

4.6 mm; 5  $\mu$ m), mixture of acetonitrile and 10 mM phosphate buffer with pH adjusted to 2.5 containing 30 mM TEA (25:75, v/v) as eluent in isocratic mode, flow rate of 1.2 ml/min., and detection wavelength of 278 nm. The method enables a reliable statement concerning quantitative determination of desloratadine in commercially available pharmaceutical

preparations and, especially in the study on desloratadine stability.

#### Tài liệu tham khảo

1. D. d. Rao, et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (2010), 736-742.
2. Razid, et al., *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* (2006)5, 1- 4.
3. Bộ Y Tế, *Dược Điển Việt Nam IV* (2010), PL-122.

# Định lượng đồng thời một số acid béo omega-3, omega-6 trong dầu thực vật bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ (GC-MS)

Nguyễn Thành Thông<sup>1</sup>, Phạm Thị Thanh Hà<sup>1</sup>, Trần Cao Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trường đại học Dược Hà Nội

<sup>2</sup> Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia

## Đặt vấn đề

Cùng với sự phát triển của kinh tế, tỷ lệ mắc bệnh tim mạch ngày càng cao và xuất hiện ở nhiều lứa tuổi. Chế độ dinh dưỡng lipid không hợp lý là một trong những nguyên nhân hàng đầu của căn bệnh này. Các acid béo omega-3 có tác dụng làm giảm cholesterol và triglycerid máu, giảm nguy cơ đau tim, giảm nguy cơ đột quỵ do thiếu máu cục bộ. Ngoài ra, nhóm acid béo omega-3 còn cần thiết cho phát triển hoàn thiện chức năng nhìn của mắt, giảm nguy cơ đái tháo đường, giảm mức độ nặng và số cơn hen phế quản, giảm triệu chứng viêm khớp dạng thấp, chống trầm cảm... Một số nghiên cứu báo cáo có thể có hiệu ứng chống ung thư của acid béo omega-3 (đặc biệt là ung thư vú, đại tràng và ung thư tuyến tiền liệt)<sup>[7]</sup>. Tuy nhiên, các acid béo này nếu sử dụng với liều lượng quá lớn có thể làm tăng nguy cơ đột quỵ, xuất huyết, tăng xác suất của một số bệnh. FDA khuyến cáo rằng tổng lượng acid béo Omega-3 từ chế độ ăn không nên vượt quá 3 gam mỗi ngày, trong đó có không quá 2 gam mỗi ngày là từ các chất bổ sung dinh dưỡng. Ngoài ra, tỷ lệ giữa omega-6 và omega-3 sử dụng rất quan trọng. Một tỉ lệ omega-6 quá cao và omega-3 quá thấp đều có ảnh hưởng không tốt cho sức khỏe. Chế độ ăn phương Tây hiện đại thường có tỷ lệ của acid omega-6 và omega-3 vượt quá 10-1, một

số cao như 30-1. Tỷ lệ tối ưu được cho là 4-1 hoặc thấp hơn<sup>[8,9]</sup>.

Các acid béo omega-3, omega-6 có nhiều trong các loại dầu thực vật như dầu đậu tương, dầu dừa, dầu cọ, dầu bắp, dầu mầm lúa mì, dầu hạt cải... Việc chiết xuất các loại dầu thực vật khá đơn giản nên dễ dàng thu được hàm lượng lớn acid béo omega-3, omega-6 với chi phí thấp. Trên thế giới chưa có nhiều nghiên cứu về hàm lượng acid béo omega trong dầu thực vật<sup>[5,6]</sup>. Hiện nay, ở Việt Nam cũng chưa có nghiên cứu về hàm lượng các loại acid béo omega 3, omega 6 trong dầu thực vật. Phương pháp phân tích acid béo cũng đã được nhiều tác giả nghiên cứu trong các đối tượng như dầu gấc, viên nang dầu cá<sup>[1-4]</sup>. Tuy nhiên ở Việt Nam hiện chưa có phương pháp chính thức để phân tích acid béo trong dầu thực vật. Trong các phương pháp có thể ứng dụng để phân tích acid béo thì phương pháp sắc ký khối phổ cho kết quả tách tốt nhất, đồng thời có độ tin cậy cao<sup>[8]</sup>.

