DOI: 10.64302/joshusc.v35n2.1430

PHÁT TRIỂN QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG EPA (EICOSAPENTAENOIC ACID) VÀ DHA (DOCOSAHEXAENOIC ACID) TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE BẰNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP NỐI KHỐI PHỔ

Huỳnh Thị Túy Ngọc[1,2], Nguyễn Thị Anh Trâm[1], Lê Thị Mỹ Diệu[1], Nguyễn Đăng Giáng Châu[1,*], Nguyễn Hải Phong[1]

[1]Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

[2]Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm thành phố Huế

* Email: chaundg@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/6/2026; ngày hoàn thành phản biện: 30/6/2026; ngày duyệt đăng: 01/8/2026

TÓM TẮT

Quy trình định lượng đồng thời acid Eicosapentaenoic (EPA) và acid Docosahexaenoic (DHA) trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng dầu bằng sắc ký khí ghép nối khối phổ (GC-MS) đã được phát triển và thẩm định. Các điều kiện phân tích và xử lý mẫu được tối ưu hóa, trong đó lựa chọn sử dụng cột DB-5MS cho phân tích sắc ký, mẫu thực được chiết lặp lại 3 lần và dẫn xuất hóa bằng 5 mL dung dịch CH_3ONa/MeOH 5%. Phương pháp tuyến tính trong khoảng 10–1000 mg/L đối với cả EPA và DHA (R^2 = 0,9999). Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt đạt 10 mg/kg và 30 mg/kg. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) < 3,0%, RSD của độ chính xác trung gian nhỏ hơn 4,5% , và độ thu hồi đạt 95,05–104,87%, đáp ứng được yêu cầu của AOAC. Phương pháp được áp dụng thử nghiệm trên năm mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thương mại dạng dầu, kết quả so sánh cho thấy hàm lượng EPA và DHA phân tích chênh lệch không nhiều so với giá trị công bố trên nhãn.

Từ khóa: EPA và DHA; thực phẩm bảo vệ sức khỏe; sắc ký khí ghép nối khối phổ, ester hóa.

1. MỞ ĐẦU

Acid Eicosapentaenoic (EPA) và acid Docosahexaenoic (DHA) là hai acid béo không no thuộc nhóm omega-3. Các hoạt chất này đã được nhiều công bố xác nhận có vai trò quan trọng đối với sức khỏe tim mạch, thần kinh, thị giác, và kháng viêm (Djuricic & Calder, 2024; Patted, 2024; Reily, 2023). EPA và DHA thường có nhiều trong cá biển,

dầu cá, dầu nhuyễn thể, tảo hoặc vi tảo, và vì vậy được con người tách chiết, chế biến thành các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) bổ sung EPA và DHA (Djuricic & Calder, 2024; Makay, 2025; Yan, 2023). Trên thị trường thường gặp các dạng sản phẩm như viên nang mềm dầu cá, dầu uống, chế phẩm phối hợp vitamin và khoáng chất. Tại Việt Nam, các sản phẩm này được kinh doanh rộng rãi và thường ghi nhãn theo hàm lượng "dầu cá", "omega-3 tổng số", "EPA" và "DHA".

Các nghiên cứu gần đây cho thấy hàm lượng EPA và DHA trong các sản phẩm bổ sung omega-3 trên thị trường có biến động đáng kể. Nghiên cứu của Assadourian và cộng sự khảo sát nhãn của 2.819 sản phẩm dầu cá tại Hoa Kỳ và ghi nhận sự đa dạng lớn về công bố công dụng, liều dùng cũng như hàm lượng EPA/DHA (Assadourian, 2023). Hilton và nhóm nghiên cứu cũng đã phân tích định lượng EPA và DHA trong 15 sản phẩm dầu cá thương mại, kết quả đã phát hiện một số sản phẩm có hàm lượng EPA hoặc DHA lệch quá ± 20% so với công bố trên nhãn (Hilton, 2024). Nhóm nghiên cứu của Banovic cũng chỉ ra rằng cần kiểm soát chặt chẽ hàm lượng omega-3 công bố trên nhãn sản phẩm (Banović Fuentes, 2025). Những kết quả này cho thấy ngay cả tại các thị trường có hệ thống quản lý phát triển, việc bảo đảm sự phù hợp giữa hàm lượng thực tế và nhãn công bố vẫn là vấn đề đáng quan tâm.

Tại Việt Nam cũng có một số nghiên cứu về EPA và DHA và omega-3 đã được công bố. Đinh Thị Thu Trang và cộng sự đã nghiên cứu tách chiết omega-3 từ phụ phẩm chế biến cá bằng phương pháp thủy phân kết hợp kết tinh urê, qua đó nâng cao hàm lượng chiết xuất các acid béo không no từ nguồn nguyên liệu giá trị thấp (Đinh, 2025). Hoàng Thị Bích và cộng sự xây dựng quy trình ứng dụng enzym kết hợp các kỹ thuật phân ly và tinh chế để thu nhận dầu cá giàu EPA, DPA và DHA từ phụ phẩm cá ngừ vây vàng (Bich, 2017). Gần đây, Vũ Đức Cảnh và cộng sự đã thành công trong việc sử dụng dung môi eutectic sâu (DES) – được biết đến là phương pháp chiết dung môi xanh - để tách chiết dầu cá từ phụ phẩm cá basa (Vũ, 2024). Kết quả đạt hiệu suất khoảng 84,5% omega-3, -6 và -9, trong đó hàm lượng EPA và DHA đạt 40,5% và 18,9%. Tuy nhiên, một hạn chế đối với các nghiên cứu trong nước là các công bố về xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích định lượng EPA và DHA trong TPBVSK không nhiều. Một phần do việc phân tích trực tiếp EPA và DHA trên thiết bị phân tích sắc ký thường không cho độ nhạy tốt và nhiễu nền lớn, đòi hỏi cần thiết bước ester hóa.

