

Research Article**Study on the method of simultaneous determination of some monoglyceride and diglyceride emulsifiers in milk by liquid chromatography-mass spectrometry****Vu Thi Trang¹, Do Truc Quynh¹, Nguyen Van Thoan², Le Thi Hong Hao¹, Le Thi Thuy^{1*}**¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam²Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam*(Received: 29 Jun 2025, Revised: 13 Aug 2025, Accepted: 17 Aug 2025)***Abstract**

This study aims to develop a method for simultaneous determination of some monoglyceride (MG) and diglyceride (DG) emulsifiers including: monoolein (MO), monostearin (MS), monopalmitin (MP), dipalmitin (DP) in milk by liquid chromatography-mass spectrometry. The sample was ultrasonically extracted with a solvent mixture of chloroform: methanol (MeOH) in the ratio of 2:1 at 45°C for 30 minutes. The extract was evaporated, dissolved with MeOH and analyzed on a liquid chromatography-mass spectrometry system with the following conditions: C18 chromatography column (2.1 mm x 150 mm; 3.5 µm), mobile phase was 100% MeOH, flow rate was 0.3 mL/min, MS detector was in atmospheric pressure chemical ionization mode (APCI). The method had good specificity, the standard curve had a coefficient of $R^2 \geq 0.9995$. The repeatability was in the range of 2.54 - 7.21%, the recovery was in the range of 80.4 - 99.5%, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the method were 0.6 mg/kg and 0.2 mg/kg for MO, MP, MS, respectively; 0.15 mg/kg and 0.5 mg/kg for DP. The method was applied to analyze the emulsifiers in 20 different milk samples collected in Hanoi. The total content of 04 emulsifiers ranged from 4.51 - 42.2 mg/kg for powder milk and 4.67 - 12.6 mg/kg for liquid milk.

Keywords: Monoglyceride, diglyceride, milk, liquid chromatography-mass spectrometry.

*Corresponding author: Le Thi Thuy (E-mail: thuylt@nifc.gov.vn)

<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4545>

Copyright © 2025 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Nghiên cứu phương pháp xác định đồng thời một số chất nhũ hoá monoglyceride và diglyceride trong sữa bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ

Vũ Thị Trang¹, Đỗ Trúc Quỳnh¹, Nguyễn Văn Thoan², Lê Thị Hồng Hảo¹, Lê Thị Thuý¹

¹*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam*

²*Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

Tóm tắt

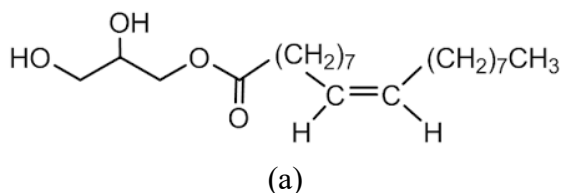
Nghiên cứu này nhằm xây dựng phương pháp xác định đồng thời một số chất nhũ hoá monoglyceride (MG) và diglyceride (DG) gồm: monoolein (MO), monostearin (MS), monopalmitin (MP), dipalmitin (DP) trong sữa bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ. Mẫu được chiết siêu âm với hỗn hợp dung môi chloroform: methanol (MeOH) tỷ lệ 2:1 ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 30 phút. Dịch chiết mẫu được cô quay chân không, được hoà cạn với MeOH và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ với điều kiện như sau: cột sắc ký C18 (2,1 mm x 150 mm; 3,5 µm), pha động là 100% MeOH, tốc độ dòng 0,3 mL/phút, detector MS theo chế độ ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển (APCI+). Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn có hệ số xác định $R^2 \geq 0,9995$. Độ lặp lại trong khoảng 2,54 - 7,21%, độ thu hồi trong khoảng 80,4 - 99,5%, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp tương ứng là 0,06 mg/kg và 0,2 mg/kg cho MO, MP, MS; 0,15 mg/kg và 0,5 mg/kg cho DP. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích các chất nhũ hoá MG, DG trong 20 mẫu sữa khác nhau được thu thập trên địa bàn Hà Nội. Tổng hàm lượng 04 chất nhũ hoá MG và DG trong khoảng từ 4,51 - 42,2 mg/kg đối với sữa bột và 4,67 - 12,6 mg/kg đối với sữa lỏng.

Từ khóa: monoglyceride, diglyceride, sữa, sắc ký lỏng khối phổ.

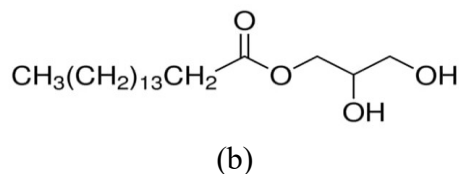
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, ngành công nghiệp sữa đang có xu hướng phát triển theo hướng hiện đại với sự đa dạng và phong phú của các sản phẩm sữa trên thị trường. Để có thể duy trì được trạng thái, kết cấu, hương vị đặc trưng và độ ổn định của từng sản phẩm, bên cạnh sự phát triển của công nghệ sản xuất, cần có vai trò của các chất phụ gia trong đó có chất nhũ hoá. Đây là phụ gia thực phẩm được bổ sung vào thực phẩm nhằm mục đích tạo ra hoặc duy trì dạng nhũ tương đồng nhất của hai hay nhiều thành phần của sản phẩm thực phẩm. Về mặt hóa học, chất nhũ hóa có thành phần hóa học chủ yếu được cấu thành từ rượu và este của acid béo gồm các phân tử mang một phần ưa nước và một phần kỵ nước. Phần kỵ nước bao gồm acid béo, trong khi phần ưa nước có thể bao gồm glycerol hoặc một trong những dẫn xuất este thu được từ phản ứng với acid hữu cơ như acid lactic, citric, acetic hoặc tartaric,... Trong số các chất nhũ hóa được sử dụng phổ biến là monoglyceride (MG) và diglyceride (DG) của các acid béo được mã hóa (E471) có vai trò chính là giúp ổn định nhũ tương, làm giảm sức căng bề mặt giữa các giọt chất béo, ngăn ngừa sự tách lớp giữa chất béo và phần nước trong sữa, giúp chúng dễ dàng phân tán và trộn lẫn với nhau, tạo thành một lớp màng bao quanh các hạt béo, ngăn chúng kết hợp lại với nhau và tạo thành lớp váng sữa. Điều này giúp sữa có cấu trúc mịn, đồng nhất và không bị tách lớp sau khi sản xuất và bảo quản [1-3]. Hàm lượng cho phép của E471 từ 4000 - 5000 mg/kg đối với sản phẩm công thức dinh dưỡng và thực phẩm bổ sung cho trẻ em và mức sử dụng tối đa phụ gia thực phẩm theo thực hành sản xuất tốt (Good Manufacturing Practice - GMP) cho một số sản phẩm thực phẩm khác [4].