Do đó, chúng tôi nghiên cứu phương pháp định lượng một số acid béo omega-3, omega-6 trong dầu thực vật bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ (GC-MS) với các mục tiêu sau:

- Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời một số acid béo omega-3 và omega-6 trong dầu thực vật bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ.
- Thẩm định phương pháp đã xây dựng.

# ● Nghiên cứu – Kỹ thuật

- Ứng dụng phương pháp để xác định hàm lượng các acid béo trong một số loại dầu thực vật.

## Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### Đối tượng nghiên cứu

Các loại dầu thực vật có nguồn gốc khác nhau được lấy trên địa bàn Hà Nội: dầu đậu tương, dầu mè, dầu oliu...

### Thiết bị

- Máy sắc ký khí khối phổ GC-MS model Polaris Q của hãng Thermo hoặc tương đương.

- Cột sắc kí khí DB5-MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

- Các thiết bị cần thiết khác...

### Hóa chất, thuốc thử

Chuẩn hỗn hợp 37 FAMES (dạng methylester của acid béo) với nồng độ tổng 10 mg/ml trong methylen clorid, được cung cấp bởi Supelco.

Chuẩn nội methyl nonadecanoat của Sigma-Aldrich.

Natri clorid, Natri hydroxyd, methanol, n-hexan, boron trifluorid 50%/methanol của Merck.

### Chuẩn bị các dung dịch

- *Dung dịch chuẩn nội:* Cân chính xác 0,1g methyl nonadecanoat hòa tan trong n-hexan vừa đủ 50ml, thu được dung dịch chuẩn nội có nồng độ 2000 µg/ml.

- *Dung dịch natri hydroxyd 0,5M pha trong methanol:* Cân 2g NaOH định mức trong bình định mức 100 ml bằng methanol. Bảo quản trong tủ lạnh.

- *Dung dịch boron trifluorid 7%/methanol:* Hút 3,5ml dung dịch BF<sub>3</sub> vào bình định mức 25 ml. Định mức đến vạch bằng n-hexan. Bảo quản trong tủ lạnh.

- *Dung dịch natri methylat 5%/methanol:* Cân 5g natri methylat, định mức trong bình định mức 100ml bằng methanol. Bảo quản trong tủ lạnh.

### Điều kiện sắc ký

Chương trình nhiệt độ: Nhiệt độ đầu 100°C giữ trong 1 phút; tăng 20°C/ phút lên 165°C, sau đó tăng 5°C/1 phút lên 260°C, giữ trong 16,75 phút. Tổng thời gian phân tích 40 phút.

- Nhiệt độ buồng bơm mẫu: 250°C, bơm không chia dòng, thời gian không chia dòng là 1 phút. Thể tích tiêm 1 µl.

- Nhiệt độ transferline: 260°C.

- Khí mang: Heli, tốc độ 1 ml/ phút

- Nhiệt độ buồng ion: 200°C.

- Thời gian cắt dung môi: 7 phút.

- Chế độ chạy FULL SCAN dải từ 50-250 m/z.

## Kết quả

### Phương pháp dẫn xuất hóa

Để phân tích được bằng sắc ký khí, mẫu phân tích cần phải được chuyển thành dạng hơi trong điều kiện thực nghiệm. Điều này không thực hiện được với các acid béo, đặc biệt là các acid béo nhiều carbon. Vì vậy, cần chuyển các chất béo và acid béo trong dầu thực vật thành dẫn xuất dễ bay hơi để có thể phân tích được bằng GC/MS. Bên cạnh đó, dẫn xuất hóa còn cho phép chuyển các acid béo về dạng không phân cực nên hạn chế được khả năng hấp phụ trong quá trình sắc ký khí do tương tác của những nhóm phân cực gây ra.