Để định lượng EPA và DHA, hiện nay chủ yếu sử dụng phương pháp sắc ký khí sau khi chuyển acid béo thành dạng methyl ester (FAME). GC-FID (sắc ký khí sử dụng detector ion hóa ngọn lửa) là kỹ thuật được sử dụng phổ biến do chi phí phân tích hợp lý, độ lặp lại tốt và phù hợp với định lượng thành phần acid béo trong dầu cá, thủy sản và thực phẩm bổ sung (Alinafiah, 2021; Irnawati, 2024). Tuy nhiên, hạn chế của GC-FID là khả năng định danh chủ yếu dựa vào thời gian lưu và chất chuẩn. Do đó, phương pháp này gặp khó khăn khi phân tích các nền mẫu phức tạp, độ nhạy chưa cao (giới hạn phát hiện còn tương đối lớn) hoặc khi có hiện tượng đồng rửa giải giữa các methyl ester

acid béo. Trong khi đó, phương pháp GC-MS (sắc ký khí ghép nối khối phổ) được một số nghiên cứu công bố độ chọn lọc cao nhờ kết hợp thời gian lưu với phổ khối, tăng độ nhạy khi vận hành ở chế độ chọn lọc ion (SIM) (Rohman, 2023; Yi, 2014).

Từ các phân tích trên cho thấy việc xây dựng và thẩm định phương pháp GC-MS xác định đồng thời EPA và DHA trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe là cần thiết, vừa có ý nghĩa khoa học trong hoàn thiện phương pháp phân tích acid béo omega-3, vừa có giá trị thực tiễn đối với kiểm nghiệm, hậu kiểm và bảo vệ quyền lợi người tiêu dùng trên thị trường Việt Nam, trong bối cảnh chưa có công trình thẩm định phương pháp phân tích đồng thời EPA và DHA trong nền mẫu TPBVSK. So với các phương pháp đã công bố, nghiên cứu này tập trung hoàn thiện một quy trình GC-MS sử dụng nội chuẩn C19:0, xử lý nền TPBVSK dạng dầu, quy đổi kết quả từ methyl ester về acid tự do và đánh giá khả năng áp dụng trong điều kiện kiểm nghiệm tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị, hóa chất và chất chuẩn

Thiết bị:

Các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu này gồm: hệ GC/MS-QP2010 (Shimadzu - Nhật Bản), máy ly tâm (Hettich – Đức), thiết bị cô cất quay chân không (Buchi-Nhật Bản).

Hóa chất và chất chuẩn:

Các dung môi sử dụng gồm n-hexan, methanol (MeOH), ethanol, diethyl ether và petroleum ether (HPLC grade), và các muối CH_3ONa , NaCl, Na_2SO_4 khan. Các chất chuẩn phân tích bao gồm methyl cis-5,8,11,14,17-eicosapentanoate (EPA), methyl cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoate (DHA), và chất nội chuẩn methyl nonadecanoate (C19:0). Các hóa chất đều được mua tử Sigma Aldrich (Hoa Kỳ). Mặc dù kết quả cuối cùng được báo cáo theo EPA và DHA dạng acid tự do, các chuẩn methyl ester được sử dụng vì chất phân tích trong mẫu sau xử lý cũng được chuyển sang dạng FAME trước khi phân tích GC-MS.

Dung dịch chuẩn gốc EPA, DHA và nội chuẩn C19:0 có nồng độ 1000 mg/L được chuẩn bị trong n-hexan. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc được chuẩn bị bằng cách hút chính xác 0,10 mL lần lượt các dung dịch chuẩn gốc ở trên vào bình định mức 5,0 mL, sau đó định mức bằng n-hexan. Các dung dịch chuẩn làm việc ở những nồng độ khác nhau được chuẩn bị bằng cách pha loãng từ dung dịch chuẩn hỗn hợp.

Dung dịch CH_3ONa/MeOH 5% được chuẩn bị bằng cách hòa tan khoảng 5,0 g CH_3ONa trong methanol và định mức đến 100 mL bằng cùng dung môi. Dung dịch được bảo quản trong bình thủy tinh tối màu và sử dụng trong vòng một tuần.

2.2. Điều kiện phân tích trên thiết bị GC-MS

Cột mao quản với khí mang helium có độ tinh khiết 99,99999%, tốc độ dòng 1,47 mL/phút, thể tích bơm mẫu 1 µL và chế độ bơm mẫu split 1:50. Nhiệt độ buồng tiêm được duy trì ở 250°C. Chương trình nhiệt độ lò cột được thiết lập từ 70°C (giữ 1 phút), tăng 5°C/phút đến 250°C và giữ đẳng nhiệt trong 15 phút. Tổng thời gian phân tích là khoảng 42 phút.

Trong nghiên cứu này, hai cột mao quản được khảo sát gồm DB-1MS (pha tĩnh 100% dimethylpolysiloxane) và DB-5MS (pha tĩnh 5% phenyl–95% dimethylpolysiloxane), cùng chiều dài 30 m (Agilent Technologies, Hoa Kỳ).

Detector khối phổ sử dụng nguồn ion hóa EI ở năng lượng 70 eV, interface 250°C. Chế độ full Scan trong khoảng khối lượng từ 50–500 amu được sử dụng để xác định thời gian lưu. Sau khi lựa chọn các ion đặc trưng của chất phân tích dựa vào thư viện phổ và phổ Scan của chất chuẩn, chế độ phân tích chọn lọc ion (SIM) được dùng để phân tích định lượng. Các mảnh định lượng của methyl nonadecanoate (C19:0) m/z 74, mảnh xác nhận là các ion m/z 87 và 43. Đối với EPA và DHA, ion định lượng là m/z 79, các ion m/z 91 và 67 được sử dụng làm ion tham khảo.

2.3. Quy trình lấy mẫu và xử lý mẫu

Lấy mẫu:

Mẫu TPBVSK chứa omega-3 dạng viên nang mềm đang lưu hành trên thị trường được lựa chọn để minh họa khả năng ứng dụng của phương pháp. Với mỗi sản phẩm, lấy ngẫu nhiên từ 10-20 viên, vỏ nang được cắt mở và loại bỏ hoàn toàn. Tiến hành đồng nhất bằng cách trộn đều phần dầu bên trong nang.