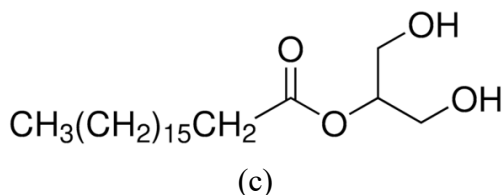
Mặc dù E471 được coi là an toàn nhưng việc sử dụng tràn lan hoặc không kiểm soát có thể gây rối loạn chuyển hóa lipid, glucose và gây loạn khuẩn đường ruột [5]. Do đó, cần có các biện pháp kiểm soát chặt chẽ việc sử dụng chất nhũ hoá này trong thực phẩm, đặc biệt là trong các sản phẩm dành cho trẻ em và người có sức khỏe yếu như sữa. Vì vậy, việc phát triển các phương pháp kiểm nghiệm chính xác và hiệu quả để giám sát hàm lượng E471 trong sữa là cần thiết để bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Tuy nhiên, việc phát triển các phương pháp này không phải là dễ dàng do: Thứ nhất, các chất nhũ hóa trong thực phẩm có nhiều điểm tương đồng về mặt hóa học gây khó khăn cho việc tách và phân biệt khi chúng có mặt đồng thời trong hỗn hợp. Thứ hai, không có một chất nhũ hóa nào có thành phần đơn lẻ và hầu hết là hỗn hợp không đồng nhất. Thứ ba, bản chất của chất nhũ hóa làm cho chúng khó loại bỏ khỏi protein và carbohydrate cấu thành trong thực phẩm.



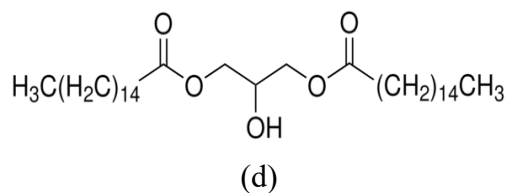
Công thức phân tử MO: $C_{21}H_{40}O_4$



Công thức phân tử MP: $C_{19}H_{38}O_4$



Công thức phân tử MS: $C_{21}H_{42}O_4$



Công thức phân tử DP: $C_{35}H_{68}O_5$

Hình 1. Công thức cấu tạo của MO (a), MP (b), MS (c), DP (d)

Hiện nay, trên thế giới có một số phương pháp được ứng dụng để xác định chất nhũ hóa như: sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) [6], sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - ELSD) [7-9] và HPLC- UV [10], sắc ký khí khối phổ (GC/MS) [11, 12], sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS) [13-18]... MG và DG có cấu trúc tương tự nhau nên sẽ gặp khó khăn để tách các chất khi sử dụng phương pháp HPTLC và HPLC. Nếu sử dụng GC-MS cần quá trình dẫn xuất phức tạp để xác định các MG và DG. Phương pháp LC-MS có thể phân tích trực tiếp các MG và DG mà không yêu cầu quá trình tách phức tạp do các chất có số khối khác nhau. Do đó, nghiên cứu được tiến hành nhằm xây dựng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ để xác định đồng thời một số chất nhũ hoá MG và DG. Phương pháp có độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

04 chất nhũ hoá MG và DG gồm: monoolein (MO), monopalmitin (MP), monostearin (MS), dipalmitin (DP)

Các mẫu sữa dạng bột và dạng lỏng được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội.

2.2. Hóa chất và chất chuẩn

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn phân tích dùng cho sắc ký lỏng khối phổ gồm:

- Các chất chuẩn xuất xứ từ hãng Larodan với độ tinh khiết $\geq 98\%$ gồm: Monoolein code 31-1810-9, số lô 221:3, Monostearin code: 31-1800-9, số lô: A 801:10, Monopalmitin code: 31-1600-9, số lô: Y 644:9, Dipalmitin code: 32-1600-9, số lô: B 493:7

- Các dung môi, hóa chất khác: Methanol (Merck), acetonitril (Merck), aceton (Fisher), acid formic (Fisher), isopropanol (Merck), n-butanol (Trung Quốc), chloroform (Fisher), n-hexan (Fisher).

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ Waters Xevo TQ-XS, Cột sắc ký C18 (2,1 mm x 150 mm; 3,5 μ m) Welch Xlimate, bể rung siêu âm Elma, bể điều nhiệt Julabo, máy cô quay chân không Evela, máy ly tâm Hermle Z383K, máy lắc Vortex IKA và các thiết bị, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp xử lý mẫu

Mẫu được đồng nhất kỹ trước khi thực hiện phân tích bằng cách lắc đều đối với sữa lỏng và trộn đều đối với sữa bột. Qua tham khảo tài liệu [11, 13-15], các chất phân tích tan tốt trong một số dung môi hữu cơ khác nhau như: chloroform, hỗn hợp chloroform và MeOH, butanol, n-hexan và hỗn hợp n-hexan với các dung môi: isopropanol, aceton với các tỷ lệ khác nhau. Tiến hành khảo sát trên các dung môi trên để lựa chọn dung môi chiết tốt nhất. Do hàm lượng chất phân tích trong mẫu khác nhau, cần lựa chọn lượng cân phù hợp. Mẫu được

cân chính xác 0,5 -1 g (đối với mẫu dạng bột) và 2 - 5 g (đối với nền mẫu dạng lỏng) vào ống ly tâm 50 mL, thêm 30 mL dung môi chiết, lắc vortex 1 phút, rung siêu âm, ly tâm 5 phút, tốc độ 6000 vòng/phút. Sau đó, dịch trong phía trên được gạn vào bình cô quay 100 mL. Phần cặn được chiết lặp với dung dịch chiết trên, gộp dịch chiết vào bình cô quay. Sau đó, tiến hành cô quay chân không. Phần cặn được hoà tan trong 10 mL MeOH, dịch chiết được lọc qua màng lọc 0,2 μ m vào lọ đựng mẫu và tiến hành phân tích trên hệ thống LC-MS-APCI.

