Xác định hàm lượng myo-inositol tổng số trong sữa bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao detector đo xung ampe (HPAEC-PAD)

Lê Việt Ngân[1*], Đỗ Thị Hồng Thúy[2], Nguyễn Thị Ánh Hường[2], Vũ Thị Trang[1], Lê Thị Hồng Hảo[1,2]

[1]Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

[2]Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Nghiên cứu được tiến hành để tối ưu hóa phương pháp sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao detector xung ampe (HPAEC-PAD) nhằm xác định hàm lượng myo-inositol trong nền mẫu sữa. Mẫu được thủy phân bằng HCl ở nhiệt độ 120°C trong 6 giờ và được trung hòa đến pH 6,0 ÷ 7,5. Myo-inositol được xác định bằng HPAEC-PAD với các điều kiện: Cột Dionex CarboPacTM MA1 (4 × 250 mm), pha động gồm NaOH 50 mM - NaOH 1M với chương trình gradient. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đường chuẩn trong khoảng 0,01 - 20 mg/L với hệ số tuyến tính R^2 = 0,9998, độ thu hồi > 99,0 %, độ lặp lại với RSD < 1,8 %. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp lần lượt là 0,047 và 0,155 µg/g. Phương pháp đã được áp dụng để xác định hàm lượng myo-inositol trong 10 mẫu sữa cho kết quả dao động khoảng 22,5 ÷ 64,7 mg/100g.

Từ khóa: *myo-inositol, sắc ký trao đổi ion, HPEAC, PAD.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, sữa là sản phẩm có giá trị dinh dưỡng quan trọng, cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ cũng như lợi ích duy trì sức khỏe ở người lớn. Sữa là nguồn dinh dưỡng tốt cung cấp vitamin, khoáng chất và các chất dinh dưỡng khác. Tùy vào từng sản phẩm dành cho những đối tượng, lứa tuổi khác nhau thì sẽ bổ sung thêm một số chất dinh dưỡng khác với hàm lượng khác nhau. Trong đó, myo-inositol cũng thường được bổ sung trong sữa và thực phẩm.

Myo-inositol được gọi là vitamin B8 nhưng bản chất không phải là vitamin mà là một loại đường đóng vai trò quan trọng trong cơ thể như một thành phần chính của màng tế bào. Nó tác động đến hoạt động của insulin - một hormon cần thiết để kiểm soát lượng đường trong máu. Ngoài ra, myo-inositol còn ảnh hưởng đến các chất dẫn truyền trong não như serotonin và dopamin [1]. Theo những nghiên cứu gần đây [2-3] myo-inositol có lợi cho một số bệnh nhân bị rối loạn, bao gồm các vấn đề sức khỏe tâm thần, rối loạn chuyển hóa, cải thiện các triệu chứng của hội chứng buồng trứng đa nang (PCOS) [4-5]. Myo-inositol cũng cho thấy hiệu quả điều trị cho trẻ sinh non mắc hội chứng hô hấp [6]. Các dạng myo-inositol bổ sung trong thực phẩm được sử dụng rộng rãi nhất bao gồm: inositol hexaphosphate (thường được gọi là "IP6") và hợp chất myo-inositol. Việc xác định hàm lượng chính xác của myo-inositol được bổ sung vào sữa sẽ góp phần quản lý chất lượng sữa trên thị trường cũng như đảm bảo quyền lợi và sức khỏe cho người tiêu dùng.

Cho đến nay, đã có một số nghiên cứu trên thế giới về xác định hàm lượng myo-inositol trong các nền mẫu như: sữa, đậu, các loại hạt, các loại ngũ cốc,... bằng phương pháp điện di mao quản (CE) [7],

**Điện thoại: 0385805442 Email: nganbmt113@gmail.com*

phương pháp sắc ký khí (GC) [8], phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [9-10],... Tại Việt Nam đã có TCVN 11912 : 2017 về phương pháp xác định hàm lượng myo-inositol trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và thực phẩm dinh dưỡng cho người lớn bằng sắc kí lỏng và đo ampe xung. AOAC cũng đã ban hành yêu cầu hiệu năng của phương pháp chuẩn (SMPR 2011.007) xác định hàm lượng myo-inositol trong sản phẩm dinh dưỡng công thức dành cho trẻ sơ sinh và sản phẩm dinh dưỡng công thức dành cho người lớn/ trẻ em với khoảng phân tích: từ 0,5 đến 68 mg/100g; giới hạn phát hiện: 0,175 mg/100g; giới hạn định lượng: 0,5 mg/100g; độ lặp lại: $RSD_r \leq 5$ %, độ tái lặp $RSD_R \leq 8$ %; độ thu hồi từ 90 - 105 %. Nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu xây dựng được phương pháp xác định hàm lượng myo-inositol tổng số trong sữa bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion hiệu năng cao detector xung ampe (HPAEC-PAD) với sự kết hợp các ưu điểm của các phương pháp đã được công bố, quy trình xử lý mẫu đơn giản, độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Chất chuẩn: myo-inositol (độ tinh khiết ≥ 99 %) từ Sigma-Adrich, Mỹ; các hóa chất: natri hydroxide, acid hydrochloric, kali hydroxide từ Merck, Đức.