Xử lý mẫu:

Cân khoảng 0,1–1,0 g mẫu đã đồng nhất cho vào bình nón 250 mL, thêm 30 mL ethanol, 10 mL nước cất và 30 mL HCl đậm đặc. Tiến hành thủy phân ở nhiệt độ sôi trong khoảng 30–45 phút nhằm giải phóng các acid béo khỏi nền mẫu (bình phản ứng được lắc đều định kỳ 10 phút/lần).

Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, toàn bộ dịch thủy phân được chuyển sang phễu chiết và chiết bằng 80 mL hỗn hợp diethyl ether/petroleum ether (1:1, v/v) trong 5 phút. Thu lớp hữu cơ, tiếp tục chiết lớp nước thêm N lần bằng 30 mL hỗn hợp dung môi tương tự như trên. Các dịch chiết hữu cơ được gộp lại và làm khô qua lớp Na_2SO_4 khan nhằm loại bỏ hoàn toàn lượng nước còn sót lại sau quá trình chiết. Bước này giúp hạn chế sự phân hủy của sodium methoxide và nâng cao hiệu quả tạo dẫn xuất methyl ester. Sau khi lọc bỏ Na_2SO_4, dịch được cô quay chân không ở 40°C đến cạn, thêm 0,1mL nội chuẩn C19:0 có nồng độ 1000 mg/L nhằm hiệu chỉnh quá trình tạo dẫn xuất và phân tích GC-MS. Sau đó, tiếp tục thêm V mL CH_3ONa/MeOH 5%, đậy nắp, lắc mạnh 3 phút và

để phản ứng trong 5 phút nhằm chuyển các acid béo thành dạng methyl ester. Sau đó, thêm 5 mL n-hexan, lắc mạnh trong 3 phút và ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lớp n-hexan phía trên được thu vào vial 2 mL để phân tích trên hệ thống GC-MS.

Mẫu trắng quy trình được chuẩn bị bằng cách thay mẫu bằng nền dầu hoa anh thảo đã được xác nhận không chứa EPA và DHA, sau đó xử lý qua toàn bộ các bước tương tự mẫu thử. Nền trắng này đồng thời được sử dụng cho thí nghiệm thêm chuẩn đánh giá LOD, LOQ và độ thu hồi.

Trong nghiên cứu này, số lần chiết lặp lại N và thể tích V mL CH_3ONa/MeOH 5% để tạo dẫn xuất methyl ester sẽ được khảo sát, với N = 1, 2, 3 lần, và V = 3, 4, 5, 6 mL.

2.4. Thẩm định phương pháp

Các thông số thẩm định được đánh giá theo hướng dẫn của AOAC International (AOAC, 2016) và ICH Q2(R2) (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2024), bao gồm độ tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác (đánh giá qua độ lặp lại, độ tái lặp nội bộ), độ đúng (qua mẫu CRM).

Độ tuyến tính được đánh giá qua hệ số xác định R^2 của đường chuẩn, được thiết lập trong khoảng nồng độ từ 10 đến 1000 mg/L (nền n-hexane) đối với cả EPA và DHA, thông qua mối quan hệ giữa nồng độ chất phân tích và tỷ lệ diện tích peak của chất phân tích so với nội chuẩn methyl nonadecanoate (C19:0). Độ chệch (Δ%) của đường chuẩn được xác định từ sai số tương đối giữa nồng độ của dung dịch chuẩn tính lại từ đường chuẩn ($C_{tính\ lại}$) và nồng độ thực tế của dung dịch chuẩn ($C_{thực}$) qua công thức:

$$\Delta(\%) = \frac{C_{tính\ lại} - C_{thực}}{C_{thực}} \times 100$$

LOD và LOQ được xác định dựa trên tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N), tương ứng với S/N ≥ 3 và S/N ≥ 10. Cụ thể là, dung dịch chuẩn hỗn hợp chất phân tích được thêm chuẩn vào mẫu nền TPBVSK dạng dầu không chứa DHA và EPA từ mức nồng độ thấp nhất có thể để thiết bị phát hiện được chất phân tích cho tỉ lệ S/N ≥ 3, nồng độ đó được xác định là LOD của phương pháp. Tương tự như vậy đối với LOQ..

Độ lặp lại (thể hiện qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) được đánh giá thông qua tám phép phân tích lặp lại trên cùng một mẫu TPBVSK dạng dầu có chứa EPA và DHA trong cùng điều kiện thí nghiệm. RSD (%).

Độ tái lặp được đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối tái lặp RSD_R (%) của 2 người (mỗi người thực hiện 6 lần) phân tích trên cùng 1 mẫu tại các thời điểm khác nhau.

Độ lặp lại và độ tái lặp được tính từ S: Độ lệch chuẩn; n: Số lần thí nghiệm; x_i: Giá trị tính được của lần thử nghiệm thứ "i"; $\overline{X}$: Giá trị trung bình của các lần thử nghiệm theo công thức sau:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i-1}^{n}(x_i - \overline{X})^2}{n-1}} \quad ; \quad RSD\ (\%) = \frac{S}{\overline{x}}.100$$

Độ đúng của phương pháp (thể hiện qua độ thu hồi) được đánh giá thông qua thí nghiệm thêm chuẩn trên nền TPBVSK dạng dầu ở ba mức nồng độ tương ứng 80%, 100% và 120% so với hàm lượng danh định của EPA (2000 mg/kg), và DHA (1000 mg/kg) trong mẫu, tức là tương ứng với thêm chuẩn 1600 mg/kg, 2000 mg/kg, 2400 mg/kg đối với EPA và 800 mg/kg, 1000 mg/kg, 1200 mg/kg đối với DHA. Mẫu nguyên liệu chứa EPA và DHA được cấp chứng chỉ (PronovaPure® 360:240 EE) đồng thời được sử dụng để đánh giá hiệu quả của quy trình phân tích.

