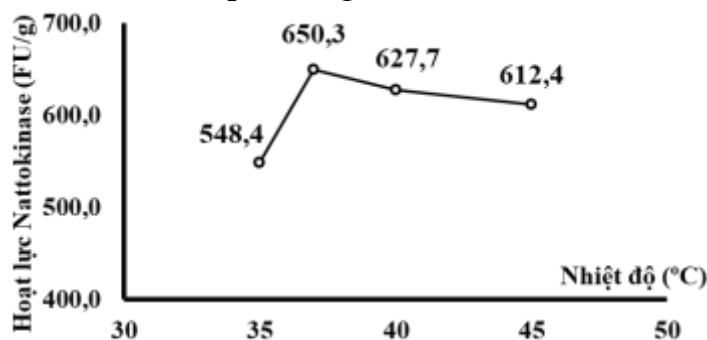


Hình 2: Hoạt lực Nattokinase (FU/g) phụ thuộc vào thời gian

Trong nghiên cứu này, thời gian phản ứng được khảo sát từ 40 đến 80 phút bằng cách đo hoạt lực enzym sau khi ủ dung dịch enzym trong đệm borate pH 8,5 và nhiệt độ phản ứng là 37 °C, kết quả thể hiện ở Hình 2. Hoạt lực của Nattokinase

tăng khi tăng thời gian ủ từ 40 đến 80 phút. Tuy nhiên, hoạt tính nattokinae tại các giá trị 60,70,80 phút không có sự khác. Vì vậy để giảm thời gian của thí nghiệm, chúng ta chọn 60 phút là thời gian phản ứng tối ưu của phương pháp.

3.1.3. Kết quả tối ưu hoá nhiệt độ phản ứng



Hình 3: Hoạt lực Nattokinase (FU/g) phụ thuộc vào nhiệt độ

Trong nghiên cứu này, nhiệt độ phản ứng được khảo sát từ 35 đến 45 °C bằng cách đo hoạt lực enzym sau khi ủ dung dịch enzym trong 60 phút của dung dịch đệm borate pH 8,5, kết quả thể hiện ở Hình 3. Hoạt lực của Nattokinase tăng khi

tăng nhiệt độ từ 35 C° lên 37 C° và giảm khi tiếp tục tăng lên đến 45 C°. Từ kết quả khảo sát thì 37 C° là nhiệt độ tối ưu cho phương pháp xác định hoạt lực của Nattokinase

3.2. Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

3.2.1. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.

Bảng 1. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Mẫu số	Hoạt lực Nattokinase (FU/g)	Mẫu số	Hoạt lực Nattokinase (FU/g)
Mẫu 1	27,7	Mẫu 6	28,3
Mẫu 2	25,5	Mẫu 7	27,5
Mẫu 3	30,1	Mẫu 8	26,9
Mẫu 4	28,5	Mẫu 9	29,5
Mẫu 5	29,3	Mẫu 10	30,5

Tổng 10 mẫu: Trung bình= 28,4; SD= 1,5;

LOD (FU/g) =4,4; LOQ (FU/g)=14,8; R=5,2

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp xác định hoạt lực enzyme Nattokinae được mô tả ở Bảng 1. Trong nghiên cứu này, chúng tôi

chọn mẫu có công bố hoạt lực enzym Nattokinase thấp (khoảng 30 FU/g) để tiến hành các thí nghiệm xác định LOD và LOQ. Kết quả bảng 1 cho thấy, giá trị R = 5,2 nằm

trong khoảng từ 4 đến 10, do vậy kết quả xác định LOD và LOQ của phương pháp đạt độ chính xác và tin cậy cao.

3.2.2. Độ chụm của phương pháp

Bảng 2. Độ lặp lại và độ tái lập nội bộ của phương pháp

Mức nồng độ	Độ lặp lại RSD _r (%)	Độ tái lập nội bộ RSD _R (%)
Tại mức nồng độ 100 (FU/g)	1,9	2,9
Tại mức nồng độ 1000 (FU/g)	3,7	5,4
Tại mức nồng độ 2000 (FU/g)	2,7	3,6

Độ chụm được đánh giá thông qua độ lặp lại và độ tái lập nội bộ. Để xác định độ lặp lại và độ tái lập nội bộ của phương pháp, tiến hành đánh giá ở 3 mức nồng độ thường gặp trong mẫu thử là 100 (FU/g); 1000 (FU/g) và 2000 (FU/g), kết quả thể hiện ở Bảng 2. Ở 3

mức nồng độ (thấp, trung bình, cao) giá trị RSD_r độ lặp lại nằm trong khoảng từ 1,9 đến 3,7 %, và RSD_R độ tái lập nội bộ trong khoảng từ 2,9 đến 5,4 %. Đối chiếu với quy định của AOAC thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong giới hạn cho phép [6].

