

Xác định hàm lượng 1,3-Olein-2-Palmitin (OPO) trong sữa công thức bằng sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Phùng Công Lý*, Vũ Ngọc Tú, Nguyễn Thị Hồng Ngọc

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

(Ngày đến tòa soạn: 08/11/2022; Ngày chấp nhận đăng: 16/01/2023)

Tóm tắt

1,3-olein-2-palmitin (OPO - Sn2-palmitat) là một loại triacylglycerol có trong sữa mẹ, có tác dụng giúp hấp thụ các chất dinh dưỡng trong ruột trẻ em và trẻ sơ sinh. Vì có tác dụng tốt đối với khả năng phát triển của trẻ cho nên OPO đã được các nhà sản xuất bổ sung vào sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh. Hàm lượng OPO trở thành một tiêu chí quan trọng đối với chất lượng sữa. Vì vậy, việc xây dựng một phương pháp để phân tích OPO trong các sản phẩm sữa công thức là cần thiết, góp phần đánh giá chất lượng các sản phẩm sữa công thức đang được lưu hành trên thị trường. Trong nghiên cứu này, OPO đã được nghiên cứu xác định bằng sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) sử dụng cột sắc ký Agilent Poroshell 120 EC-C18, nguồn ion hóa phun điện tử ion dương ESI (+), chế độ theo dõi ion đa phản ứng (MRM - Multiple reaction monitoring). Giá trị sử dụng của phương pháp được xác nhận theo hướng dẫn của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thức (AOAC). Kết quả cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu tốt, đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 3,0 - 300 µg/kg, giới hạn phát hiện là 1,0 µg/kg, giới hạn định lượng là 3,0 µg/kg; độ chụm và độ đúng với độ lệch chuẩn tương đối (RSD) nhỏ hơn 12% và độ thu hồi dao động từ 89,6 - 112%, đáp ứng yêu cầu theo AOAC. Phương pháp đã được sử dụng để phân tích hàm lượng OPO trong 17 sản phẩm sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh trên địa bàn Hà Nội.

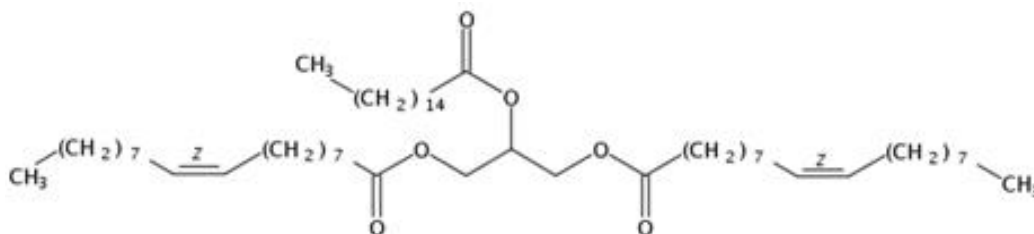
Từ khóa: *1,3-olein-2-palmitin, OPO, Sn2-palmitat, LC-MS/MS, sữa, sản phẩm công thức dành cho trẻ nhỏ.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa mẹ được coi là nguồn dinh dưỡng tối ưu cho trẻ sơ sinh và là thức ăn chính của trẻ trong 4 - 6 tháng đầu đời. Phần lipid cung cấp khoảng một nửa lượng calo cho trẻ sơ sinh và chủ yếu bao gồm triacylglycerol (TG), chiếm khoảng 98% tổng số lipid [1]. Trong chất béo của sữa mẹ, acid palmitic (C16 : 0) được este hóa ở vị trí giữa (vị trí sn-2) trên khung glycerol và acid oleic (C18:1n9) chủ yếu ở 2 vị trí bên ngoài, tạo ra một loại triacylglycerol là 1,3-olein-2-palmitin (OPO - Sn2-palmitat - Hình 1), có tác dụng giúp hấp

*Điện thoại: 0394347442 Email: phungcongly1997@gmail.com

thụ các chất dinh dưỡng trong ruột trẻ em và trẻ sơ sinh. Điều này được giải thích là do trong quá trình tiêu hóa, lipase ưu tiên giải phóng các acid béo ở vị trí sn-1 và sn-3 của TG để tạo ra các acid béo tự do và 2-monoacylglycerol. Acid palmitic được este hóa ở vị trí sn-2 của monoacylglycerol để hấp thu trong khi acid palmitic tự do có xu hướng tạo xà phòng với canxi và chuyển hóa thành hợp chất không tan [2-3].



Hình 1. Công thức cấu tạo của 1,3-olein-2-palmitin (OPO)

Trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh, chất béo thường được sử dụng là hỗn hợp dầu và mỡ thực vật, được pha trộn để bắt chước thành phần chất béo của sữa mẹ. Tuy nhiên, trong tự nhiên thực vật hầu như luôn loại trừ C16:0 khỏi vị trí sn-2 trên TG của chúng và do đó chất béo thực vật không thể bắt chước tỷ lệ C16:0 trong TG được tìm thấy ở sữa mẹ [1]. Tuy nhiên, các nhà sản xuất và người tiêu dùng thường chỉ quan tâm đến hàm lượng acid béo trong sản phẩm mà rất khó phân biệt được các acid béo đó liên kết ở vị trí nào trên TG. Vì vậy, việc phát triển phương pháp phân tích OPO trong các sản phẩm sữa công thức giúp phát hiện chính xác sự có mặt của OPO, từ đó góp phần đánh giá chất lượng sữa.