Mẫu nghiên cứu: mẫu sữa bột không chứa myo-inositol (mẫu trắng), 10 mẫu sữa bột có công bố trên nhãn sản phẩm lấy ngẫu nhiên trên địa bàn thành phố Hà Nội.

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao HPAEC (Dionex ICS-5000, Thermo Scientific, Mỹ) trang bị detector PAD; cột Dionex CarboPacTM MA1 (4 × 250 mm) và các thiết bị phụ trợ khác của phòng thí nghiệm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xử lý mẫu

Cân chính xác mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm H_2O, lắc đều và thêm dung dịch HCl, thủy phân trong tủ sấy với thời gian và nhiệt độ cần khảo sát, trung hòa lại bằng dung dịch KOH 1M, sau đó gạn dịch chiết vào bình định mức 100 mL và định mức bằng H_2O đến vạch. Dung dịch được lọc qua giấy lọc qua màng lọc 0,45 µm (pha loãng nếu cần) trước khi tiêm

2.3.2. Điều kiện phân tích HPAEC-PAD

Điều kiện phân tích myo-inositol bằng HPAEC như sau: detector PAD, tốc độ dòng: 0,4 mL/phút, thể tích tiêm: 25 µL.

Thành phần pha động: Kênh A NaOH 50 mM và kênh B NaOH 1M với chế độ gradient, ổn định ở 90 % A trong 5 phút, bắt đầu từ 50 % A giảm xuống 35 % A trong 5 phút, giảm từ 35 % A xuống 25 % A trong 5 phút, giảm từ 25 % A xuống 0% A trong 5 phút, giữ ổn định 0 % A trong 13 phút, tăng từ 0 % A đến 50 % A trong 2 phút. Tổng thời gian phân tích là 35 phút.

2.3.3. Thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu/chọn lọc: Thực hiện phân tích các mẫu: dung dịch chuẩn, mẫu trắng (mẫu thực không chứa chất phân tích), mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu thực trên hệ thống HPAEC. So sánh tín hiệu của chất phân tích giữa các mẫu.

Giới hạn phát hiện (LOD): Chọn mẫu thử có nồng độ thấp, trong khoảng 5 - 7 lần LOD ước lượng. Phân tích lặp lại 10 lần. Tính SD. LOD = 3 × SD

Giới hạn định lượng (LOQ): LOQ = 3,3 × LOD

Độ lặp lại: Tiến hành thí nghiệm lặp lại ít nhất 06 lần. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD % của hàm lượng chất phân tích.

Độ thu hồi: Tiến hành thêm chuẩn ở 03 mức độ khác nhau trên nền mẫu phân tích. Lượng chất chuẩn thêm vào mẫu phải đảm bảo sao cho nồng độ của chất cần nghiên cứu sau khi thêm chuẩn nằm trong khoảng đã khảo sát.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

Do tính đặc hiệu trong việc phân tích đường, cột Dionex CarboPacTM MA1 được lựa chọn để tách myo-inositol trong nền mẫu. Để đáp ứng áp suất làm việc của cột và giảm thời gian phân tích, tốc độ dòng được đặt cố định tại 0,4 mL/phút. Tham khảo một số tài liệu [7, 10-11], các dung môi được lựa chọn khảo sát gồm: NaOH 240 mM chế độ đẳng dòng; NaOH 50 mM - NaOH 1M với chương trình gradient 1, 2 (Bảng 1, 2).