Mẫu dùng để khảo sát là: mẫu sữa bột

Sử dụng mẫu bột sữa bán thành phẩm không chứa chất nhũ hoá E471 làm mẫu trắng để thực hiện các khảo sát. Mẫu trắng được phân tích giống như quy trình của mẫu thử.

2.4.2. Phương pháp phân tích LC-MS

Qua tham khảo tài liệu [13, 15], cố định một số điều kiện phân tích đồng thời MG và DG bằng phương pháp LC-MS như sau: cột sắc ký Welch Xlimate (2,1 mm x 150 mm; 3,5 μ m), thể tích tiêm là 5 μ L, detector MS chế độ APCI+ với các điều kiện được tối ưu tự động sử dụng phần mềm của thiết bị như trong **Bảng 1**, tiến hành khảo sát một số thông số như: thành phần pha động và tốc độ dòng.

Bảng 1. Điều kiện khối phổ xác định MG và DG

STT	Chất phân tích	Ion quan sát (m/z)	Thông số	Giá trị tối ưu
1	MO	357,3*, 339,3, 265,2	Nhiệt độ đầu phun Probe temperature (°C)	350
			Nhiệt độ nguồn Source temperature (°C)	150
2	MS	341,3* 359,3 403,2	Tốc độ khí loại dung môi Desolvation gas (L/h)	800
			Tốc độ khí đầu phun (Cone gas Flow) (L/h)	150
3	MP	331,3* 313,3 473,3	Tốc độ khí va chạm (Collision gas flow) (mL/phút)	0,15
			Năng lượng va chạm (Collision energy) (V)	4
4	DP	551,3* 338,3 313,2	Năng lượng đầu phun (Cone) (V)	15

(*): Ion định lượng

2.4.3. Phương pháp thẩm định

Phương pháp phân tích được thẩm định các thông số bao gồm: độ đặc hiệu (đánh giá mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu trắng thêm chuẩn), khoảng tuyến tính, đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chụm được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) khi phân tích lặp lại 6 lần (n = 6) trên nền mẫu thực ở cùng điều kiện phân tích, độ thu hồi được đánh giá bằng cách thêm chuẩn tại 3 mức nồng độ: thấp, trung bình, cao trong khoảng nồng độ làm việc. Kết quả được đánh giá theo quy định của AOAC [19] theo các mức nồng độ tương ứng.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

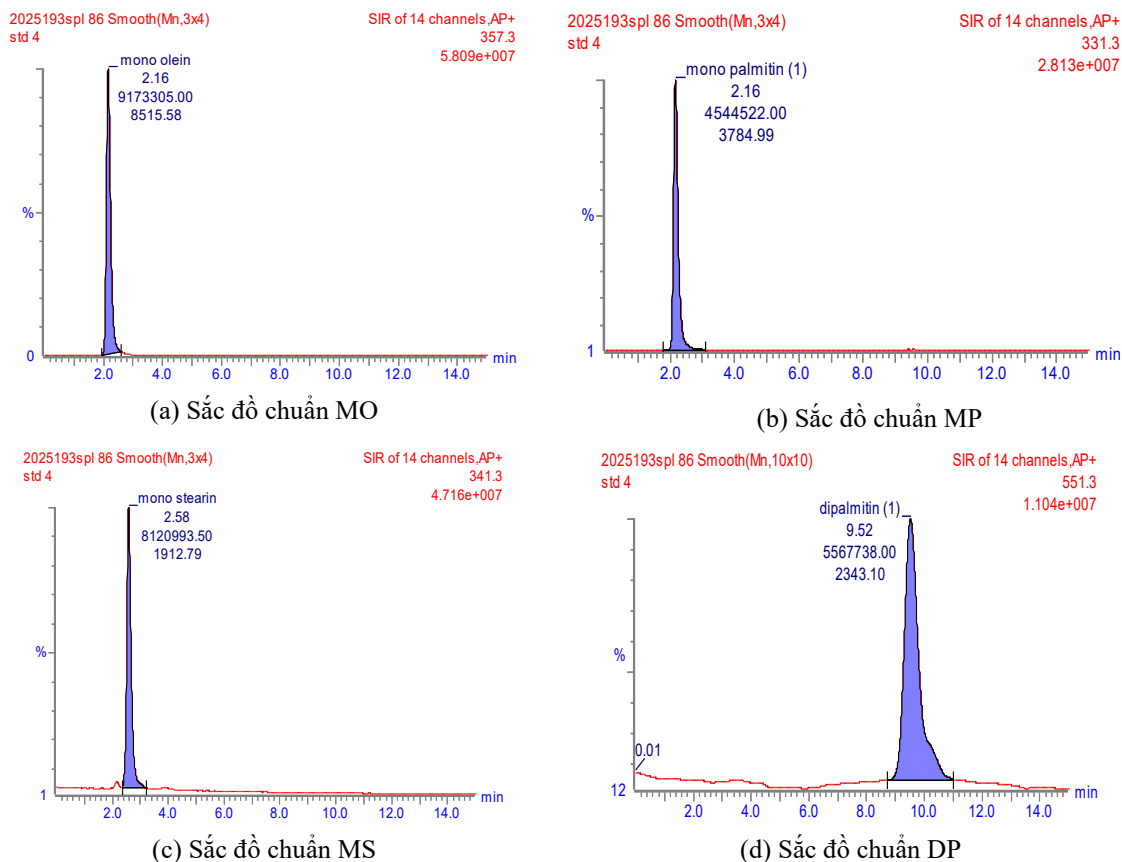
3.1. Khảo sát điều kiện tách và định lượng chất nhũ hoá MG và DG trên thiết bị sắc ký lỏng khối phổ

3.1.1. Khảo sát thành phần pha động

Trong phương pháp sắc ký, pha động là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả tách. Pha động là yếu tố quyết định đến hiệu quả tách sắc ký. Nhìn chung, pha động có thể ảnh hưởng đến: độ chọn lọc của hệ pha, thời gian lưu giữ của chất phân tích, độ rộng pic sắc ký,... Tham khảo một số tài liệu [10,13] tiến hành khảo sát các hệ pha động ACN; ACN : acid formic (95 : 5); ACN : acid formic (90 : 10); ACN : acid formic (80 : 20); MeOH : acid formic (80 : 20); MeOH : acid formic (90 : 10); MeOH : acid formic

(95 : 5); MeOH. Cố định các điều kiện chiết mẫu gồm lượng mẫu cân 0,5 g, 60 mL dung môi chiết mẫu chloroform : MeOH (2 : 1), nhiệt độ chiết 45°C, thời gian chiết mẫu 30 phút, điều kiện khối phổ như **Bảng 1**.