Trên thế giới đã có nhiều phương pháp xác định hàm lượng OPO trong chất béo, trong thịt lợn, thịt bò và sữa, bằng nhiều kỹ thuật như sắc ký khí ion hóa ngọn lửa GC-FID [4-5], quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ [6], sắc ký lỏng và sắc ký lỏng khối phổ [7-9]. Tuy nhiên, phương pháp GC-FID có quá trình xử lý mẫu phức tạp, tốn nhiều thời gian. Mặt khác, phương pháp NMR có vùng phổ carbonyl chỉ thích hợp để phân biệt chất béo bão hòa với các chất béo không bão hòa, ngoài ra đối với những TG có cùng số carbon trong phân tử thì có thể gây khó khăn trong việc nhận biết các chất. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần có nhiều ưu điểm vượt trội như độ nhạy tốt, độ đặc hiệu cao, thời gian phân tích nhanh, quá trình xử lý mẫu đơn giản, đã được nhiều tác giả nghiên cứu để xác định OPO trong các nền mẫu. Do đó, trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng khối phổ đã được lựa chọn để nghiên cứu xác định hàm lượng OPO trong các sản phẩm sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh đang được lưu hành trên thị trường Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 1,3-olein-2-palmitin (OPO). Các mẫu sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh được mua ngẫu nhiên tại các chợ, cửa hàng, siêu thị ở Hà Nội.

2.2. Hóa chất

Chất chuẩn 1,3-olein-2-palmitin, độ tinh khiết 99% (Sigma-aldrich). Các dung môi, hóa chất của hãng Merck gồm: methanol, isopropanol, amoni format, natri format, acetone, dung dịch amoniac 25%, n-hexan, diethyl ether, petroleum ether và nước deion.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực AB Sciex Triple Quad 6500, cột sắc ký Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 × 2,1 mm x 2,7 μm). Một số thiết bị phụ trợ khác bao gồm cân phân tích (có độ chính xác 0,1 mg) XS105 (Mettler Toledo); máy ly tâm lạnh Mikro 200R (Hettich); máy lắc ngang HS260 (IKA); máy cô quay chân không (Eyela - Nhật Bản) và các thiết bị, dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Điều kiện phân tích OPO bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

Qua tham khảo tài liệu [9], điều kiện phân tích OPO được lựa chọn như sau: sử dụng nguồn ion hóa phun điện tử ESI (+), chế độ quét lựa chọn đa phản ứng (MRM), 1 ion mẹ và 2 ion con (1 ion con được sử dụng để định lượng và 1 ion con được sử dụng để định tính), cột phân tích Agilent Poroshell 120 EC-C18, pha động đẳng dòng gồm n-hexan, isopropanol và amoni format 0,01M pha trong methanol theo tỉ lệ thể tích 15 : 15 : 70, thời gian cho mỗi lần phân tích là 10 phút với tốc độ dòng 0,4 mL/phút, nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng.

2.4.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [9], quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau: Cân chính xác khoảng 0,1g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 15 mL, thêm 2 mL nước deion ở 40°C. Rung siêu âm ở 40°C trong 10 phút. Hút 100 μL dung dịch mẫu vào ống ly tâm 15 mL khác có chứa 2,9 mL nước deion ở 40°C. Để kết tủa protein và tách carbohydrate, thêm 500 μL dung dịch amoniac 25% và 2 mL ethanol tuyệt đối, lắc vortex 2 phút. Ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 2 phút rồi chuyển phần dịch sang một ống ly tâm 50 mL. Để chiết xuất lipid, thêm 10 mL hỗn hợp diethyl ether: petroleum ether (1 : 1, v/v), lắc vortex 2 phút. Chuyển pha hữu cơ phía trên sang một ống ly tâm 50 mL, phần dịch còn lại được chiết một lần nữa với 10 mL hỗn hợp diethyl ether : petroleum ether (1 : 1, v/v). Gộp 2 phần dung môi hữu cơ phía trên rồi thổi khô bằng khí nitơ. Hòa tan phần cặn bằng 1 mL dung dịch acetone: methanol (4 : 1, v/v), lọc qua màng 0,22 μm rồi chuyển vào lọ đựng mẫu

và phân tích trên LC-MS/MS. Sử dụng mẫu sữa công thức đã được xác định là có hàm lượng OPO để thực hiện các khảo sát, cụ thể như sau:

- + Khảo sát dung môi chiết OPO ra khỏi nền mẫu: nước deion và MeOH : H₂O (1 : 1, v/v);
- + Khảo sát nhiệt độ chiết: 30, 37, 40 và 45°C;
- + Khảo sát dung môi chiết xuất lipid (sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng, mục đích là làm giàu và làm sạch): diethyl ether; petroleum ether; diethyl ether: petroleum ether (1 : 1, v/v);
- + Khảo sát số lần chiết lipid: một, hai và ba lần;
- + Khảo sát dung môi hòa cần: aceton; methanol; aceton: methanol (4 : 1, v/v),