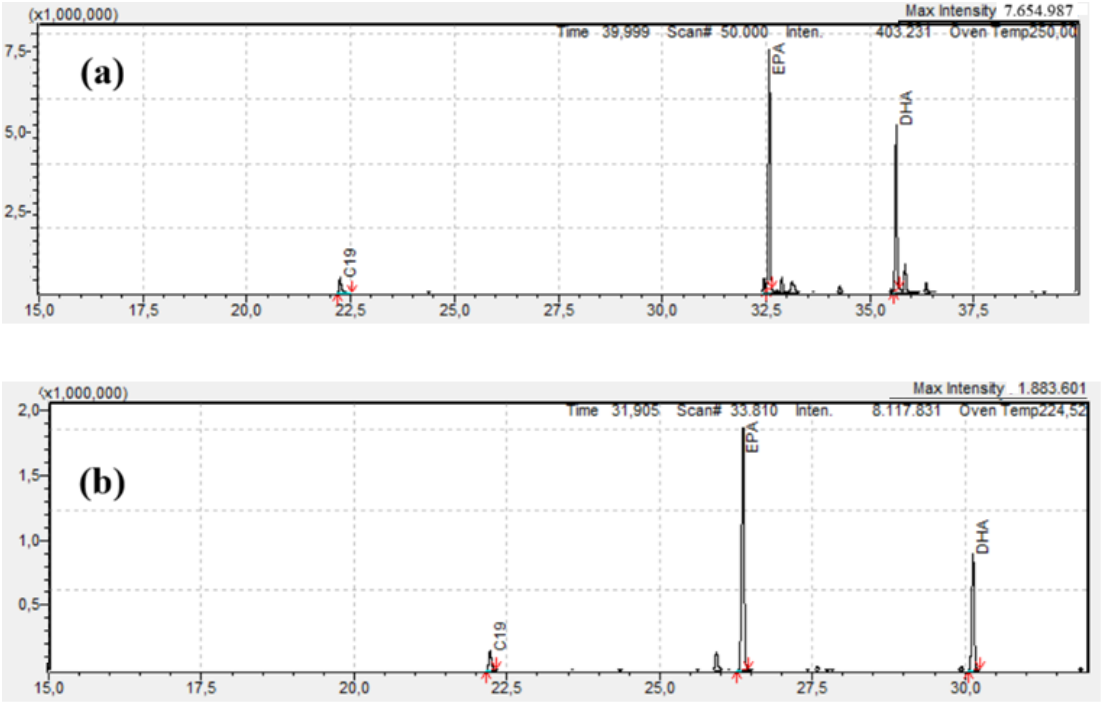
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa một số điều kiện phân tích

3.1.1. Lựa chọn loại cột mao quản phù hợp cho quá trình tách trên thiết bị GC-MS

Trong giai đoạn khảo sát ban đầu, phổ toàn phần ở chế độ SCAN cho thấy nền mẫu dầu có nhiều cấu tử đồng rửa giải, do đó việc lựa chọn cột sắc ký là một trong các yếu tố chính quyết định để bảo đảm độ chọn lọc của phương pháp. Do DHA và EPA có đặc tính không phân cực nên hai loại cột không phân cực là DB-1MS và DB-5MS được lựa chọn khảo sát. Kết quả khảo sát được trình bày ở **Hình 1.**

Kết quả cho thấy cả hai cột đều cho phép nhận diện và tách EPA, DHA khỏi nhau. Trong cùng điều kiện vận hành, DB-5MS tạo các peak mục tiêu có cường độ cao hơn, sắc nét hơn, bề rộng chân peak nhỏ hơn và ít chịu ảnh hưởng của tín hiệu nền lân cận. Do đó cột DB-5MS được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.



Hình 1. Sắc đồ khảo sát ảnh hưởng của 02 loại cột sắc ký đến sự tách hỗn hợp các chất 100 mg/L trên thiết bị GC-MS: (a) DB-5MS (30m) ; (b) DB-1MS (30m).

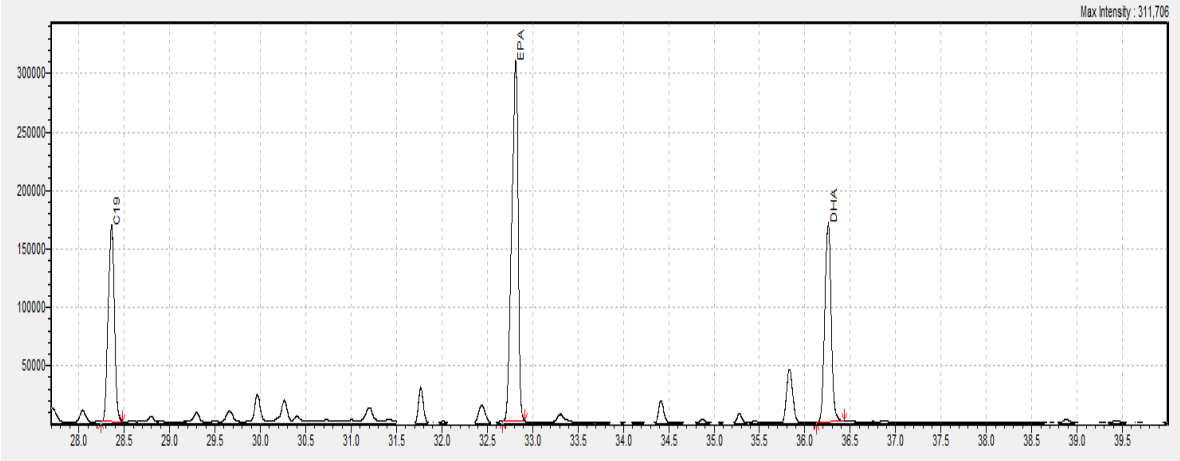
3.1.2. Lựa chọn số lần chiết lặp và thể tích hỗn hợp tạo dẫn xuất methyl ester

Trong quá trình xử lý mẫu, việc chiết lipid và hiệu quả chuyển hóa các acid béo thành methyl ester có thể ảnh hưởng trực tiếp đến độ nhạy và độ chính xác của phép phân tích. Vì vậy, số lần chiết lặp (N) và thể tích dung dịch CH_3ONa/MeOH 5% (V mL) được khảo sát nhằm tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu. Mẫu TPBVSK chứa omega-3 dạng dầu được sử dụng trong thí nghiệm này. Đối với thí nghiệm khảo sát số lần chiết lặp, thể tích CH_3ONa/MeOH 5% được giữ cố định 6 mL. Sau khi lựa chọn được số lần chiết hiệu quả nhất, tiếp tục tiến hành thí nghiệm khảo sát thể tích CH_3ONa/MeOH 5% tối ưu với số lần chiết đã chọn. Kết quả được trình bày ở Bảng 1 và Hình 2.