3.3. Phân tích mẫu thực tế

Bảng 3. Kết quả xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe

Mã số mẫu	Kết quả hoạt lực Nattokinase (FU/viên)	Giá trị Nattokinase trên nhãn (FU/viên)	Chênh lệch so với nhãn sản phẩm (%)
M1 (n=3)	1858,5	2000	7,1
M2 (n=3)	930,8	1000	6,9
M3 (n=3)	2213,6	2400	7,8
M4 (n=3)	911,3	1000	8,9
M5 (n=3)	623,3	668	6,7
M6 (n=3)	91,2	100	8,8
M7 (n=3)	28,9	30	3,8
M8 (n=3)	161,9	200	19,0
M9 (n=3)	230,9	300	23,0
M10 (n=3)	723,5	800	9,6

Quy trình sau khi thẩm định được ứng dụng để xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập trên thị trường Hà Nội gồm 5 mẫu nhập khẩu (kí hiệu từ M1 đến M5) và 5 mẫu sản xuất trong nước (kí hiệu từ M6 đến M10). Tất cả các mẫu đều có công bố giá trị

hoạt lực enzyme Nattokinase trên nhãn sản phẩm. Kết quả thể hiện ở Bảng 3. Kết quả phân tích tại phòng thí nghiệm được so sánh với giá trị công bố trên nhãn để đánh giá % chênh lệch giữa 2 giá trị. Kết quả phân tích 10 mẫu ở bảng 4.8 cho thấy có 8/10 mẫu có chênh lệch giữa kết quả phân

tích tại PTN với công bố trên nhãn sản phẩm dưới 10% trong đó có 5/5 mẫu nhập khẩu và 3/5 mẫu sản xuất trong nước. Hai

mẫu sản xuất trong nước còn lại có kết quả chênh lệch là 19 % và 23 %.

IV. BÀN LUẬN

Thẩm định phương pháp là sự khẳng định bằng việc kiểm tra và cung cấp bằng chứng khách quan chứng minh rằng phương pháp đó đáp ứng được các yêu cầu đặt ra. Kết quả của thẩm định phương pháp có thể được sử dụng để đánh giá chất lượng, độ tin cậy của kết quả phân tích. Thẩm định phương pháp phân tích là một phần không thể thiếu nếu muốn có một kết quả phân tích đáng tin cậy. Theo yêu cầu của ISO/IEC 17025, trước khi áp dụng một phương pháp phân tích cần có các chứng minh rằng phương pháp đó đáp ứng yêu cầu đặt ra, tức là phương pháp phải được thẩm định. Yêu cầu này không chỉ cho các phương pháp nội bộ mà còn cần cho các phương pháp tiêu chuẩn. Do vậy việc xây dựng và thẩm định phương pháp xác định hoạt lực enzym Nattokinase trong nghiên cứu này là cần thiết để đảm bảo độ tin cậy và chính xác của các kết quả phân tích [7].

Nattokinase là một protease serine kiềm, hoạt động cũng như độ ổn định của enzyme này phụ thuộc vào các yếu tố như nhiệt độ, pH và ion kim loại [8]. Vì vậy việc đánh giá các yếu tố này là cần thiết để lựa chọn được các thông số tối ưu để có thể đánh giá chính xác giá trị hoạt lực của enzyme này trong các mẫu phân tích.

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng Nattokinase ổn định trong phạm vi nhiệt độ từ 30 đến 55 °C, nhiệt độ tối ưu trong khoảng 37 đến 45 °C tùy điều kiện nghiên cứu. Hoạt tính enzyme có thể giảm khi nhiệt độ dưới nhiệt độ tối ưu do tốc độ va chạm giữa enzym - cơ chất thấp, còn trên nhiệt độ tối ưu thì hoạt tính enzyme cũng giảm do cấu trúc bậc cao bắt đầu biến tính [8]. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng

tôi đã tiến hành khảo sát tại các điểm nhiệt độ 35, 37, 40 và 45 °C để chọn được nhiệt độ tối ưu phù hợp với nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hoạt lực enzyme Nattokinase tăng khi tăng nhiệt độ từ 35 °C lên 37 °C và giảm khi tiếp tục tăng lên đến 45 °C. Từ kết quả này thì 37 °C là nhiệt độ tối ưu cho phương pháp xác định hoạt lực của Nattokinase, kết quả này cũng tương đồng với phương pháp Amano [9]. Một số nghiên cứu khác công bố nhiệt độ tối ưu cao hơn so với kết quả của nghiên cứu này, như nhiệt độ tối ưu là 40 °C trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Diệu Thu và cộng sự [10], hay 55 °C như kết quả nghiên cứu của Nguyen Thi Thuy Ngan và cộng sự [11].