2.4.3. Thẩm định phương pháp

Các thông số được thẩm định để đánh giá phương pháp bao gồm: độ đặc hiệu (số điểm IP, tỉ lệ ion, phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn), giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng (dựa vào tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu S/N), đường chuẩn (xây dựng đường chuẩn từ 3,0 - 300 µg/kg), độ lặp lại và độ thu hồi (thực hiện phân tích lặp lại 6 lần ở 3 mức nồng độ 3,0; 100; 200 µg/kg). Các kết quả được đánh giá, so sánh với các quy định theo AOAC 2016 [10].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Điều kiện tối ưu phân tích OPO bằng LC-MS/MS

Trên cơ sở các điều kiện phân tích đã lựa chọn ở mục 2.4.1, để khảo sát điều kiện MS/MS, dung dịch chuẩn OPO 100 ng/mL đã được bơm vào khối phổ và tối ưu hóa tự động để lựa chọn ion mẹ, ion con và năng lượng va chạm. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 1 (số điểm IP được tính theo tiêu chuẩn của EC 2021/808 [11]).

Bảng 1. Điều kiện MS/MS sử dụng trong phân tích OPO

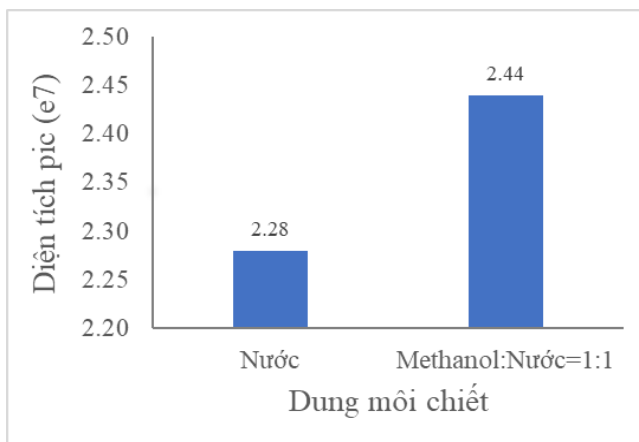
Tên chất	Ion mẹ	Ion con	CE (eV)	Số điểm IP
OPO	876,8	577,5	41	5
		603,6	35	

Dựa vào kết quả khảo sát, mảnh 577,5 được lựa chọn là ion định lượng, mảnh 603,6 là ion định tính, số điểm IP = 5 đạt để phân tích trên khối phổ (theo AOAC [10]). Như vậy, điều kiện LC-MS/MS đã đạt được độ đặc hiệu cần thiết để có thể sử dụng khảo sát quy trình xử lý mẫu và phân tích OPO.

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết OPO ra khỏi nền mẫu

Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, việc khảo sát được thực hiện với hai dung môi chiết là nước deion và MeOH : H₂O (1 : 1, v/v). Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 2.

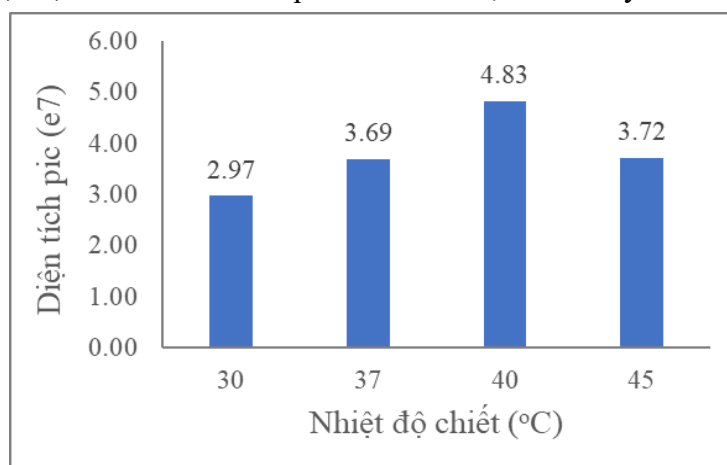


Hình 2. Kết quả khảo sát dung môi chiết OPO ra khỏi nền mẫu

Kết quả ở Hình 2 cho thấy, dung môi chiết OPO là MeOH : H₂O (1 : 1, v/v) cho tín hiệu cao hơn so với sử dụng nước deion. Điều này có thể được giải thích là do OPO là chất béo trung tính, chứa nhóm chức carbonyl có khả năng tạo liên kết hydro với nước và methanol nên nước và methanol có khả năng hòa tan, lôi kéo OPO ra khỏi nền mẫu. Ngoài ra, methanol có khả năng tạo liên kết hydro mạnh hơn so với nước nên khi kết hợp methanol với nước làm tăng hiệu suất tách OPO ra khỏi nền mẫu. Do đó, MeOH : H₂O (1 : 1, v/v) được chọn làm dung môi chiết OPO từ các nền mẫu.

3.2.2. Khảo sát nhiệt độ chiết

Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, nhiệt độ chiết được khảo sát với các giá trị lần lượt là 30; 37; 40 và 45°C. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 3.