Bảng 1. Kết quả tối ưu hóa điều kiện xử lý mẫu

Thông số khảo sát	Điều kiện	EPA (Tỷ lệ diện tích peak)	DHA (Tỷ lệ diện tích peak)
Số lần chiết	1	0,82	0,64
	2	1,48	0,85
	3	1,63	1,11
Thể tích CH_3ONa/MeOH 5% (mL)	3	0,69	0,57
	4	1,25	0,91
	5	1,60	1,10
	6	1,64	1,13

Kết quả ở **Bảng 1** cho thấy, khi tăng số lần chiết lên 3 lần và tăng thể tích dung dịch tạo dẫn xuất sodium methylate từ 3 mL lên 5 mL, tín hiệu peak của các methyl ester tăng rõ rệt. Bên cạnh đó, việc chiết lặp lại 3 lần và thể tích 5 mL cũng như 6 mL CH_3ONa/MeOH 5% cho cường độ peak cao và hình dạng peak sắc nét, bề rộng chân peak nhỏ và ít nhiễu nền (Hình 2). Do đó, nghiên cứu này đề xuất chiết lặp lại ít nhất 3 lần và dẫn xuất hóa với 5 mL CH_3ONa/MeOH 5% để giảm tiêu hao dung môi hữu cơ, hướng đến "green chemistry".



Hình 2. Sắc đồ hỗn hợp chất phân tích trên nền mẫu TPBVSK dạng dầu được chiết với 3 lần lặp lại và dẫn xuất hóa bởi 5 mL CH_3ONa/MeOH 5%.

3.2. Hiệu lực hóa quy trình phân tích

3.2.1. Đường chuẩn và khoảng nồng độ làm việc

Đường chuẩn của các chất phân tích được xây dựng trên khoảng nồng độ 10-1000 mg/L trên nền n-hexane, sử dụng tỷ lệ diện tích peak giữa chất phân tích và nội chuẩn. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát đường chuẩn của EPA và DHA

Nồng độ (mg/L)	**EPA**		**DHA**	
	Tỷ lệ diện tích peak	**Độ chệch Δ**(%)	**Tỷ lệ diện tích peak**	**Độ chệch Δ**(%)
10	0,077	12,75	0,076	11,18
25	0,199	5,06	0,215	5,28
50	0,390	5,34	0,462	8,23
100	0,863	5,66	1,107	4,04
250	2,054	1,08	2,712	0,54

500	4,034	0,55	5,566	1,14
1000	8,122	0,18	11,056	0,03
Phương trình hồi quy	$y = 0,0081x + 0,0067$; $R^2 = 0,9999$		$y = 0,0111x - 0,0477$; $R^2 = 0,9999$	

Kết quả khảo sát cho thấy EPA và DHA đều có mối tương quan tuyến tính tốt trong khoảng nồng độ 10–1000 mg/L với hệ số xác định R^2 đạt 0,9999.

Độ chệch của các điểm chuẩn dao động từ 0,18–12,75% đối với EPA, từ 0,03–11,18% đối với DHA, và giảm dần khi nồng độ chất phân tích tăng dần. Ở vùng nồng độ < 100 mg/L, độ chệch > 5% do tín hiệu thấp của chất phân tích thu được từ detector gây ra sai số của phép hồi quy lớn. Ở vùng nồng độ cao, độ chệch giảm rõ rệt khi tín hiệu ghi nhận được ở detector tăng. Mặc dù vậy, các giá trị độ chệch thu được từ nghiên cứu này ở tất cả các mức nồng độ đều nhỏ hơn 15%, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu thẩm định theo hướng dẫn AOAC và ICH.

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

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách thêm chuẩn ở mức nồng độ thấp nhất trên nền mẫu TPBVSK dạng dầu sao cho sắc đồ cho tỷ số tín hiệu/nhiễu (S/N) ≥ 3, và tương ứng với LOQ cho S/N ≥ 10.

Kết quả cho thấy cả EPA và DHA khi thêm chuẩn đến mức 10 mg/kg thì cho giá trị S/N lần lượt là 4,45 và 5,56, đáp ứng yêu cầu ≥ 3. Khi hạ mức thêm chuẩn xuống thì tỉ lệ S/N quá nhỏ. Vì vậy, giá trị LOD được xác nhận ở mức 10 mg/kg, tương ứng với LOQ là 30 mg/kg.

3.2.3. Đánh giá độ đúng và độ chính xác của phương pháp phân tích

Độ chính xác và độ đúng là những thông số quan trọng trong thẩm định phương pháp phân tích, phản ánh mức độ tin cậy của kết quả định lượng. Bảng 3 trình bày độ chính xác và độ đúng của phương pháp phân tích EPA và DHA.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại, độ tái lặp nội bộ và độ đúng của phương pháp xác định EPA và DHA trong TPBVSK

Chỉ tiêu	**Thông số**	**Chất phân tích**		**Yêu cầu***
		EPA	**DHA**	
Độ lặp lại	**Số mẫu lặp (n)**	8	8	
	Hàm lượng trung bình (mg/kg)	1846,9	879,0	
	SD	49,6	26,3	
	RSD (%)	2,68	2,99	< 3,7