Kết quả cho thấy khi dùng ACN, pic DP cho tín hiệu thấp, nền nhiễu. Khi dùng MeOH cho tín hiệu các chất đều cân xứng và đáp ứng tốt. Thời gian lưu khi sử dụng dung môi ACN dài hơn so với khi sử dụng MeOH (15,64 phút > 9,55 phút). Khi sử dụng MeOH và acid formic 0,1% với tỷ lệ 5%, 10%, 20%, tín hiệu thu được của các chất phân tích kém hơn khi sử dụng MeOH. Ngoài ra dung môi MeOH cũng rất phổ biến trong phòng thí nghiệm, dễ bay hơi, phù hợp với chế độ APCI. Do đó dung môi MeOH được chọn là pha động cho quy trình phân tích. Sắc đồ phân tích MG và DG sử dụng pha động MeOH được thể hiện tại **Hình 2**.



Hình 2. Sắc đồ phân tích MG và DG sử dụng pha động MeOH

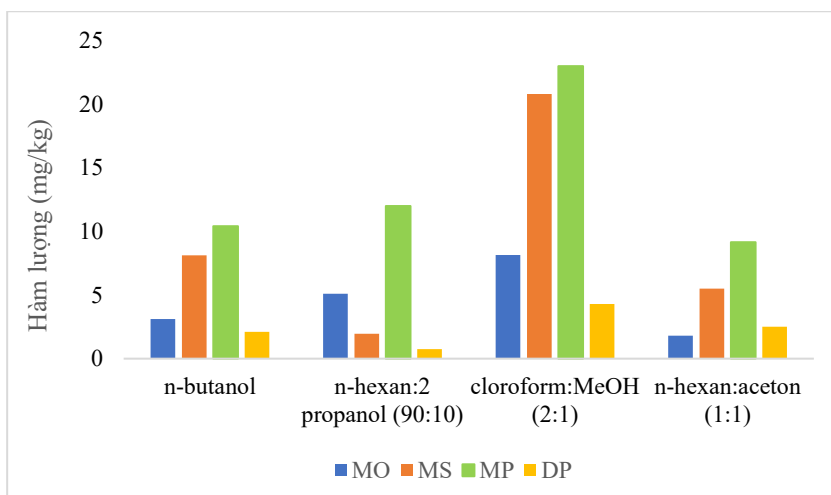
3.1.2. Khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến thời gian lưu của chất phân tích. Tốc độ quá chậm làm kéo dài thời gian phân tích, có thể ảnh hưởng đến độ rộng chân pic, quá nhanh có thể gây tăng áp suất cột. Do sử dụng cột có kích thước hạt nhỏ (3,5 μm), tiến hành khảo sát tốc độ dòng ở các mức 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 mL/phút. Khi tốc độ dòng lớn hơn 0,3 mL/phút, thời gian lưu của 3 chất MO, MS, MP quá ngắn (< 2 phút), khi tốc độ dòng nhỏ hơn 0,3 mL/phút, thời gian lưu của DP kéo dài (10 phút). Do đó lựa chọn tốc độ dòng 0,3 mL/phút để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Qua tham khảo tài liệu [10, 11, 13-18], các dung môi được lựa chọn để khảo sát gồm n-butanol, n-hexan:isopropanol (90:10), n-hexan:aceton (1:1), chloroform:MeOH (2:1). Việc khảo sát được thực hiện trên nền mẫu sữa bột có chứa các chất nhũ hóa. Cố định các điều kiện chiết mẫu gồm lượng mẫu cân 0,5 g, sử dụng 60 mL dung môi chiết, nhiệt độ chiết 45°C, thời gian chiết mẫu 30 phút và tiến hành chiết lặp 2 lần. Kết quả khảo sát được thể hiện ở **Hình 3**.

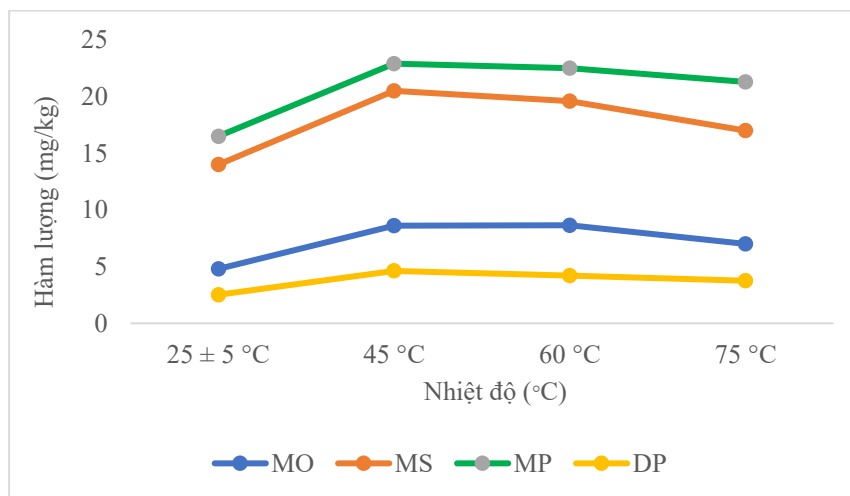


Hình 3. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Theo kết quả phân tích trên, khi sử dụng hệ dung môi chloroform:MeOH (2:1) thu được hàm lượng MO, MS, MP, DP cao nhất so với các dung môi còn lại. Điều này có thể được giải thích dựa trên đặc điểm cấu trúc và độ tan của 4 chất nghiên cứu. Khi sử dụng dung môi kém phân cực là MeOH và chloroform cho kết quả hàm lượng cao hơn so với các dung môi phân cực và không phân cực khác. Hơn nữa, việc cô quay loại dung môi chloroform:MeOH (2:1) nhanh hơn so với n-butanol (điểm sôi của chloroform, MeOH, n-butanol lần lượt là 61,15°C; 64,7°C; 117,7°C) nên tiết kiệm được thời gian phân tích. Do đó, dung môi này được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát nhiệt độ chiết mẫu

Nhiệt độ là yếu tố ảnh hưởng đến độ tan và khả năng tách của các chất phân tích ra khỏi nền mẫu. Do đó, nghiên cứu này tiến hành khảo sát các nhiệt độ chiết mẫu khác nhau gồm: nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), 45°C, 60°C, 75°C. Cố định các điều kiện khác như: lượng mẫu cân 0,5g, 60 mL dung môi chiết chloroform:MeOH (2:1), thời gian chiết 30 phút, số lần chiết 2 lần. Kết quả khảo sát thu được trong **Hình 4**.