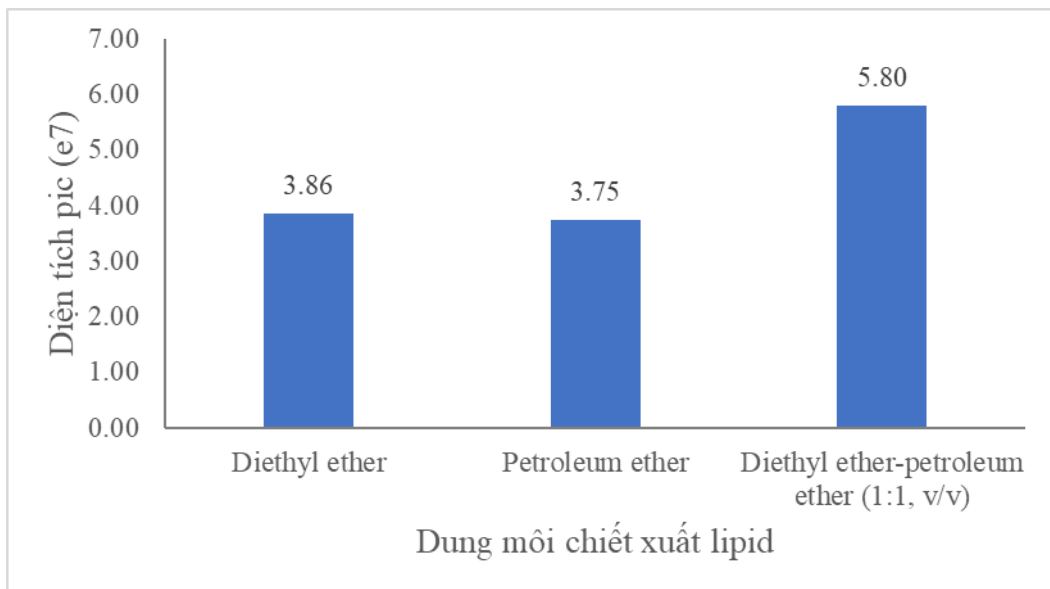


Hình 3. Kết quả khảo sát nhiệt độ chiết OPO ra khỏi nền mẫu

Kết quả ở Hình 3 cho thấy, nhiệt độ chiết mẫu là 40°C cho tín hiệu cao nhất. Khi tăng nhiệt độ sẽ làm tăng khả năng khuếch tán của chất tan vào dung môi chiết, tuy nhiên nếu tăng nhiệt độ lên quá cao sẽ làm bay hơi dung môi và có thể gây ra quá trình oxy hóa OPO dẫn đến hiệu suất chiết giảm. Từ đó, nhiệt độ chiết 40°C được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.3. Khảo sát dung môi chiết xuất lipid

Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, dung môi chiết được khảo sát lần lượt là diethyl ether; petroleum ether; diethyl ether:petroleum ether (1 : 1, v/v). Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 4.

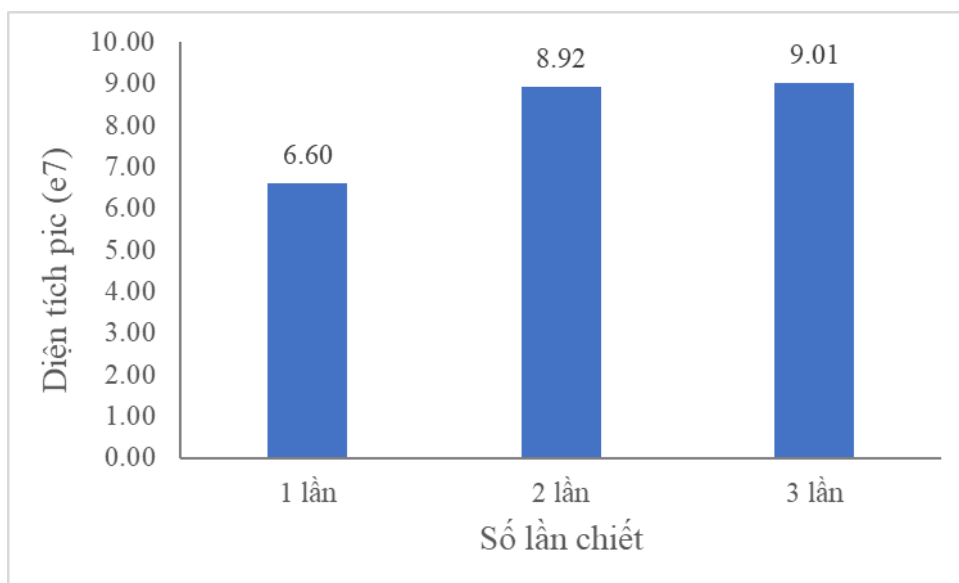


Hình 4. Kết quả khảo sát dung môi chiết xuất lipid

Dung môi diethyl ether tương tác tốt với các acid béo không no, trong khi đó petroleum ether tương tác tốt với các acid béo no. Do đó, khi sử dụng hỗn hợp dung môi chiết xuất lipid là diethyl ether: petroleum ether (1 : 1, v/v) sẽ liên kết với OPO (phân tử có đồng thời cả gốc acid béo no và không no) tốt hơn so với chỉ sử dụng một trong hai loại ether này. Do đó, diethyl ether : petroleum ether (1 : 1, v/v) được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.4. Khảo sát số lần chiết lipid

Nhằm mục đích chiết xuất được lượng OPO lớn nhất từ dung dịch mẫu, việc chiết lặp lại giúp đảm bảo OPO được chuyển tối đa sang pha hữu cơ. Khảo sát số lần chiết xuất lipid bằng hỗn hợp ether lần lượt là một lần, hai lần, ba lần, mỗi lần 10 mL và không thay đổi các yếu tố khác. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 5.