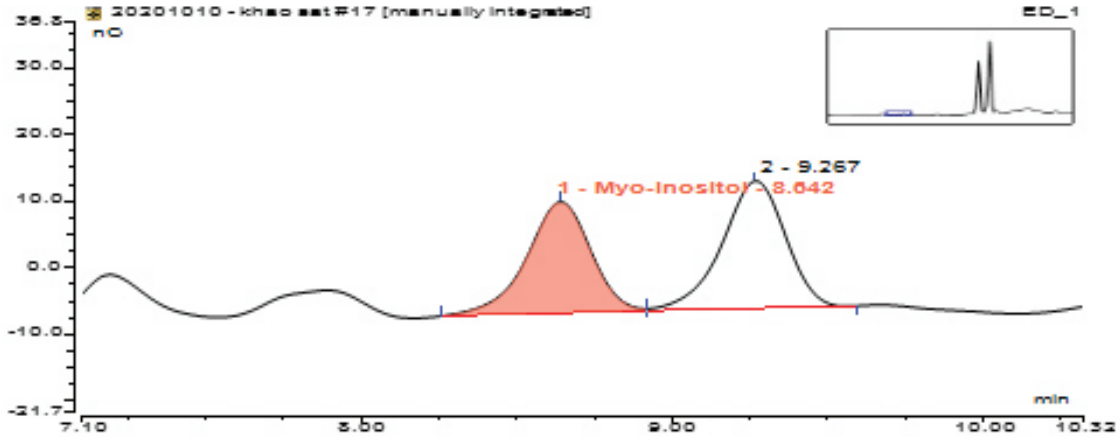
***Bảng 1**. Chương trình gradient 1*

Thời gian (phút)	*Tốc độ dòng (mL/phút)*	*NaOH 50 mM (%)*	*NaOH 1M (%)*
-5,00	0,4	90	10
0,00	0,4	100	0
10,00	0,4	100	0
10,01	0,4	0	100
20,00	0,4	0	100
20,01	0,4	100	0
30,00	0,4	100	0

***Bảng 2**. Chương trình gradient 2*

Thời gian (phút)	*Tốc độ dòng (mL/phút)*	*NaOH 50 mM (%)*	*NaOH 1M*
-5,00	0,4	90	10
-5,00	0,4	90	10
0,00	0,4	50	50
5,00	0,4	35	65
10,00	0,4	25	75
15,00	0,4	0	100
28,00	0,4	0	100
30,00	0,4	50	50

Khi sử dụng hệ pha động gồm NaOH 240 mM, chế độ đẳng dòng, myo-inositol không được tách khỏi các pic tạp trong nền mẫu. Với hệ pha động gồm NaOH 50 mM - NaOH 1M, chương trình gradient 1, tín hiệu chất phân tích cao hơn, tuy nhiên, pic không cân đối, độ phân giải còn thấp và chưa tách hoàn toàn khỏi pic nhiễu. Với hệ pha động gồm NaOH 50 mM - NaOH 1M, chương trình gradient 2, chất phân tích đã tách khỏi pic tạp trong nền mẫu, cho pic nhọn, cân đối, tín hiệu chất phân tích cao hơn, tín hiệu nhiễu đường nền rất thấp. Vì vậy, trong nghiên cứu này pha động NaOH 50mM - NaOH 1M được sử dụng với chương trình gradient 2 là điều kiện tối ưu cho quá trình tách sắc ký. Sắc ký đồ phân tích mẫu sữa chứa myo-inositol tại điều kiện tối ưu được thể hiện trong Hình 1.

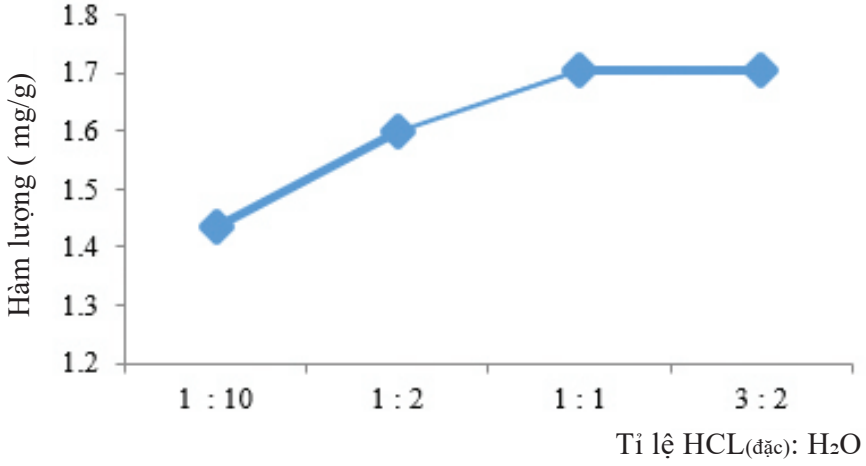


Hình 1. *Sắc ký đồ mẫu sữa chứa myo-inositol sử dụng chương trình gradient 2*

3.2. Tối ưu hóa điều kiện xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát tỉ lệ $HCl_{(đặc)}$ và H_2O

Khảo sát trên nền mẫu sữa bột có chứa myo-inositol tổng số với lượng cân khoảng 1 gam mẫu sữa bột. Sau đó, sử dụng acid để thủy phân các dạng liên kết như dạng myo-inositol hexa-phosphat thành myo-inositol tự do. Khảo sát các tỉ lệ $HCl_{(đặc)}$ và H_2O là 1:10; 1:2; 1:1; 3:2. Kết quả thể hiện ở trong Hình 2.