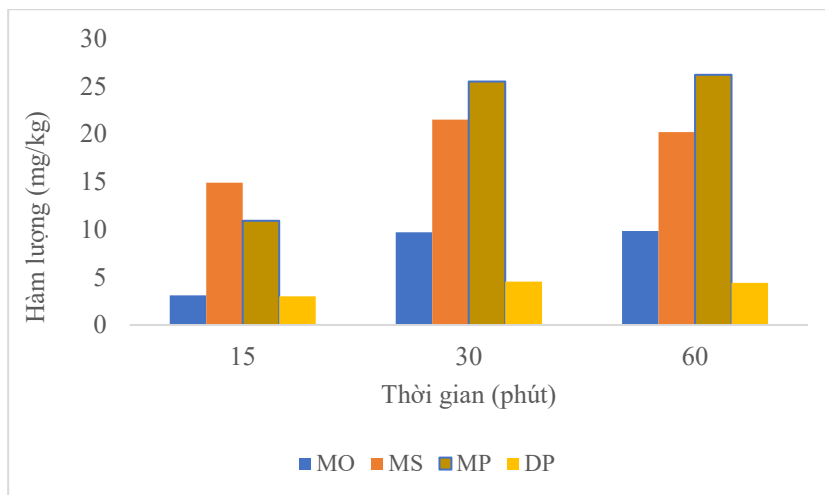


Hình 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết mẫu

Từ kết quả trong **Hình 4** cho thấy, hàm lượng chất phân tích thu được tăng lên khi tăng nhiệt độ chiết từ nhiệt độ phòng lên 45°C và thay đổi không đáng kể khi tiếp tục tăng nhiệt độ 60°C. Tuy nhiên nếu tiếp tục tăng nhiệt độ 75°C thì hàm lượng chất phân tích thu được có xu hướng giảm dần. Điều này có thể giải thích do khi tăng nhiệt độ thì khả năng hoà tan của các chất phân tích tăng lên. Do nhiệt độ sôi của chloroform và MeOH khoảng 60°C nên dung môi bay hơi và có thể cuốn theo chất phân tích dẫn đến làm giảm hàm lượng chất phân tích thu được. Vì vậy, nhiệt độ phù hợp để chiết chất phân tích ra khỏi nền mẫu là 45°C.

3.2.3. Khảo sát thời gian chiết mẫu

Thời gian chiết cũng là một yếu tố quan trọng nhằm thu được hiệu suất chiết cao nhất. Các mức thời gian chiết được lựa chọn để khảo sát là 15 phút, 30 phút, 60 phút trên nền mẫu sữa bột. Kết quả được thể hiện trong **Hình 5**.

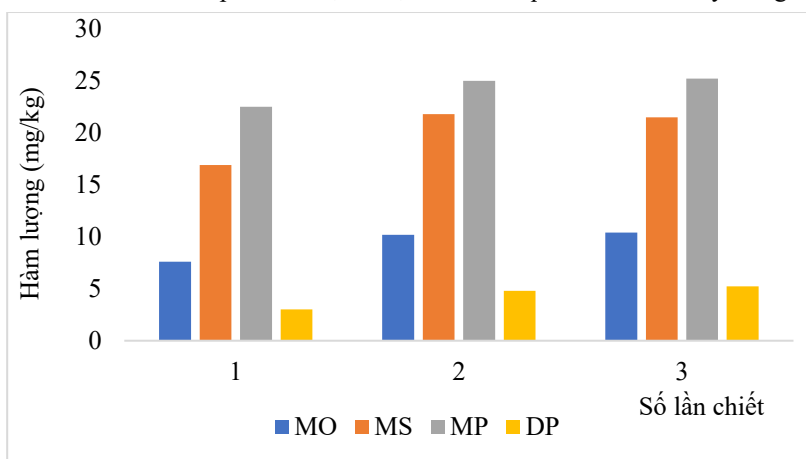


Hình 5. Kết quả khảo sát thời gian chiết

Từ hình trên cho thấy hàm lượng các chất phân tích cao nhất ở khoảng thời gian chiết 30 phút và thay đổi không đáng kể khi tăng thời gian chiết 60 phút. Do đó, để tiết kiệm thời gian và đảm bảo hiệu quả, thời gian chiết 30 phút được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.4. Khảo sát số lần chiết lặp lại

Để đảm bảo chất phân tích được chiết triệt để ra khỏi nền mẫu, quá trình chiết lặp lại là cần thiết. Nghiên cứu này tiến hành khảo sát số lần chiết lặp lại: 1 lần, 2 lần, 3 lần. Kết quả được trình bày trong **Hình 6**.



Hình 6. Kết quả khảo sát số lần chiết lặp lại

Kết quả phân tích trong **Hình 6** cho thấy: Khi tăng số lần chiết từ 1 đến 2 lần, lượng chất phân tích thu được tăng lên và thay đổi không đáng kể khi tiến hành chiết lặp lại 3 lần. Vì vậy, để tiết kiệm thời gian cũng như hoá chất mà vẫn đảm bảo kết quả chiết mẫu thì nghiên cứu lựa chọn chiết lặp lại 2 lần.

Tóm lại, điều kiện phân tích mẫu được lựa chọn bao gồm: mẫu được chiết lặp 2 lần, mỗi lần với 30 mL dung môi chloroform: MeOH = 2:1 trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 45°C, ly tâm, gộp dịch chiết vào bình cô quay 100 mL, cô quay, hoà cạn với 10 mL MeOH, lọc mẫu qua màng 0,2 µm và phân tích trên hệ thống LC-MS sử dụng cột C18 (2,1 mm x 150 mm; 3,5 µm), pha động 100% MeOH, thể tích tiêm mẫu 5 µL, detector MS - APCI+.