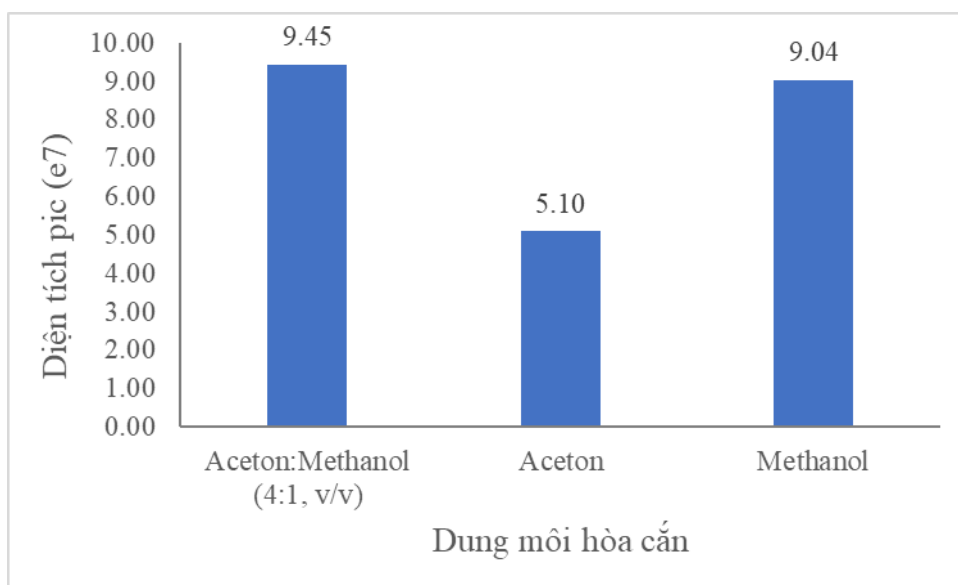


Hình 5. Kết quả khảo sát số lần chiết lipid

Từ kết quả ở Hình 5 cho thấy, chiết xuất lipid 2 và 3 lần bằng hỗn hợp diethyl ether: petroleum ether (1 : 1, v/v), mỗi lần 10 mL cho tín hiệu cao hơn so với chỉ chiết 1 lần 10 mL. Điều này là do khi chiết một lần chưa tách hết được OPO ra khỏi dịch chiết mẫu. Tuy nhiên, chiết 2 lần và 3 lần cho tín hiệu tương đương nhau nên 2 lần chiết được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.5. Khảo sát dung môi hòa cần

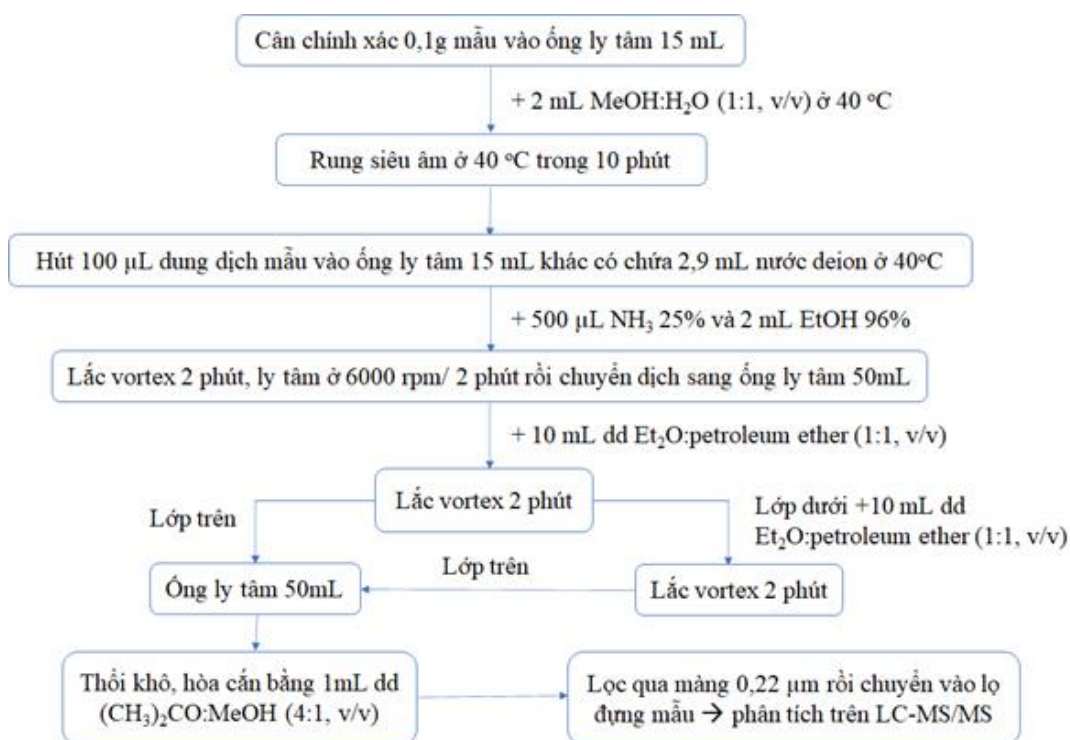
Trên cơ sở quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.4.2, dung môi hòa cần được khảo sát lần lượt là acetone; methanol; acetone: methanol (4 : 1, v/v). Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 6.