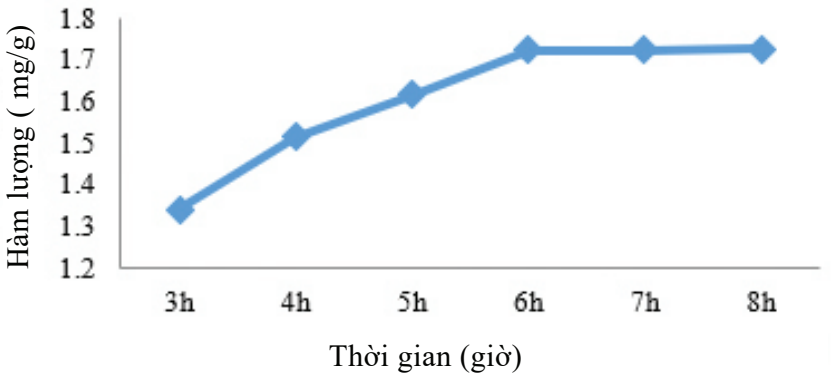


Hình 2. *Kết quả khảo sát tỉ lệ dung môi thủy phân*

Hàm lượng của myo-inositol khi sử dụng $HCl_{(đặc)}$: H_2O với tỉ lệ 1 : 1 và 3 : 2 đều cao hơn. Do đó, để giảm thiểu việc sử dụng HCl, tỉ lệ $HCl_{(đặc)}$: H_2O là 1:1 được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát thời gian thủy phân mẫu

Thời gian thủy phân mẫu ảnh hưởng đến hàm lượng ionositol thu được, nếu thời gian ngắn, quá trình thủy phân chưa hoàn toàn, kết quả chất phân tích thấp, nếu thời gian dài, sẽ gây tốn thời gian phân tích. Trên cùng một nền mẫu sữa, tiến hành thủy phân ở các mức thời gian khác nhau: 3, 4, 5, 6, 7, 8 giờ và đánh giá hàm lượng myo-inositol thu được. Kết quả khảo sát thể hiện trong Hình 3.

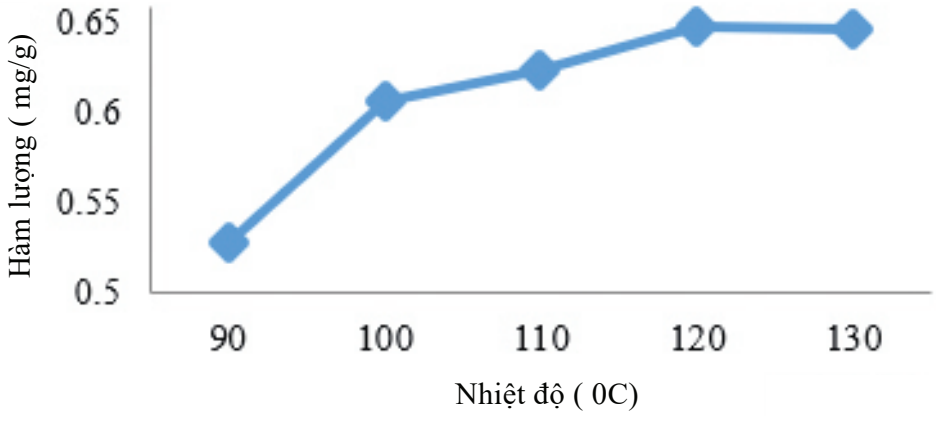


Hình 3. *Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân mẫu*

Kết quả ở Hình 3 cho thấy: hàm lượng chất phân tích ở thời gian thủy phân 6 giờ cho kết quả cao nhất và có sự thay đổi không đáng kể sau 6 giờ. Để tiết kiệm thời gian mà vẫn đảm bảo hiệu quả, thời gian thủy phân 6 giờ được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát nhiệt độ thủy phân mẫu

Nhiệt độ ảnh hưởng đến tốc độ thủy phân của các chất. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ ở các mức 90°C, 100°C, 110°C, 120°C, 130°C trong vòng 6 giờ sử dụng nền mẫu sữa. Kết quả khảo sát thể hiện trong Hình 4.

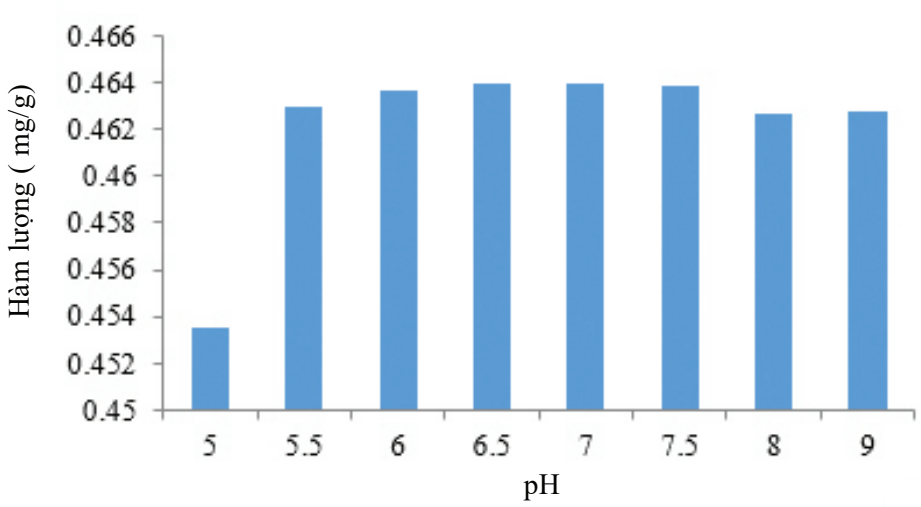


Hình 4. *Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân mẫu*

Khi tăng nhiệt độ thì hàm lượng chất phân tích tăng lên, đạt cao nhất ở 120°C và không có sự thay đổi đáng kể ở nhiệt độ cao hơn. Do đó, nhiệt độ thủy phân 120°C được lựa chọn trong nghiên cứu này.