Khảo sát một số phương pháp dẫn xuất hóa và so sánh kết quả thu được khi phân tích cùng một mẫu: lựa chọn phương pháp dẫn xuất với natri hydroxyd/methanol và borontrifluorid/ methanol vì phương pháp này có hiệu suất dẫn xuất cao nhất.

**Bảng 1:** So sánh kết quả giữa một số phương pháp dẫn xuất

Acid béo	Dẫn xuất bằng Natri methylat/MeOH (mg/100g) <sup>[8]</sup>	Dẫn xuất bằng NaOH/MeOH và BF <sub>3</sub> /MeOH (mg/100g) <sup>[11]</sup>	Dẫn xuất bằng BF <sub>3</sub> /MeOH (mg/100g) <sup>[10]</sup>
Acid linoleic	25,694	30,060	12,00
Acid arachidonic	0,004	0,006	0,005
Acid γ-linolenic	0,124	0,174	0,062
EPA	0,075	0,107	0,071

### Tính phù hợp của hệ thống sắc ký

Các acid béo phân tích sau khi được dẫn xuất hóa được xác định bằng sắc ký khí khối phổ (GC-MS) và so sánh với phổ chuẩn trong thư viện phổ chuẩn Mainlib.

Tính phù hợp của hệ thống sắc ký khí được khảo sát bằng cách bơm 6 lần cùng 1 dung dịch chuẩn hỗn hợp các acid đã được methyl ester hóa (FAMES) vào máy sắc ký khí.

**Bảng 2:** Kết quả khảo sát độ lặp lại thời gian lưu và diện tích pic

TT	Acid béo	RSD % thời gian lưu	RSD % diện tích pic	RSD % tỷ lệ ES/IS
1	$\gamma$ -Linolenic	0,048	4,56	0,60
2	Linoleic	0,064	4,57	0,75
3	Arachidonic	0,049	4,70	0,77
4	Dihomo- $\gamma$ -linolenic	0,060	3,78	0,96
5	Eicosapentaenoic	0,049	4,58	0,95
6	Docosahexaenoic	0,040	4,87	0,62
7	Eicosatrienoic	0,039	4,62	0,58

Kết quả cho thấy các acid béo phân tích đều

**Bảng 3:** Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Acid Omega-3			Acid Omega-6			
	Acid Eicosa- penta-enoic	Acid ocosa- hexaenoic	Acid Eicosatrienoic	Acid $\gamma$ -linolenic	Acid linoleic	Acid ara- chidonic	Acid diho- $\gamma$ -linolenic
<i>Tỷ lệ diện tích pic tương ứng (ES/IS)</i>							
0,5	0,162	0,117	0,158	0,220	0,315	0,188	0,197
2,5	0,991	0,812	0,885	0,951	0,958	0,922	0,897
5	1,942	1,584	1,840	1,903	2,032	1,884	1,926
10	3,558	3,017	3,524	3,607	3,653	3,603	3,540
15	5,432	4,483	5,342	5,187	5,582	5,416	5,466
20	7,354	6,185	7,317	6,705	7,375	7,490	7,336
PT hồi quy	$y = 0,3631x + 0,0324$	$y = 0,3053x + 0,0026$	$y = 0,3634x - 0,0325$	$y = 0,3326x + 0,157$	$y = 0,3626x + 0,1157$	$y = 0,3698x - 0,0156$	$y = 0,3644x + 0,0086$
R	R = 0,9996	R = 0,9995	R = 0,9997	R = 0,9992	R = 0,9997	R = 0,9995	R = 0,9997

Qua bảng kết quả, ta thấy tỷ số diện tích pic đáp ứng thu được trên sắc đồ tỉ lệ với nồng độ đã chọn. Trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tuyến tính giữa  $\text{Spic}_{\text{ES}}/\text{Spic}_{\text{IS}}$  với  $C_{\text{chất phân tích}}$ . Sự phụ thuộc này khá chặt chẽ thể hiện qua đường thẳng hồi quy với hệ số tương quan  $R > 0,9992$ .

**Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định**

**Bảng 4:** LOD, LOQ của các acid béo phân tích

	Acid omega-6				Acid omega-3		
	Acid gamma linolenic	Acid linoleic	Acid ara- chidonic	Acid diho- gamma-linolenic	Acid Eicosa- penta-enoic	Acid Docosa- hexa-enoic	Acid Eicosa- trienoic
LOD (ng/ml)	12,50	3,125	12,50	12,50	12,50	5,00	25,00
LOQ (ng/ml)	41,67	10,42	41,67	41,67	41,67	16,67	83,3

Kết quả khảo sát LOD và LOQ của thiết bị cho thấy phương pháp đáp ứng được yêu cầu về độ nhạy có thể ứng dụng trong phân tích các loại acid béo khác nhau trong dầu thực vật.

có độ lặp lại của thời gian lưu ( $\text{RSD} < 0,064\%$ ), độ lặp lại của diện tích pic các acid béo không đạt yêu cầu  $\leq 2\%$  (đều  $\leq 5\%$ ). Tuy nhiên tỷ lệ diện tích pic so với chuẩn nội (ES/IS) cho  $\text{RSD} < 0,96\%$  chứng tỏ khi sử dụng thêm chất nội chuẩn hệ thống sắc ký phù hợp, ổn định, cho phép phân tích đồng thời các acid béo trên với điều kiện sắc ký đã xây dựng.

**Khảo sát khoảng tuyến tính**

Từ dung dịch chuẩn gốc 37 acid béo pha thành 6 hàm lượng khác nhau của các chuẩn acid dùng làm đường chuẩn có nồng độ lần lượt là: 0,5; 2,5; 5; 10; 15; 20  $\mu\text{g/ml}$  để khảo sát khoảng tuyến tính.

**lượng (LOQ)**

Pha dãy dung dịch các acid béo chuẩn có nồng độ giảm dần từ 500 ng/ml đến 3,125 ng/ml. Tiến hành sắc kí trong điều kiện đã nêu. LOD chính là nồng độ của chất phân tích mà tại đó tỉ lệ giữa tín hiệu của chất phân tích và tín hiệu nền bằng 3 ( $\text{S/N} = 3$ ) và  $\text{LOQ} = 10/3 * \text{LOD}$ .

**Độ đúng**

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn (mẫu đã tham gia liên phòng của FAPAS, mã số 1482). So sánh kết quả giữa kết quả phân tích với kết quả công bố của mẫu liên phòng:

## ● Nghiên cứu – Kỹ thuật

**Bảng 5:** Khảo sát tính đúng của phương pháp đối với acid linoleic (C18:2n6)

Lần phân tích	Kết quả thu được (g/100g)	Kết quả công bố (g/100g)	Z <sub>score</sub>
Lần 1	3,81	4,04	-1,211
Lần 2	4,10	4,04	0,316

So sánh kết quả phân tích với kết quả trong mẫu chuẩn, kết quả thu được đều có giá trị

**Bảng 6:** Độ lặp lại của phương pháp

Lần khảo sát	Lượng chất phân tích được (g/100g)				
	Acid omega-3			Acid omega-6	
	Acid Eicosa-penta-enoic	Acid Docosa-hexa-enoic	Acid linoleic	Acid arachidonic	Acid dihomogamma-linolenic
1	0,78	1,90	36,13	2,99	0,0161
2	0,74	1,82	35,81	2,92	0,0170
3	0,75	1,96	36,16	3,09	0,0164
4	0,74	1,87	36,35	2,99	0,0172
5	0,73	1,85	36,40	2,97	0,0164
6	0,73	1,93	35,81	2,95	0,0161
TB	0,75	1,89	36,11	2,98	0,0165
SD	0,018	0,05	0,25	0,058	0,00046
RSD%	2,45	2,75	0,69	1,94	2,80

Kết quả cho thấy giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD% của các chất phân tích trong 6 lần phân tích

tuyệt đối của Z<sub>score</sub> < 2. Như vậy, phương pháp xây dựng đã đạt yêu cầu về tính đúng.