Hình 6. Kết quả khảo sát dung môi hòa cần

Kết quả ở Hình 6 cho thấy, sử dụng dung môi hòa cồn là aceton: methanol (4 : 1, v/v) cho tín hiệu cao nhất, do đó aceton: methanol (4 : 1, v/v) được lựa chọn làm điều kiện tối ưu trong nghiên cứu này.

Từ các kết quả khảo sát, quy trình xử lý mẫu tối ưu được lựa chọn như sau (Hình 7): Cân chính xác khoảng 0,1g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 15 mL, thêm 2 mL dung dịch MeOH : H₂O (1 : 1, v/v) ở 40°C. Rung siêu âm ở 40°C trong 10 phút. Hút 100 µL dung dịch mẫu vào ống ly tâm 15 mL khác có chứa 2,9 mL nước deion ở 40°C. Để kết tủa protein và tách carbohydrate, thêm 500 µL dung dịch amoniac 25% và 2 mL ethanol tuyệt đối, lắc vortex 2 phút. Ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 2 phút rồi chuyển phần dịch sang một ống ly tâm 50 mL. Để chiết xuất lipid, thêm 10 mL hỗn hợp diethyl ether: petroleum ether (1 : 1, v/v), lắc vortex 2 phút. Chuyển pha hữu cơ phía trên sang một ống ly tâm 50 mL, phần dịch còn lại được chiết một lần nữa với 10 mL hỗn hợp diethyl ether: petroleum ether (1 : 1, v/v). Gộp 2 phần dung môi hữu cơ phía trên rồi thổi khô bằng khí nitơ. Hòa tan phần cồn bằng 1 mL dung dịch aceton: methanol (4 : 1, v/v), lọc qua màng 0,22 µm rồi chuyển vào lọ đựng mẫu và phân tích trên LC-MS/MS.



Hình 7. Quy trình xử lý mẫu OPO tối ưu

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp qua các tiêu chí:

Xác định hàm lượng 1,3-Olein-2-Palmitin (OPO) trong sữa công thức...

+ *Tính số điểm IP*: OPO có 1 ion mẹ và 2 ion con, số điểm IP = 5 (theo mục 3.1), thỏa mãn yêu cầu phân tích trên khối phổ (EC 2021/808 [11]).

+ *Tỷ lệ ion*: Đối với phương pháp phân tích trên khối phổ, tỷ lệ ion là tiêu chí để khẳng định sự có mặt của chất phân tích: tiến hành phân tích trên nền mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn, so sánh tỷ lệ cường độ ion định tính với ion định lượng thu được. Các kết quả được trình bày ở Bảng 2.

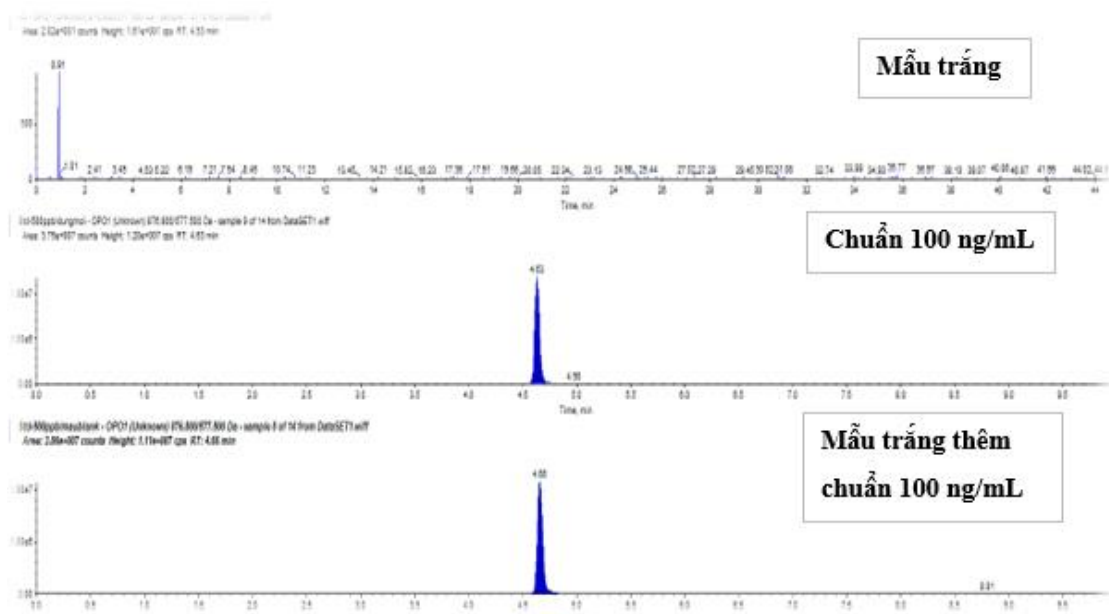
Bảng 2. Tỷ lệ ion của OPO

Chất phân tích	Tỷ lệ cường độ ion mẫu chuẩn	% sai lệch cho phép	Khoảng sai số tối đa cho phép	Tỷ lệ cường độ ion trên mẫu thêm chuẩn
OPO	80,0%	± 10%	72,0 - 88,0%	79,1%

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, tỷ lệ cường độ ion trên mẫu thêm chuẩn là 79,1%, nằm trong khoảng sai số tối đa cho phép (72,0 - 88,0%), do đó, phương pháp đáp ứng tiêu chí về tỉ lệ ion trong mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn (theo tiêu chuẩn của EC 2021/808 [11]).

+ Phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn:

Kết quả sắc đồ đánh giá độ đặc hiệu ở Hình 8 cho thấy, mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu của chất phân tích, mẫu thêm chuẩn và mẫu chuẩn có tín hiệu tại cùng thời gian lưu (4,63 phút) chênh lệch không quá 2%. Như vậy, phương pháp đáp ứng yêu cầu về thông số thẩm định tính đặc hiệu để phân tích OPO (theo AOAC [10]).

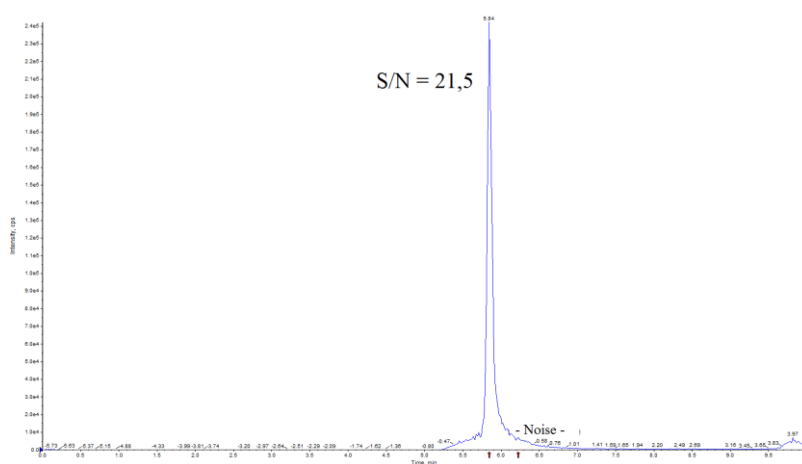


Hình 8. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu

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

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn ở các mức nồng độ thấp dần và còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích, lặp lại 6 lần. Tiến hành xác định tỷ lệ S/N dựa trên phần mềm của thiết bị. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có $S/N = 3$. Giới hạn định lượng là giới hạn mà tại đó $S/N = 10$.

Kết quả khảo sát cho thấy, $S/N = 21,5$ đối với OPO nồng độ thêm chuẩn $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Hình 9). Do đó, giá trị $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ được lựa chọn là giới hạn phát hiện, $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ là giới hạn định lượng của phương pháp đối với nền mẫu sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh.



Hình 9. Sắc đồ mẫu thêm chuẩn OPO tại $3 \mu\text{g}/\text{kg}$

3.3.3. Đường chuẩn

Trên cơ sở điều kiện tối ưu lựa chọn, đường chuẩn xác định OPO bằng phương pháp LC-MS/MS đã được xây dựng ở các mức nồng độ 3; 10; 30; 50; 100; 200; 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên sự phụ thuộc giữa diện tích pic với nồng độ tương ứng và sử dụng phần mềm Excel. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, tín hiệu của OPO có sự tương quan tuyến tính với nồng độ, hệ số tương quan tuyến tính $R^2 > 0,995$ và có độ chệch $< 15\%$ với tất cả các giá trị.

3.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu sữa công thức đã được xác định không chứa OPO, tiến hành phân tích theo quy trình đã xây dựng. Các mẫu được thêm chuẩn ở các mức nồng độ 3, 100, và 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Các kết quả phân tích cho thấy, giá trị độ thu hồi của OPO nằm trong khoảng từ 89,6 - 112%, độ lệch chuẩn tương đối trong khoảng từ 4,31 - 5,26%. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [10] (độ thu hồi trong khoảng 60 - 115% và độ lệch chuẩn tương đối $\leq 21\%$ tại nồng độ 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

3.3.5. Ứng dụng phân tích OPO trong sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh

Phương pháp đã được ứng dụng để xác định hàm lượng OPO trong 17 mẫu sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích hàm lượng OPO trong 17 mẫu sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh

<i>STT</i>	<i>Mẫu</i>	<i>Số lượng mẫu</i>	<i>Hàm lượng (mg/100g)</i>
1	Mẫu sữa công thức dành cho trẻ 0 - 6 tháng tuổi	6	340 - 6.470
2	Mẫu sữa công thức dành cho trẻ 0 - 12 tháng tuổi	6	250 - 8.060
3	Mẫu sữa công thức dành cho trẻ 1 - 2 tuổi	3	270 - 4.160
4	Mẫu sữa công thức dành cho trẻ 1 - 3 tuổi	1	6.620
5	Mẫu sữa công thức dành cho trẻ hơn 2 tuổi	1	19.300