Chỉ tiêu	Thông số	Chất phân tích		Yêu cầu*
		EPA	**DHA**	
Độ tái lặp nội bộ	**Số mẫu lặp (n)**	6	6	
	Hàm lượng trung bình (mg/kg)	1826,7	859,2	
	SD_R	72,3	38,3	
	RSD_R (%)	3,96	4,45	< 5,6
Độ đúng	**Mức thêm chuẩn 80% (n = 3)**			
	Độ thu hồi (%)	96,92 ; 97,60 ; 98,50	95,05 ; 95,85 ; 96,10	90–110
	Độ thu hồi trung bình (%)	97,67	95,67	
	Mức thêm chuẩn 100% (n = 3)			
	Độ thu hồi (%)	101,70 ; 103,06; 103,36	98,07 ; 100,42 ; 103,29	90–110
	Độ thu hồi trung bình (%)	102,71	100,59	
	Mức thêm chuẩn 120% (n = 3)			
	Độ thu hồi (%)	102,50 ; 103,51 ; 104,87	95,06 ; 96,28 ; 97,33	90–110
	Giá trị trung bình (%)	103,63	96,22	
	Khoảng thu hồi chung (%)	96,92 – 104,87	95,05 – 103,29	90–110

SD: Độ lệch chuẩn; RSD: Độ lệch chuẩn tương đối; SD_R: Độ lệch chuẩn nội bộ; RSDR: Độ lệch chuẩn tương đối nội bộ

**Giá trị yêu cầu theo AOAC* (AOAC, 2016)

Kết quả trong Bảng 3 cho thấy phương pháp có độ chính xác tốt đối với cả EPA và DHA. Giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) đạt 2,68% đối với EPA và 2,99% đối với DHA, trong khi độ lệch chuẩn tương đối tái lập nội bộ (RSD_R) tương ứng là 3,96% và 4,45%. Các giá trị này đều thấp hơn giới hạn cho phép theo hướng dẫn AOAC, chứng tỏ phương pháp có độ ổn định và khả năng tái lập tốt.

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua thí nghiệm thêm chuẩn trên nền TPBVSK dạng dầu ở ba mức nồng độ 80%, 100% và 120%. Kết quả cho thấy độ thu hồi của EPA dao động từ 96,92–104,87%, của DHA đạt từ 95,05–103,29%. Các giá trị thu hồi đều nằm trong khoảng chấp nhận đối với phương pháp phân tích định lượng theo AOAC (AOAC, 2016).

Kết quả phân tích mẫu nguyên liệu đã được cấp chứng chỉ PronovaPure® 360:240 EE được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Đánh giá hiệu quả quá trình tạo dẫn xuất bằng mẫu chuẩn chứng nhận

Thông số	Giá trị chứng nhận (%)	Giá trị phân tích (%)	Tỷ lệ so với CRM (%)
EPA	35,8	37,51	104,5
DHA	22,5	22,89	101,7

Kết quả cho thấy hàm lượng EPA và DHA xác định được sai lệch không đáng kể so với giá trị chứng nhận, với tỷ lệ thu hồi tương ứng là 104,5% và 101,7%. Điều này chứng tỏ quy trình tạo dẫn xuất bằng dung dịch CH_3ONa/MeOH 5% đạt hiệu quả cao và không gây ảnh hưởng đáng kể đến việc định lượng EPA và DHA trong nền mẫu khảo sát.

Nói cách khác, các kết quả về độ đúng và độ chính xác cho thấy phương pháp đáp ứng yêu cầu thẩm định và có thể áp dụng để định lượng EPA và DHA trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.2.4. So sánh hiệu năng của phương pháp với một số công bố trước đây

Hiệu năng của quy trình đề xuất được so sánh với một số phương pháp đã công bố và được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. So sánh hiệu năng của phương pháp đề xuất với một số phương pháp xác định EPA và DHA đã công bố

Nghiên cứu	Nền mẫu	Kỹ thuật và tạo dẫn xuất	Khoảng tuyến tính	LOD	Độ thu hồi (%)	Thời gian phân tích
(Yi, 2014)	Viên nang dầu cá	GC-MS; thủy phân và methyl hóa bằng BF_3/MeOH	-	EPA: 0,08 ng; DHA: 0,21 ng	EPA: 100,50; DHA: 103,83	Khoảng 40 phút
(Brotas, 2020)	Viên nang dầu cá	GC-MS; tạo dẫn xuất methyl ester	5–100 mg/g	EPA: 0,16 mg/g; DHA: 0,18 mg/g	>76	38 phút
(Alinafiah, 2021)	Cá sống và cá đã chế biến	GC-FID; FAME, cột HP-88	Không công bố dưới dạng một khoảng		DHA ở mức thấp: 90,58–97,02	45,87 phút

Nghiên cứu	Nền mẫu	Kỹ thuật và tạo dẫn xuất	Khoảng tuyến tính	LOD	Độ thu hồi (%)	Thời gian phân tích
			chung cho cả hai chất			
Nghiên cứu này	TPBVSK dạng dầu	GC-MS-SIM; CH_3ONa/MeOH 5%; nội chuẩn C19:0	10–1000 mg/L	EPA và DHA: 10 mg/kg	EPA: 96,92–104,87; DHA: 95,05–103,29; CRM: 104,5 và 101,7	Khoảng 42 phút

Các phương pháp đã công bố sử dụng cả GC-FID và GC-MS, với nền mẫu và cách biểu thị độ nhạy khác nhau. Phương pháp của Yi và cộng sự (2014) cho LOD rất thấp khi biểu thị theo lượng chất đưa vào cột, nhưng giá trị này không thể so sánh trực tiếp với LOD tính theo mg/kg mẫu. Trong khi đó, Brotas và cộng sự (2020) báo cáo LOD ở mức 0,16–0,18 mg/g, tương đương 160–180 mg/kg, cao hơn giá trị 10 mg/kg của nghiên cứu này; tuy nhiên, sự khác biệt còn phụ thuộc vào quy trình xử lý mẫu, hệ số pha loãng, chế độ thu nhận dữ liệu và cách xác định LOD. Phương pháp GC-FID của Alinafiah và cộng sự (2021) có thời gian phân tích 45,87 phút, tương đương với thời gian 42 phút của quy trình đề xuất, nhưng khả năng xác nhận chất chủ yếu dựa vào thời gian lưu.