### Độ lặp lại của phương pháp

Phân tích 6 lần khác nhau cùng 1 mẫu dầu thực vật. Đánh giá kết quả thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) của hàm lượng các chất phân tích được qua 6 lần phân tích đó.

đều nhỏ hơn 2,8%. Như vậy quy trình đã xây dựng là phù hợp và đảm bảo cho việc phân tích.

### Ứng dụng phương pháp để phân tích một số mẫu dầu thực vật

**Bảng 7:** Kết quả phân tích một số mẫu dầu thực vật

Mẫu	Hàm lượng các chất phân tích được (g/100g)				
	Acid linoleic	Acid arachidonic	EPA	Acid dihomogamma-linolenic	DHA
1	36,11	0,0024	0,010	0,017	
2	7,41	2,98	0,75	0,194	1,89
3	6,16		0,085		0,075
4	14,63				
5	21,78				
6	36,35				
7	48,51				

### Bàn luận

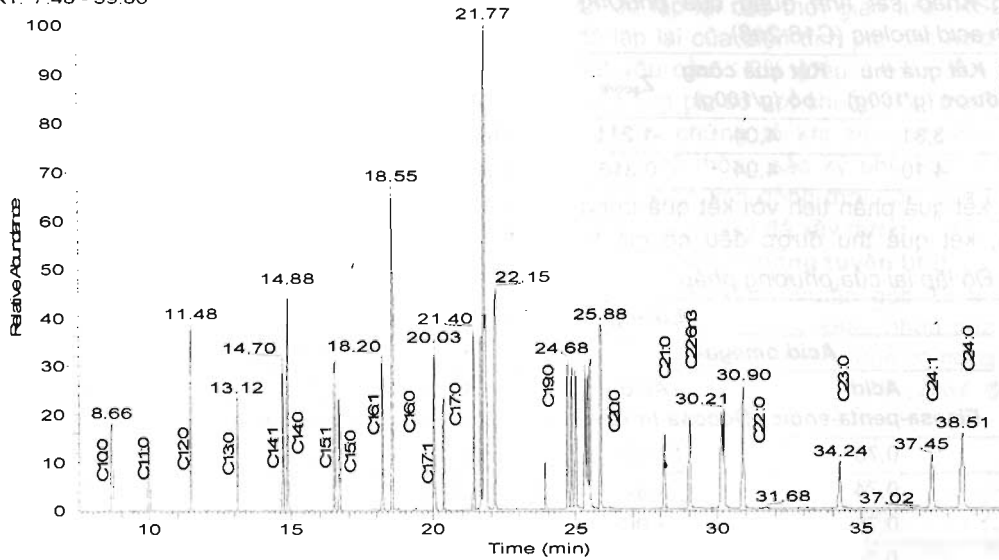
Kết quả thu được cho thấy phương pháp dẫn xuất các acid béo sang dạng methylester bằng NaOH/Methanol và BF<sub>3</sub>/Methanol có hiệu suất dẫn xuất cao nhất.

Phương pháp GC-MS xây dựng đã định tính và định lượng được đồng thời một số acid béo omega-3, omega-6 trong dầu thực vật. Phương pháp này đã được thẩm định trên một số chỉ tiêu như tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện, giới hạn định

lượng và đều đạt yêu cầu. Với kết quả này, chúng tôi đề xuất ứng dụng phương pháp này tại các phòng thí nghiệm để phân tích các acid béo omega-3, omega-6 nói trên.