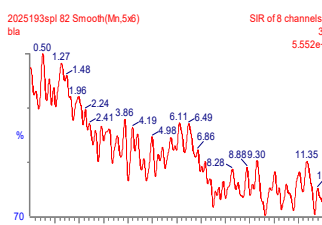
3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

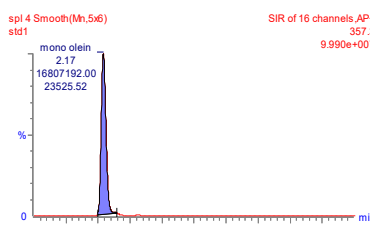
Tiến hành phân tích mẫu trắng (bột sữa bán thành phẩm), mẫu chuẩn, bột sữa bán thành phẩm thêm chuẩn. Kết quả thu được trong **Bảng 2** và **Hình 7** cho thấy độ đặc hiệu của phương pháp đáp ứng yêu cầu theo EU 2021/808 với 4 điểm nhận dạng (IP). Chênh lệch thời gian lưu của mẫu thêm chuẩn với chuẩn không quá 0,1 phút, mẫu trắng không cho tín hiệu của chất phân tích.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu của phương pháp

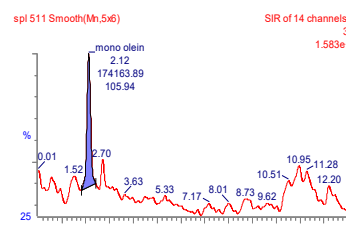
Nền mẫu	Thời gian lưu (phút)			
	MO	MS	MP	DP
Mẫu trắng (Bột sữa bán thành phẩm)	Không xuất hiện tín hiệu			
Chất chuẩn	2,17	2,54	2,17	9,59
Bột sữa bán thành phẩm thêm chuẩn	2,12	2,49	2,08	9,52
Thời gian sai lệch (phút)	0,05	0,05	0,09	0,07
Quy định	$\leq \pm 0,1$ phút			



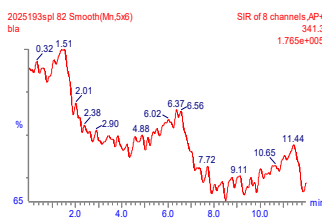
Sắc đồ mẫu trắng MO



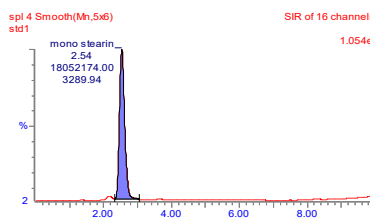
Sắc đồ chuẩn MO



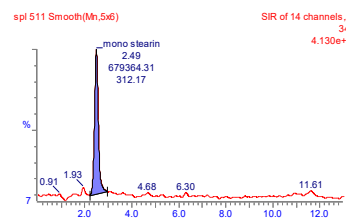
Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn MO



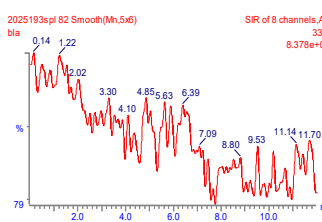
Sắc đồ mẫu trắng MS



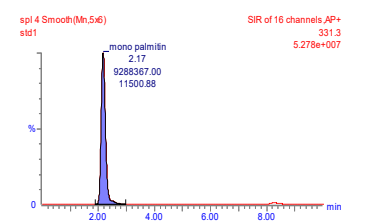
Sắc đồ chuẩn MS



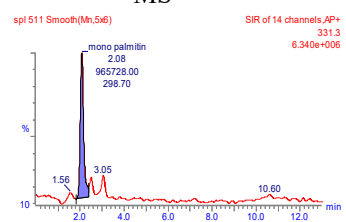
Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn MS



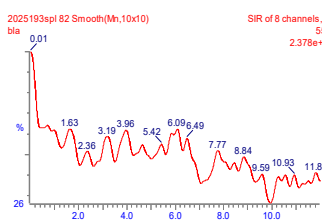
Sắc đồ mẫu trắng MP



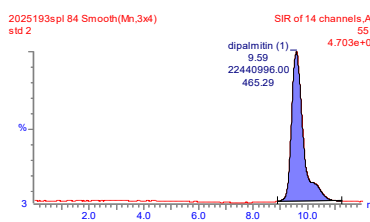
Sắc đồ chuẩn MP



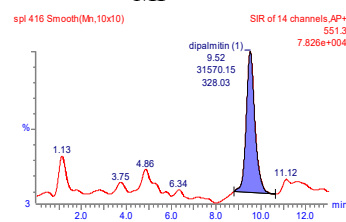
Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn MP



Sắc đồ mẫu trắng DP



Sắc đồ chuẩn DP



Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn DP

Hình 7. Sắc đồ khảo sát độ đặc hiệu của phương pháp

3.3.2. Khảo sát khoảng tuyến tính, xây dựng đường chuẩn, xác định LOD, LOQ

Khoảng tuyến tính được xây dựng trong khoảng 5-5000 µg/L. Đường chuẩn của 4 chất nhũ hoá được xây dựng trong khoảng nồng độ 10 - 2000 µg/L. Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách phân tích mẫu sữa bột có nồng độ thấp. Xác định giá trị S/N sử dụng phần mềm thiết bị. Trong đó, tín hiệu được tính là chiều cao của peak, nhiễu được tính là chiều cao của nhiễu đường nền. Nhiễu đường nền được tính về hai phía của đường nền với bề rộng mỗi bên gấp khoảng 10 lần chiều rộng của peak tại nửa chiều cao. Giới hạn phát hiện là nồng độ tại đó có tỷ lệ S/N bằng 3. Giới hạn định lượng được xác định với tỷ lệ S/N bằng 10. Kết quả được thể hiện trong **Bảng 3**.