Phương pháp đề xuất có khoảng tuyến tính rộng 10–1000 mg/L, độ thu hồi 95,05–104,87% và các giá trị RSD, RSDR đáp ứng yêu cầu AOAC. Kết quả phân tích mẫu chuẩn chứng nhận cũng đạt 104,5% đối với EPA và 101,7% đối với DHA, góp phần xác nhận hiệu quả của quá trình tạo dẫn xuất và độ đúng của toàn bộ quy trình. Mặc dù thời gian phân tích chưa ngắn hơn đáng kể so với một số công bố trước đây, ưu điểm chính của phương pháp là khả năng định lượng đồng thời EPA và DHA bằng nội chuẩn trên nền TPBVSK dạng dầu, có độ chọn lọc phù hợp và có thể triển khai trong điều kiện phòng kiểm nghiệm tại Việt Nam.

3.3. Áp dụng quy trình phân tích đã xây dựng để định lượng EPA và DHA trong một số mẫu TPBVSK

Phương pháp phân tích sau khi được thẩm định đã được áp dụng để xác định hàm lượng EPA và DHA trong năm mẫu TPBVSK dạng dầu đang lưu hành trên thị trường (đây chỉ là minh họa khả năng áp dụng phương pháp). Kết quả ở Bảng 6 cho thấy hàm lượng EPA và DHA (dạng acid tự do) phân tích được đều khá tương đồng với giá trị công bố trên nhãn sản phẩm. Tỷ lệ hàm lượng EPA so với giá trị công bố dao động từ 91,7% đến 111,6%, DHA đạt từ 87,5% đến 105,0%.

$$C(\text{mg/viên}) = \frac{S_t / S_{nc}}{S_C / S_{nc}} \times \frac{m_c}{m_{th}} \times \frac{ĐPL_{th}}{ĐPL_{ch}} \times C_C \times 100 \times \frac{KLTBviên}{100} \times K$$

Hệ số quy đổi: K_{EPA}: 0,9557;K_{DHA}: 0,9591

Bảng 6. Kết quả phân tích hàm lượng EPA và DHA trong một số mẫu TPBVSK trên thị trường

Mẫu	KLTB Viên (mg/viên)	Hàm lượng phân tích (mg/viên)		Hàm lượng nhãn (mg/viên)		(%) So với hàm lượng nhãn	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
M1	735,8	57,4	240,1	52,5	250,0	109,3	96,4
M2	850,1	74,6	140,0	80,0	160,0	93,9	87,5
M3	853,4	86,6	147,5	80,0	160,0	108,3	92,2
M4	741,7	58,6	252,9	52,5	250,0	111,6	101,2
M5	748,5	1,10	1,89	1,2	1,8	91,7	105,0

Đối với EPA, hai mẫu M2 và M5 có giá trị phân tích được thấp hơn giá trị công bố trên nhãn, trong khi đó các mẫu còn lại phát hiện thấy hàm lượng cao hơn nhãn khoảng từ 8-11%. Đối với DHA, mẫu M1, M2, M3 có hàm lượng đạt 87,5% - 96,4% so với công bố, hai mẫu còn lại có giá trị cao hơn và khá gần với giá trị công bố (lệch 1-5%). Các sai khác có thể liên quan đến biến thiên giữa đơn vị sản phẩm, quy trình sản xuất, bảo quản, lấy mẫu và độ không đảm bảo của phép đo.

Kết quả bước đầu cho thấy quy trình có thể xử lý các mẫu có mức EPA/DHA khác nhau. Tuy nhiên, khảo sát năm mẫu chỉ có ý nghĩa minh họa khả năng áp dụng; cần mở rộng số lượng sản phẩm, nền mẫu và lô sản xuất để đánh giá đầy đủ tính phù hợp của phương pháp trong hậu kiểm.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình định lượng đồng thời EPA và DHA trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng dầu bằng kỹ thuật GC-MS với quy trình xử lý mẫu chiết lặp lại 3 lần và dẫn xuất hóa bằng 5 mL dung dịch CH_3ONa/MeOH 5%. Phương pháp cho độ nhạy cao (LOD 10 mg/kg), tuyến tính tốt trong khoảng 10-1000 mg/L (nền dung môi n-hexane), độ đúng tốt và độ chính xác đạt yêu cầu theo hướng dẫn AOAC và ICH.

Khi áp dụng trên một số mẫu TPBVSK đang lưu hành trên thị trường, phương pháp cho phép xác định đồng thời EPA và DHA với kết quả tương đối phù hợp so với hàm lượng công bố trên nhãn, qua đó chứng minh tính khả thi trong kiểm nghiệm chất

lượng và hậu kiểm sản phẩm. Để mở rộng phạm vi áp dụng của phương pháp, trong thời gian tới, cần tiếp tục đánh giá trên nhiều nhóm nền mẫu khác nhau như dầu vi tảo, dầu nhuyễn thể, sữa bột bổ sung omega-3 và thực phẩm tăng cường vi chất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là sản phẩm của đề tài Khoa học và Công nghệ mã số ĐHKH2026D-004, tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Alinafiah, S. M., Azlan, A., Ismail, A., & Rashid, N. K. M. A. (2021). Method development and validation for omega-3 fatty acids (Dha and epa) in fish using gas chromatography with flame ionization detection (gc-fid). Molecules, 26(21). https://doi.org/10.3390/molecules26216592

[2]. AOAC. (2016). Standard Method Performance Requirements Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In AOAC Official Methods of Analysis.