3.2.4. Khảo sát pH dung dịch mẫu

Sau quá trình thủy phân, mẫu cần được trung hòa trước khi tiến hành phân tích trên hệ thống HPAEC-PAD. Khảo sát pH khi trung hòa ở các mức: 5,0; 6,0; 6,5; 7,0, 7,5; 8,0 và 9,0. Kết quả thể hiện trong Hình 5.



***Hình 5**. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH mẫu*

Hàm lượng myo-inositol khi chỉnh độ pH trong khoảng 6,0 - 7,5 là cao nhất và không có sự khác nhau rõ rệt nên khoảng pH này được lựa chọn làm điều kiện tối ưu.

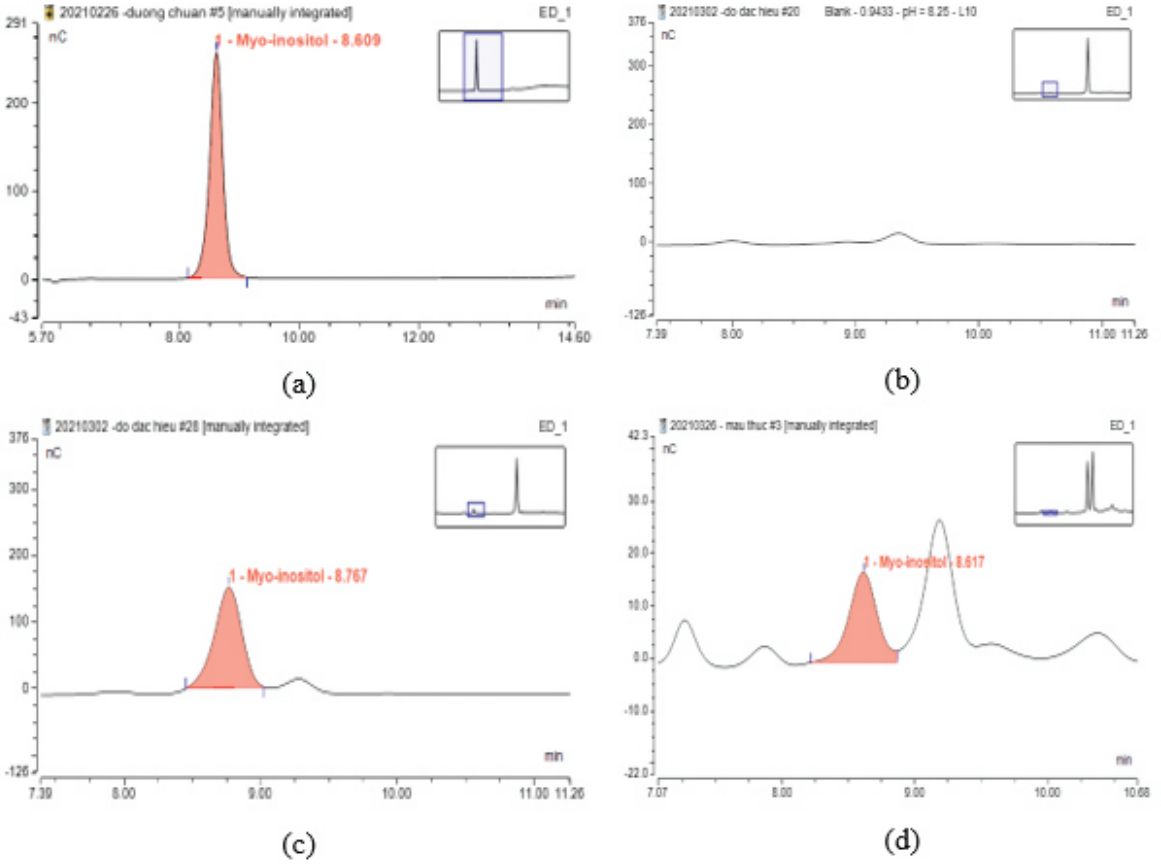
Từ các kết quả khảo sát trên, quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau: Cân chính xác khoảng 1 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm 20 mL HCl : H_2O (tỉ lệ 1 : 1), lắc đều, thủy phân trong tủ sấy ở 120°C trong 6 giờ. Trung hòa mẫu đến pH 6,0 - 7,5 sử dụng KOH 1M. Gạn dịch chiết vào bình định mức 100 mL, tráng ống lý tâm và định mức đến vạch bằng nước cất. Dung dịch được lọc qua giấy lọc, rồi qua màng lọc 0,45 µm (pha loãng nếu cần) trước khi tiêm vào hệ thống HPAEC-PAD.