Bảng 3. Kết quả phương trình đường chuẩn, LOD, LOQ của phương pháp

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số xác định R^2	Độ lệch bias (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
MO	$y=18430x - 9337,2$	1,0000	$-2,59 \div 7,82$	0,06	0,20
MS	$y = 16366x - 6270,4$	0,9996	$-13,9 \div 6,65$	0,06	0,20
MP	$y=8904,6x - 359,3$	0,9995	$-10,2 \div 3,71$	0,06	0,20
DP	$y = 11226x - 3367,0$	0,9999	$-2,62 \div 11,8$	0,15	0,50

Kết quả ở **Bảng 3** cho thấy, hệ số xác định đạt $R^2 \geq 0,9995$, chứng tỏ mối quan hệ tuyến tính tốt giữa tín hiệu thu được và nồng độ chất phân tích, độ lệch của các điểm xây dựng đường chuẩn $< 15\%$ đạt yêu cầu của AOAC [19]. Các giá trị LOD, LOQ đạt được của MO, MS, MP tương ứng là 0,06 mg/kg và 0,20 mg/kg, của DP tương ứng là 0,15 mg/kg và 0,50 mg/kg.

3.3.3. Độ chụm và độ đúng của phương pháp

Độ chụm của phương pháp được đánh giá qua độ lặp lại (độ lệch chuẩn tương đối $RSD_r\%$, $n = 6$) và độ đúng được đánh giá qua độ thu hồi $R\%$ bằng cách thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ khác nhau để thu được nồng độ tương ứng với điểm đầu, điểm cuối và giữa đường chuẩn. Tiến hành thực hiện trên 2 nền mẫu sữa khác nhau: sữa bột và sữa lỏng. Kết quả được trình bày trong **Bảng 4**.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ lặp lại ($RSD_r\%$) và độ thu hồi ($R\%$) của phương pháp

Chỉ tiêu/Nền mẫu	Độ lặp lại ($RSD_r\%$)		Độ thu hồi ($R\%$)	
	Sữa bột	Sữa lỏng	Sữa bột	Sữa lỏng
MO	2,94	7,21	84,5-99,0	82,5-99,5
MP	2,56	6,98	81,5-98,9	80,6-99,2
MS	5,82	5,76	81,7-100	83,6 - 99,5
DP	2,54	7,14	80,4-98,8	82,3-99,0
Yêu cầu AOAC	$\leq 7,3$	$\leq 7,3$	80 -110	80 -110

Kết quả thể hiện trong **Bảng 4** cho thấy, độ lặp lại và độ thu hồi các chất nhũ hoá MG và DG đều đạt so với yêu cầu của AOAC [19]. Phương pháp phù hợp để phân tích các chất nhũ hoá trong các sản phẩm sữa.

3.4. Áp dụng phương pháp để phân tích mẫu

Phương pháp sau khi được thẩm định đáp ứng các yêu cầu được áp dụng để phân tích 20 mẫu sữa thu thập trên thị trường Hà Nội. Kết quả phân tích được thể hiện trong **Bảng 5** và **Hình 8**.

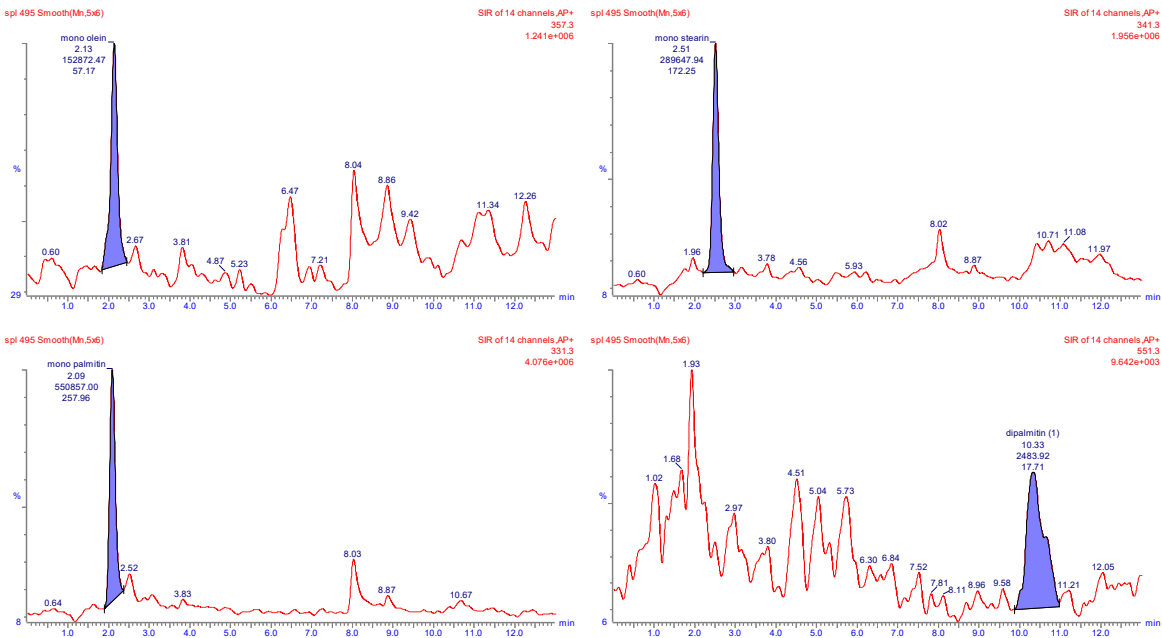
Kết quả phân tích trong **Hình 8** cho thấy: 100% các mẫu sữa thu thập được có chứa chất nhũ hoá MG và DG và có sự chênh lệch nhau về hàm lượng. Sự chênh lệch này phản ánh thực tế các nhà sản xuất có thể sử dụng nhiều nhóm chất nhũ hoá khác nhau dùng với tỉ lệ khác nhau để đạt được hiệu quả nhũ hoá mong muốn và tạo nên sự đa dạng của các sản phẩm sữa.