Phương pháp đã xây dựng có khả năng phân tách tốt tới 32 acid béo khác nhau trong hỗn hợp chuẩn 37 acid béo. Vì vậy, chúng tôi đề nghị tiếp tục hoàn thiện quy trình phân tích và thẩm định để định lượng được đồng thời các acid béo còn lại trong hỗn hợp chuẩn 37 acid béo.

RT: 7.48 - 39.86



NL:  
4.55E6  
TIC F: MS  
Std10\_20\_  
30ppm

Sắc ký đồ phân tích hỗn hợp chuẩn 37 FAMES

### Summary

Fatty acids from vegetable oil is transesterified into fatty acid methyl esters (FAMES) by using sodium hydroxid in methanol and borontrifluoride in methanol. FAMES then was extracted by hexan and determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Separation of FAMES using a 60m x 0,25mm fused silica capillary column coated with a 0.25  $\mu\text{m}$  film of poly-(5% diphenyl/ 95% dimethyl siloxane). Simultaneous determination of several omega-3 and omega-6 fatty acids was performed using full scan MS (50-250 m/z). The method was validated, showing good linearity ( $R > 0.999$ ) in a range of 0.5 to 20  $\mu\text{g/ml}$ , high trueness and precision (RSD <2.8%). The application of the developed method on vegetable oil samples offered good results.

**Keywords:** fatty acid, FAME, omega 3, omega 6, gas chromatography- mass spectrometry.

### Tài liệu tham khảo

- Đào Thanh Bình, Nguyễn Đức Toàn, Nguyễn Tuấn Anh, Trịnh Văn Lầu, Định lượng đồng thời acid eicosapentaenoic và acid docosahexaenoic trong một số viên nang mềm omega-3 bằng sắc ký khí, *Kiểm nghiệm thuốc*, (2007)5(16). Tr. 14-18.
- Phạm Thị Kim Trang, Nguyễn Xuân Dũng, Lê Thanh Hải, Sử dụng sắc ký khí mao quản để xác định thành phần các axit béo trong dầu thực vật, *Phân tích lý hóa và sinh học*, (1998)3(2), tr. 6-11.
- Nguyễn Tường Vy, Trần Tử An, Đặng Đức

Khanh, Trịnh Văn Lầu, Xác định các acid béo trong dầu màng hạt gấc bằng phương pháp sắc ký khí (GC/FID), *Kiểm nghiệm thuốc*, (2005) 3(9), tr. 21-25.

4. Nguyễn Tường Vy, Trần Tử An, Đặng Đức Khanh, Trịnh Văn Lầu, Xác định thành phần các acid béo dầu gấc bằng sắc ký khí khối phổ (GC/MS), *Dược học*, (2007) 3, tr. 28-30.

5. Bruno J., Nicholas L. S., William D. J., Determination of the fatty-acid composition of soybean oil by high-pressure liquid chromatography, (1982) *Talanta*, 29. pp. 54-56.

6. Chen S. H., Chen K. C., Lien H. M., Determination of fatty acids in vegetable oil by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A* (1999), 849, pp. 357-369.

7. Hibbeln, J.R.. Healthy intakes of  $\omega 3$  and  $\omega 6$  fatty acids: estimations considering worldwide diversity, *American Journal of Clinical Nutrition*, (2006) 83 (6, supplement): 1483S-1493S.

8. Seppänen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R., Review: Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition, *Analytica Chimica Acta*, (2002) 465, pp. 39-62.

9. Simopoulos, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2002), 56 (8), pp. 365-379.

10. William, H. (2002), Official method of Analysis of AOAC International, 17<sup>th</sup> Edition, No 969.33, USA.

11. William, H. (2002), Official method of Analysis of AOAC International, 17<sup>th</sup> Edition, No 996.06, USA.