Khi xử lý mẫu myo-inositol liên kết như phosphatidylinositol, TCVN 119212 : 2017 sử dụng bốn loại hóa chất: methanol, cloroform, acid metaphosphoric, NaCl và yêu cầu bước làm sạch qua cột SPE. Quy trình của nghiên cứu này sử dụng ít loại hóa chất hơn và các bước thực hiện đơn giản hơn hướng đến hóa học xanh, bảo vệ môi trường cũng như chi phí sử dụng.

3.3.Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu/chọn lọc

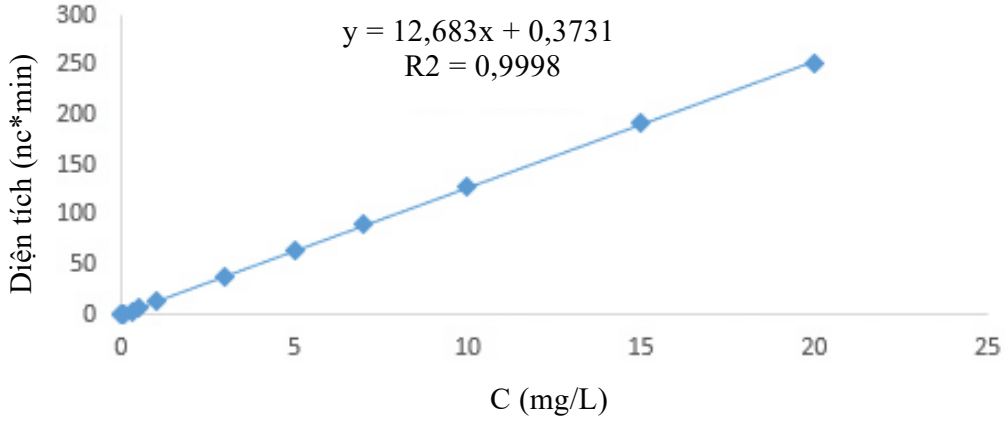
Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua việc phân tích mẫu trắng (mẫu sữa bột không chứa chất phân tích), dung dịch chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn. Kết quả chỉ ra mẫu trắng không cho tín hiệu chất phân tích, dung dịch chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn cho tín hiệu chất phân tích tại cùng thời gian lưu (Hình 6). Do đó, phương pháp có độ đặc hiệu tốt.



***Hình 6**. Sắc ký đồ mẫu chuẩn 5 mg/L (a), mẫu trắng (b), mẫu trắng thêm chuẩn 5 mg/L (c), và mẫu thực (d)*

3.3.2. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng với nồng độ thay đổi từ 0,01 - 20 mg/L và khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ. Sau đó vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic vào nồng độ. Kết quả thu được ở Hình 7.



***Hình 7.** Đường chuẩn giữa diện tích pic và nồng độ của chất chuẩn*

Kết quả cho thấy, đường chuẩn là y = 12,683x + 0,3731 có hệ số tương quan R^2 = 0,9998 và các kết quả sai khác (tính trên hệ thống phần mền Chromeleon 7 của thiết bị HPAEC) so với điểm chuẩn lý thuyết là: 0,21 - 0,70 % nằm trong giới hạn ± 15% theo yêu cầu của AOAC. Như vậy, đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính diện tích pic với nồng độ của myo-inositol khoảng 0,01 - 20 mg/L là đạt yêu cầu.

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

Phân tích lặp lại 10 lần mẫu thực có hàm lượng thấp. Đánh giá LOD đã tính được: tính $R = x_{tb}$ / LOD. Nếu 4 < R <10 thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được đáng tin cậy. Kết quả thu được giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là 0,047 mg/100g, R = 4,58 và giới hạn định lượng (LOQ) là 0,155 mg/100g. LOD, LOQ đáp ứng yêu cầu của SMPR 2011.007.

3.3.4. Độ lặp lại của phương pháp

Độ lặp lại được khảo sát trên nền mẫu sữa bột có phát hiện chất phân tích, thực hiện phân tích lặp lại 7 lần. Mẫu được cân khoảng 1 g, thể tích mẫu sau xử lý là 100 mL, hệ số pha loãng là 10 lần. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSDr %). Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

***Bảng 3**. Độ lặp lại của chất phân tích trên nền mẫu sữa*

Stt	*m (g)*	*Diện tích pic (mAu.s)*	*C (µg/mL)*	*Hàm lượng (mg/g)*	*TB (mg/g)*	*SD (mg/g)*	*RSDr (%)*
1	1,0022	6,43	0,479	0,478			
2	1,0183	6,45	0,480	0,472			
3	1,0484	6,54	0,487	0,465			
4	1,0736	6,66	0,497	0,463	0,472	0,0066	1,4
5	1,0159	6,53	0,487	0,479			
6	1,1432	7,27	0,545	0,477			
7	1,0219	6,42	0,478	0,468			

Từ kết quả thu được ở Bảng 3 và so sánh theo quy định của SMPR 2011.007 cho thấy phương pháp có độ lặp lại đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích myo-inositol trên nền mẫu sữa bột.