Bảng 5. Kết quả phân tích MG và DG trong nền mẫu sữa

Hàm lượng chất phân tích trong nền mẫu sữa (mg/kg)					
Nền mẫu	MO	MS	MP	DP	Tổng
SB1	2,45	1,01	3,06	2,52	9,03
SB2	3,65	0,89	3,46	1,53	9,53
SB3	3,46	3,48	7,58	2,03	16,6
SB4	1,50	3,85	9,51	5,38	20,2
SB5	0,99	4,03	10,4	1,99	17,5
SB6	7,69	8,46	15,1	12,92	44,2
SB7	0,82	0,66	1,24	1,79	4,51
SB8	1,74	1,69	3,07	3,35	9,86
SB9	2,50	3,76	9,85	1,32	17,4
SB10	0,12	5,77	23,1	1,04	30,0
SL1	1,06	2,35	3,56	1,45	8,42
SL2	1,42	2,30	7,98	0,90	12,6
SL3	1,91	1,29	5,36	1,19	9,75
SL4	1,65	2,82	3,42	1,01	8,90
SL5	1,25	1,88	3,52	2,94	9,59
SL6	1,39	3,87	0,68	2,18	8,12
SL7	1,12	0,99	1,54	1,02	4,67
SL8	1,15	1,72	1,08	1,10	5,05
SL9	2,11	1,05	1,45	1,85	6,46
SL10	0,90	2,24	1,47	1,67	6,28

Ghi chú: SB: Sữa bột

SL: Sữa lỏng



Hình 8. Sắc đồ phân tích MG và DG trong nền mẫu sữa bột

Tổng hàm lượng 04 chất nhũ hoá MG và DG trong khoảng từ 4,51 - 42,2 mg/kg đối với sữa bột và 4,67 - 12,6 mg/kg đối với sữa lỏng. Các kết quả này đều đáp ứng về giới hạn cho phép của chất nhũ hóa quy định tại Thông tư 24/2019/TT-BYT. Nghiên cứu đã góp phần vào việc xây dựng phương pháp phân tích để xác định hàm lượng nhóm MG và DG nói riêng, chất nhũ hoá nói chung, từ đó giúp kiểm soát tốt nhóm chất này trong thực phẩm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng phương pháp xác định đồng thời một số chất nhũ hoá MG và DG trong mẫu sữa bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ. Quy trình phân tích đã được khảo sát tối ưu. Phương pháp có độ nhạy cao và đã được thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích đồng thời hàm lượng các chất nhũ hoá trong 20 mẫu sữa bột, sữa lỏng khác nhau. Nghiên cứu sẽ tiếp tục được mở rộng để xác định đồng thời các chất nhũ hoá trong các loại mẫu thực phẩm khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, trong đề tài mã số NIFC.ĐTCS.23.05.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Abdul Rohman, Yaakob B, Che Man and Eka Noviana, "Analysis of Emulsifier in Food Using Chromatographic Techniques," *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, no 1, pp. 54-59, 2013.
- [2]. G. L. Hasenhuettl, R. W. Hartel (eds.), Food Emulsifiers and Their Applications, Second Edition, Springer Nature Switzerland AG, 2019.
- [3]. Shane N.D. Lal, Charmian J. O'Connor, Laurence Eyres, "Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology," *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126, pp.433–437, 2006.
- [4]. Circular 24/2019/TT-BYT. Circular on management and use of food additives [in Vietnamese].
- [5]. Panyod S., Wu W.-K., Chang C.-T., Wada N., et al., "Common dietary emulsifiers promote metabolic disorders and intestinal microbiota dysbiosis in mice," *Communications Biology*, vol 7, 1:749, 2024.
- [6]. Claudia Oellig, Klara Brändle, Wolfgang Schwack, "Characterization of E 471 food emulsifiers by high-performance thin-layer chromatography–fluorescence detection," *Journal of Chromatography A*, 2018.
- [7]. Bruno Marcato, "Giuliano Cecchin. Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono, di and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection," *Journal of Chromatography A*, vol 730, pp. 83-90, 1996.
- [8]. Liu, T. Lee, E. Bobik, Jr., M. Guzman-Harty and C. Hastilow, "Quantitative Determination of Monoglycerides and Diglycerides by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-Scattering Detection," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 70, no. 4, 1993.
- [9]. A. Lopez-Lopez, A.I. Castellote-Bargallo, M.C. Lopez-Sabater, "Direct determination by high-performance liquid chromatography of sn-2 monopalmitin after enzymatic lipase hydrolysis," *Journal of Chromatography B*, vol. 760, pp. 97–105, 2001.
- [10]. T. Riist, Riisom and L. Hoffmeyer OM, "High Performance Liquid Chromatography Analyses of Emulsifiers: I. Quantitative Determinations of Mono- and Diacylglycerols of Saturated Fatty Acids," *Journal of the American oil chemist's societ*, vol 55, pp 649-652, 1978.
- [11]. Bareth A., Strohmar W., Kitzelmann E., "Gas chromatographic determination of mono-and diglycerides in milk and milk products," *European Food Research and Technology*, vol 216, no4, pp.365-368, 2003.
- [12]. Chiemi Satou, Hirofumi Goto, Yuya Yamazaki, Katsuyoshi Saitou, Shoji Matsumoto, Ou Takahashi, Yosuke Miyazaki, Keiichi Ikuta and Yosuke Yajima, "Modified Gas Chromatographic Method to Determine Monoacylglycerol and Diacylglycerol Contents in Edible Fats and Oils," *Journal of Oleo Science*, vol 66, no.6, pp.601-606, 2017.
- [13]. Suman M., Silva G., Catellani D., Bersellini U., et al., "Determination of food emulsifiers in commercial additives and food products by liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical ionisation mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, no. 18, pp.3758-3766, 2009.
- [14]. Marcato B., Cecchin G., "Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di-and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 730, no.1-2, pp.83-90, 1996.

- [15]. Dinah Schick, Katharina Link, Wolfgang Schwack, Michael Granvog Claudia Oellig, "Analysis of mono-, di-, triacylglycerols, and fatty acids in food emulsifiers by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry," *European Food Research and Technology*, no.247, pp.1023–1034, 2021.
- [16]. Flor R. V., Prager M. J., "Lipid extraction procedure for some food products containing surfactants," *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 63, no. 1, pp.22-26, 1980.
- [17]. Chu B.-S., Nagy K., "Enrichment and quantification of monoacylglycerols and free fatty acids by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, vol. 932, pp.50-58, 2013.
- [18]. La Nasa J., Degano I., Brandolini L., Modugno F., et al., "A novel HPLC-ESI-Q-ToF approach for the determination of fatty acids and acylglycerols in food samples," *Analytica chimica acta*, vol. 1013, pp.98-109, 2018.
- [19]. Tran Cao Son, Le Thi Hong Hao et al., Method validation and evaluation of measurement uncertainty in chemical analysis, Science and Technology Publishing, 2021 [In Vietnamese].