Từ kết quả thu được ở Bảng 3, trong 17 mẫu sữa công thức đã phân tích, hàm lượng OPO thấp nhất là 250 mg/100g (mẫu sữa công thức dành cho trẻ 0 - 12 tháng tuổi), mẫu có hàm lượng OPO cao nhất lên đến 19.300 mg/100g (mẫu sữa công thức dành cho trẻ hơn 2 tuổi). Theo nghiên cứu của F. Giuffrida và các cộng sự [9], nồng độ OPO trong các mẫu sữa mẹ ở 30, 60 và 120 ngày sau khi sinh nằm trong khoảng 333 - 383 mg/100 mL. Như vậy, trong 17 mẫu sữa công thức đã phân tích có 2 mẫu không đạt được hàm lượng OPO giống như trong sữa mẹ (1 mẫu sữa công thức dành cho trẻ 0 - 12 tháng tuổi có hàm lượng OPO là 250 mg/100g và 1 mẫu sữa công thức dành cho trẻ 1 - 2 tuổi có hàm lượng OPO là 270 mg/100g).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS để xác định hàm lượng OPO trong sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh. Các điều kiện phân tích gồm: pha động đẳng dòng gồm n-hexan, isopropanol và amoni format 0,01 M pha trong methanol theo tỷ lệ thể tích 15 : 15 : 70, cột sắc ký Agilent Poroshell 120 EC-C18, kết hợp xử lý mẫu bằng hỗn hợp dung môi hữu cơ... Phương pháp đã được thẩm định và kết quả đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [10] (LOQ là 3 µg/kg; giá trị độ thu hồi trong khoảng 89,6 - 112%, độ lệch chuẩn tương đối từ 4,31 - 5,26%). Trong 17 mẫu sữa công thức dành cho trẻ em và trẻ sơ sinh đã phân tích, tất cả các sản phẩm đều có chứa OPO, mẫu có hàm lượng cao nhất lên

đến 19,3 g/100 g (mẫu sữa công thức dành cho trẻ hơn 2 tuổi). Nghiên cứu sẽ tiếp tục được mở rộng để phân tích hàm lượng OPO trong các sản phẩm sữa khác trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. M. Dominguez, N. Oturan, A. Romero, A. Santos, and M. A. Oturan, "Removal of lindane wastes by advanced electrochemical oxidation," *Chemosphere*, vol. 202, pp. 400-409, 2018.
- [2]. S. M. Innis, "Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition," *Advances in Nutrition*, vol. 2, no. 3, pp. 275-283, 2011.
- [3]. L. Beghin, X. Marchandise, E. Liend, M. Bricoute, J-P. Bernete, J.-F. Lienhardte, F. Jeannerote, V. Menete, J.-C. Requillarte, J. Marx, "Growth, stool consistency and bone mineral content in healthy term infants fed sn-2-palmitateenriched starter infant formula: a randomized, double-blind, multicentre clinical trial," *Clinical Nutrition*, vol. 38, no. 3, pp. 1023-1030, 2018.
- [4]. F. Bar-Yoseph, Y. Lifshitz, T. Cohen, P. Malard, and C. Xu, "SN2-Palmitate Reduces Fatty Acid Excretion in Chinese Formula-fed Infants," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 62, no. 2, pp. 341-347, 2016.
- [5]. P. T. Quinlan, S. Lockton, J. Irwin, and A. L. Luca, "The relationship between stool hardness and stool composition in breast- and formula-fed infants," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 20, no. 1, pp. 81-90, 1995.
- [6]. G. Kildahl-Andersen, E. Gjerlaug-Enger, F. Rise, A. Haug, and B. Egelanddal, "Quantification of fatty acids and their regioisomeric distribution in triacylglycerols from porcine and bovine sources using ¹³C NMR spectroscopy," *Lipids*, vol. 56, no. 1, pp. 111-122, 2020.
- [7]. Z. Liu and S. Rochfort, "Bovine milk triacylglycerol regioisomer ratio shows remarkable inter-breed and inter-cow variation," *Molecules*, vol. 26, no. 13, pp. 3938, 2021.
- [8]. T. Yuan, C. Qi, X. Dai, Y. Xia, C. Sun, J. Sun, X. Wang, "Triacylglycerol Composition of Breast Milk during Different Lactation Stages," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, no. 8, pp. 2272-2278, 2019.
- [9]. F. Giuffrida, C. Marmet, I. Tavazzi, P. Fontannaz, J. Sauser, L. Lee, and F. Destailats, "Quantification of 1,3-olein-2-palmitin (OPO) and palmitic acid in sn-2 position of triacylglycerols in human milk by liquid chromatography coupled with mass spectrometry," *Molecules*, vol. 24, no.1, pp. 22, 2018.
- [10]. AOAC Official Methods of Analysis: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 2016.

[11]. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC.

Determination of 1,3-olein-2-palmitin (OPO) content in infant formula by liquid chromatography coupled mass spectrometry LC-MS/MS

Phung Cong Ly, Vu Ngoc Tu, Nguyen Thi Hong Ngoc

National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

Abstract

1,3-olein-2-palmitin (OPO - Sn2-palmitate) is a triacylglycerol found in breast milk that helps absorb nutrients in the infant's intestine. Because of its beneficial effect on the infant's health improvement, OPO has been added by manufacturers to infant and infant formula. OPO content becomes an important criterion for milk quality. Therefore, it is necessary to develop a method to analyze OPO in formula milk products, contributing to assessing the quality of formula products being circulated in the market. In this study, OPO was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) using an Agilent Poroshell 120 EC-C18 chromatographic column, with an ESI (+) positive electron spray ionization source and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The validity of the method was confirmed according to the guidelines of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). The results showed that the method has good specificity, the linearity range from 3.0 to 300 µg/kg, the detection limit of 1.0 µg/kg, the quantification limit of 3.0 µg/kg; precision and accuracy with relative standard deviation (RSD) less than 12% and recoveries ranging from 89.6 to 112%, meeting AOAC requirements. The method was used to analyze the OPO content in 17 infant formula products in Hanoi.

Keywords: *1,3-olein-2-palmitin, OPO, Sn2-palmitate, LC-MS/MS, milk, infant formula.*