3.3.5. Độ thu hồi của phương pháp

Độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu sữa bột (nền mẫu sữa bột đã đánh giá độ lặp lại ở trên) với 3 mức hàm lượng thêm vào tại 50 %, 100 %, 200 % lượng chất có trong mẫu, mỗi mức thực hiện 6 lần. Kết quả phân tích thực nghiệm được thể hiện trong Bảng 4.

***Bảng 4**. Độ thu hồi của chất phân tích trên nền mẫu sữa*

Stt	*m (g)*	*Diện tích pic (mAu.s)*	*C (µg/mL)*	*Hàm lượng (mg/g)*	*Lượng chuẩn thêm (µg/mL)*	*Chuẩn thu hồi (µg/mL)*	*R (%)*
1	1,0057	10,22	0,778	0,773	0,305	0,303	99,4
2	1,0122	10,34	0,787	0,778		0,310	102
3	1,0490	10,55	0,804	0,766		0,309	101
4	1,0514	10,53	0,802	0,762		0,306	100
5	1,0533	10,49	0,799	0,759		0,302	99,0
6	1,0345	10,47	0,797	0,770		0,309	101
7	1,0499	14,31	1,100	1,05	0,610	0,605	99,0
8	1,0004	14,06	1,08	1,08		0,609	99,7
9	1,0284	14,25	1,09	1,07		0,611	100
10	1,0097	14,12	1,08	1,07		0,609	99,7
11	1,0148	14,18	1,09	1,07		0,611	100
12	1,0291	14,19	1,09	1,06		0,605	99,1
13	1,0648	22,25	1,73	1,62	1,22	1,22	100
14	1,0309	22,05	1,71	1,66		1,22	100
15	1,0393	22,00	1,70	1,64		1,22	99,6
16	1,0333	22,07	1,71	1,66		1,22	100
17	1,0510	21,99	1,70	1,62		1,21	99,1
18	1,0217	22,01	1,71	1,67		1,23	101

Kết quả khảo sát được trong Bảng 4 so sánh với mức độ yêu cầu của SMPR 2011.007 (90 - 105 %) cho thấy phương pháp có độ thu hồi đạt yêu cầu của AOAC.

3.4. Đánh giá hàm lượng myo-inositol trong một số mẫu thực tế

Áp dụng quy trình phân tích thu được ở trên để phân tích thực tế myo-inositol trong 10 mẫu sữa bột thu thập trên thị trường. Theo quy trình tối ưu và thu được kết quả trong Bảng 5.

***Bảng 5**. Kết quả hàm lượng myo-inositol trong một số mẫu sữa lưu hành trên thị trường*

Tên mẫu	*Hàm lượng phân tích (mg/100g)*	*Hàm lượng công bố (mg/100g)*	*Sai khác (%)*
Sữa 1	28,9	30,0	3,50
Sữa 2	32,7	33,0	0,85
Sữa 3	22,5	25,0	9,99
Sữa 4	27,4	30,0	8,62
Sữa 5	61,7	66,0	6,55
Sữa 6	43,5	40,0	-8,6
Sữa 7	33,0	35,0	4
Sữa 8	65,0	66,0	5,75
Sữa 9	42,1	40,0	1,57
Sữa 10	42,7	40,0	-5,2

Kết quả thu được, các mẫu có hàm lượng myo-inositol thay đổi khác nhau nằm trong khoảng (22,5 - 64,7 mg/100g). Các mẫu phân tích đều cho kết quả phù hợp với nhãn công bố.

Theo nghiên cứu [12], khi người bình thường sử dụng myo-inositol quá 12 g/ngày có thể gây ra tác dụng phụ như buồn nôn, đầy hơi, khó ngủ, nhức đầu, chóng mặt và mệt mỏi. Kết quả phân tích các mẫu sữa có hàm lượng myo-inositol dao động từ 22,5 - 64,7 mg/100g, để đảm bảo an toàn một người bình thường trong một ngày không sử dụng quá 53,3 kg sữa có hàm lượng 22,5 mg/100g và không quá 18,5 kg sữa có hàm lượng 64,7 mg/100g. Điều này gần như không thể xảy ra trong thực tế. Như vậy, hàm lượng myo-inositol phát hiện trong mẫu đều an toàn cho người sử dụng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xác định hàm lượng myo-inositol tổng số trong sữa bằng phương pháp sắc sắc ký trao đổi ion sử dụng detector đo xung ampe (HPAEC-PAD). Quy trình quy trình xử lý mẫu myo-inositol tổng số được tối ưu cho nền mẫu sữa bột, phương pháp cũng đã được thẩm định về độ đặc hiệu, đường chuẩn, độ lặp lại, độ chính xác và giới hạn phát hiện (trong đó có độ lặp lại, độ thu hồi, giới hạn phát hiện nhỏ hơn khi so sánh với TCVN 11912 : 2017 và AOAC SMPR 2011.007). Quy trình đã được áp dụng để xác định myo-inositol tổng số trong 10 mẫu sữa bột lưu hành trên thị trường cho kết quả hàm lượng myo-inositol tổng số đều có sai khác dưới 10 % so với nhãn công bố của sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. J. Levine, "Controlled trials of inositol in psychiatry," *European Neuropsychopharmacology,* vol.7 no. 2, pp. 147-155,