Enzyme Nattokinase ở dạng chất rắn màu vàng nhạt, tan tốt trong nước. Điểm đẳng điện của enzyme là $8,6 \pm 0,3$ và ổn định hơn trong môi trường kiềm pH 7 – 12. Đặc biệt, điểm hoạt động ổn định nhất của enzyme Nattokinase là pH 7 – 9, khi pH <5, protein enzyme dễ bị biến tính và bất hoạt [8]. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành khảo sát 4 điểm giá trị pH là 5,5; 7; 8,5 và 10 và kết quả cho thấy pH 8,5 là giá trị pH tối ưu (hình 1). Kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu đã công bố trước đây [10] [11]. Việc tối ưu được pH và nhiệt độ có thể hữu ích giúp các nhà sản xuất thực phẩm để lựa chọn các thành phần và điều kiện chế biến phù hợp như chọn một hệ thống đệm phù hợp để duy trì giá trị pH của thực phẩm trong phạm vi ổn định của Nattokinase hoặc thêm một tác nhân bảo vệ để cải thiện khả năng chịu nhiệt. Trong quá trình chế biến và bảo quản thực phẩm chứa Nattokinase,

cần tránh nhiệt độ cao, môi trường acid hoặc kiềm để đảm bảo tính ổn định của Nattokinase [8].

Sau khi tối ưu hoá các điều kiện chiết tách enzyme Nattokinase, nghiên cứu đã tiến hành xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp theo yêu cầu của ISO/IEC 17025, các thông số gồm giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại và độ tái lập nội bộ của phương pháp. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, phương pháp có độ nhạy thấp (LOD là 4,4 FU/g) và hệ số biến thiên (RSD%) của độ lặp lại, độ tái lập nội bộ của phương pháp <5,4 %, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Diệu Thu và cộng sự [10]. Điểm hạn chế trong nghiên cứu này là không thực hiện được đánh giá độ đúng của phương pháp do không tìm kiếm được các mẫu vật liệu chuẩn (QC hoặc CRM).

V. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS) đã được tối ưu hoá một số yếu tố ảnh hưởng gồm giá trị pH của dung dịch đệm borate, nhiệt độ và thời gian phản ứng cũng như xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp gồm giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ lặp lại và độ tái lập nội bộ, kết quả cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt

Quy trình phân tích sau khi tối ưu hoá và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp đã được ứng dụng để bước đầu xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập tại thị trường Hà Nội. Kết quả ở bảng 3 cho thấy độ chênh giữa kết quả phân tích với giá trị công bố trên nhãn sản phẩm nằm trong khoảng từ 3,8 đến 23 %. Kết quả đo được thấp hơn giá trị trên nhãn ở tất cả các mẫu phân tích có thể là do Nattokinase không ổn định và đã bị mất hoạt tính. Tuy nhiên nghiên cứu này chỉ bước đầu ứng dụng quy trình để xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu, vì vậy cần phải phân tích số lượng mẫu lớn hơn để đánh giá chất lượng của các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa Nattokinase.

và đạt yêu cầu theo quy định của AOAC. Phương pháp đã bước đầu được ứng dụng để xác định hoạt lực enzyme Nattokinase trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập tại Hà Nội. Thiết bị sử dụng đơn giản, nên có thể triển khai rộng rãi ở nhiều phòng thí nghiệm ở Việt Nam để nghiên cứu, đánh giá chất lượng của các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa enzyme Nattokinase góp phần bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

Tài liệu tham khảo

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases. Accessed Feb 2, 2024 at https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
2. Akhilesh Modi, Ishan Raval, et al. Heterologous expression of recombinant Nattokinase in *Escherichia coli* BL21(DE3) and media optimization for overproduction of Nattokinase using RSM. *Protein Expression and Purification*. 2024;203:106198-106212.
3. Hongjie Chen, Jiepeng Chen, et al. Effective management of atherosclerosis progress and hyperlipidemia with Nattokinase: A clinical study with 1,062 participants. *Cardiovascular Therapeutics*, 9 (2022), 964977-964986.
4. Japan Nattokinase Association. Assay method of Nattokinase. <http://j-nattokinase.org/en/index.html> Truy cập 27/8/2025

5. T. Astrup and S. Müllertz, “The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 40 (1952), 346351.
6. AOAC Official Method Analysis (2016). *Appendix F. Guidelines for Standard Method Performance Requirements*. Appendix F, p.2.
7. Trần Cao Sơn. *Thẩm định phương pháp trong phân tích hoá học và vi sinh vật*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật. Hà Nội, 2010.
8. Chuyang Wei, Ruitao Cai, Yingte Song, Xiaoyong Liu, Hui-Lian Xu. Resreach Progress of Nattokinase in Reducing Blood Lipid. *Nutrients*. 2025; 17: 1784 – 1802.
9. Inc, A.E., *Protease (Aspergillus allkaline proteinase, EC 3.4.21.63)*, Amano, 77 – 78.
10. Nguyen Thi Dieu Thu, Hoang Viet Dung, Nguyen Thi Hong Ngoc, Vu Thi Thanh An, Mac Thi Thanh Hoa, Cao Cong Khanh, Tran Hung Son. Optimization of spectrophotometric method for determination Nattokinase activity in dietary supplements. *Vietnamese Journal of Food Control*. 2020; 3: 96 – 103.
11. Nguyen Thi Thuy Ngan, Le Tuan, Nguyen Lan Huong. Purification and Characterization of recombinant Nattokinase from *Bacillus subtilis* R0H1. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 2022; 20: 369 – 377.