[3]. Assadourian, J. N., Peterson, E. D., McDonald, S. A., Gupta, A., & Navar, A. M. (2023). Health Claims and Doses of Fish Oil Supplements in the US. JAMA Cardiology, 8(10), 984–988. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2023.2424

[4]. Banović Fuentes, J., Beara, I., & Torović, L. (2025). Regulatory Compliance of Health Claims on Omega-3 Fatty Acid Food Supplements. Foods, 14(1). https://doi.org/10.3390/foods14010067

[5]. Bich, H. T., Anh, N. V. T., Quan, P. M., Hue, P. T., Tung, N. Q., Toan, T. Q., Thuy, N. T., Toan, H. T., & Thanh, L. T. (2017). Xây Dựng Quy Trình Ứng Dụng Enzym Và Các Kĩ Thuật Phối Hợp Để Thu Nhận Dầu Cá Giàu Các Axit Béo Không No Đa Nối Đôi Epa, Dpa, Dha Từ Phụ Phẩm Chế Biến Cá Ngừ Vây Vàng Thunnus Albacares. Vietnam Journal of Marine Science and Technology, 17(1), 95–102. https://doi.org/10.15625/1859-3097/17/1/9054

[6]. Brotas, M. S. C., Carvalho, G. A., & Pereira, P. A. P. (2020). Determination, through derivatization and GC-MS analysis, of Omega-3 and Omega-6 fatty acids in fish oil capsules sold in Salvador, Bahia. Journal of the Brazilian Chemical Society, 31(3), 447–455. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190203

[7]. Đinh, T. T. T., Nguyễn, T. D., & Đỗ, T. T. (2025). Tách Chiết Omega-3 Từ Phụ Phẩm Chế Biến Cá. Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ Nhiệt Đới, 09, 86–94. https://doi.org/10.58334/vrtc.jtst.n09.11

[8]. Djuricic, I., & Calder, P. C. (2024). Omega-3 (n-3) Fatty Acid-Statin Interaction: Evidence for a Novel Therapeutic Strategy for Atherosclerotic Cardiovascular Disease. Nutrients, 16(7). https://doi.org/10.3390/nu16070962

[9]. Hilton, J. E., Setzer, W. N., Satyal, P., Poudel, A., Ashcroft, S., & Satyal, R. (2024). The Quantitation of EPA and DHA in Fish Oil Dietary Supplements Sold in the United States. Dietetics, 3(4), 609–618. https://doi.org/10.3390/dietetics3040041

[10]. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2024). Validation of analytical procedures – ICH Q2(R2). European Pharmaceutical Review, 29(1), 5. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf

[11]. Irnawati, I., Windarsih, A., Putri, A. R., Fadzillah, N. A., Azmi, A. A., Kusbandari, A., & Rohman, A. (2024). The use of spectroscopic methods in combination with multivariate data analysis for determination of omega fatty acids: A review. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 14(1), 45–53. https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.139258

[12]. Makay, K., Griehl, C., Schilling, S., & Grewe, C. (2025). Omega-3 Source Matters: Comparative Lipid Signatures and Quantitative Distribution of EPA/DHA Across Marine Resources. Marine Drugs, 24(1), 4. https://doi.org/10.3390/md24010004

[13]. Patted, P. G., Masareddy, R. S., Patil, A. S., Kanabargi, R. R., & Bhat, C. T. (2024). Omega-3 fatty acids: a comprehensive scientific review of their sources, functions and health benefits. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 10(1). https://doi.org/10.1186/s43094-024-00667-5

[14]. Reily, N. M., Tang, S., Negrone, A., Gan, D. Z. Q., Sheanoda, V., & Christensen, H. (2023). Omega-3 supplements in the prevention and treatment of youth depression and anxiety symptoms: A scoping review. PLoS ONE, 18(4 April), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284057

[15]. Rohman, A., Irnawati, Windarsih, A., Dika, F. R. O., Indrayanto, G., Fadzillah, N. A., Riyanto, S., & Kartini Nor Bakar, A. (2023). Application of Chromatographic and Spectroscopic-Based Methods for Analysis of Omega-3 (ω-3 FAs) and Omega-6 (ω-6 FAs) Fatty Acids in Marine Natural Products. Molecules, 328, 5524.

[16]. Vũ, Đ. C., Hoàng, T. N., Nguyễn, T. H., Lê, T. N., & Trần, T. T. L. (2024). Omega-3, 6, 9 từ phế phẩm cá basa: Kỹ thuật chiết xuất xanh. Tạp Chí Y Dược Huế, 14(5), 69. https://doi.org/10.34071/jmp.2024.5.8

[17]. Yan, D., Ye, S., He, Y., Wang, S., Xiao, Y., Xiang, X., Deng, M., Luo, W., Chen, X., & Wang, X. (2023). Fatty acids and lipid mediators in inflammatory bowel disease: from mechanism to treatment. Frontiers in Immunology, 14(October), 1–21. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1286667

[18]. Yi, T., Li, S. M., Fan, J. Y., Fan, L. L., Zhang, Z. F., Luo, P., Zhang, X. J., Wang, J. G., Zhu, L., Zhao, Z. Z., & Chen, H. B. (2014). Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS. Lipids in Health and Disease, 13(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-190

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL PROCEDURE FOR THE DETERMINATION OF EPA (EICOSAPENTAENOIC ACID) AND DHA (DOCOSAHEXAENOIC ACID)IN DIETARY SUPPLEMENTS USING GC-MS TECHNIQUE

Huynh Thi Tuy Ngoc[1,2], Nguyen Thi Anh Tram,
Le Thi My Dieu[1], Nguyen Dang Giang Chau[1,*], Nguyen Hai Phong[1]

[1]Faculty of Chemistry, University of Sciences, Hue University

[2] Drug, cosmetic and food quality control Center of Hue City

* Email: chaundg@hueuni.edu.vn

ABSTRACT

A method for the simultaneous determination of Eicosapentaenoic acid (EPA) and Docosahexaenoic acid (DHA) in oil-based dietary supplements using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) was developed and validated. The analytical and sample preparation conditions were optimized, including the use of a DB-5MS column for chromatographic separation, three repeated extractions of real samples, and derivatization with 5 mL of a 5% CH_3ONa/MeOH solution. Over the concentration range of 10–1000 mg/L for both EPA and DHA, the method showed good linearity, with a coefficient of determination (R^2) of 0.9999. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 10 mg/kg and 30 mg/kg, respectively. The relative standard deviation (RSD) was below 3.0%, the intermediate precision (RSDR) was below 4.5%, and recoveries ranged from 95.05% to 104.87%, meeting AOAC requirements. The method was applied to five commercial oil-based dietary supplement samples, and the results showed that the analyzed EPA and DHA contents differed only slightly from the values declared on the product labels.

Keywords: EPA and DHA; dietary supplements; gas chromatography–mass spectrometry; esterification.