[2]. A. I. Barkai, D. L. Dunner, H. A. Gross, P. Mayo, and R. R. Fieve."Reduced myo-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder," *Biology Psychiatry,* vol. 13, no.1, pp. 65-72, 1978.

[3]. H. Shimon, G. Agam, R. H. Belmaker, T. M. Hyde, and J. E. Kleinman. "Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder," *American Journal of Psychiatry*, vol. 154, no. 8, pp. 1148-1150, 1997.

[4]. F. Fruzzetti, , D. P erini, M. Russo, F. Bucci, and A. Gadducci "Comparison of two insulin sensitizers, metformin and myo-inositol, in women with polycystic ovary syndrome (PCOS)," *Gynecological Endocrinology*, vol. 33, no. 1, pp. 39-42, 2016.

[5]. A. D. Genazzani, C. Lanzoni, F. Ricchieri, and V. M. Jasonni "Myo-inositol administration positively affects hyperinsulinemia and hormonal parameters in overweight patients with polycystic ovary syndrome," *Gynecological Endocrinology*, vol. 24, no. 3, pp. 139-144, 2008.

[6]. A. Howlett, A. Ohlsson, and N. Plakkal, "Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants," *The Cochrane database of systematic reviews.* (3): CD000366, 2012.

[7]. B. M. Simonet, A. Ríos, F. Grases, and M. Valcárcel "Determination of myo-inositol phosphates in food samples by flow injection-capillary zone electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 12-13, pp. 2092-2098, 2003.

[8]. J. Guo, Y. Shi, C. Xu, R. Zhong, F. Zhang, T. Zhang, and J. Wang "Quantification of plasma myo-inositol using gas chromatography–mass spectrometry," *Clinica Chimica Acta*, vol. 460 pp. 88-92, 2016.

[9]. O. P. S. Rebecca, A. N., Boyce, and C. Somasundram, "Isolation and Identification of Myo - Inositol Crystals from Dragon Fruit (Hylocereus polyrhizus)," *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4583-4594, 2012.

[10]. J.-H., Shin, J.-M.Park, H.-J., Kim, J.-H., Ahn, B.-M., Kwak, and J.-M. Kim,Rapid "Development Analytical Methods for Inositol as a Trace Component by HPLC and LC-MS/MS in Infant Formula,"*Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 35, no. 4, pp. 466-472, 2015.

[11]. D. Ellingson, T. Pritchard, P. Foy, K. King, B. Mitchell, J. Austad, D. Winters, D. Sullivan, "Analysis of Free and Total Myo-Inositol in Foods, Feeds, and Infant Formula by High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, including a Novel Total Extraction Using Microwave-Assisted Acid Hydrolysis and Enzymatic Treatment", *Journal of AOAC International*, vol. 95, no. 5, pp. 1469-1478, 2012.

[12]. G. Carlomagno and V. Unfer, "Inositol safety: clinical evidences," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 15, no. 8 pp. 931-936, 2011.

Determination of myo-inositol content in milk by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)

Le Viet Ngan[1], Do Thi Hong Thuy[2], Nguyen Thi Anh Hương[2], Vu Thi Trang[1], Le Thi Hong Hao[1,2]

[1]National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

[2]University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

Abstract

A method to determine inositol content in milk using high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was developed and validated. Samples were hydrolyzed with 10 mL HCl in a vacuum oven at 120°C, prolonging 6h. Hydrolyzed samples were neutralized to a pH from 6 to 7.5 before analysing in an HPAEC-PAD system. The analytical program used Dionex CarboPacTM MA1 column (4 × 250 mm) with a mobile phase of a gradient program including NaOH 50 mM and NaOH 1M. The method was validated following AOAC guidelines: selectivity, linear range from 0,01 to 20 mg/L with a coefficient (R) 0.9998, the recoveries in the range of 99 - 102 %, and repeatability with RSD under 1.8 %. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of inositol were 0.047 and 0.155 µg/g, respectively. The method has been applied to determine of inositol content in milk samples with content ranging from 22.5 to 64.7 mg/100g.

Keywords: *myo-inositol, high performance anion exchange chromatography, HPAEC, PAD.*