

Xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe lưu hành trên thị trường Hà Nội

Nguyễn Thành Đạt^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Hạnh¹, Đàm Thị Thu¹,
Nguyễn Văn Hiếu¹, Lại Thị Phương¹, Dương Thế Bắc¹

¹Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 25/07/2022; Ngày chấp nhận đăng: 19/9/2022)

Tóm tắt

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector DAD (HPLC-DAD) đã được thẩm định đầy đủ theo yêu cầu của AOAC để xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa Đông trùng hạ thảo. Điều kiện sắc ký sử dụng cột InertSustain C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μm), với pha động gồm methanol - nước rửa giải theo chương trình gradient trong 35 phút, detector DAD ở bước sóng 260 nm, tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Nghiên cứu đã xác định được hàm lượng adenosin và cordycepin trong 24 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa Đông trùng hạ thảo ở các dạng bào chế khác nhau, lưu hành trên thị trường Hà Nội. Kết quả cho thấy hàm lượng hai chất nghiên cứu trong các mẫu có sự dao động lớn (adenosin từ 28,19 - 956,3 μg/g với dạng rắn, dầu, từ 1,26 - 25,31 μg/mL với dạng lỏng; cordycepin từ 5,25 - 1287 μg/g với dạng rắn, dầu, từ 1,91 - 32,38 μg/mL với dạng lỏng), đặc biệt phát hiện 1 mẫu không có cả 2 chất adenosin và cordycepin, 1 mẫu không có adenosin.

Từ khóa: Adenosin, Cordycepin, Đông trùng hạ thảo, TPBVSK, HPLC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps*) là một trong những loại dược liệu nổi tiếng, được sử dụng rộng rãi trên thế giới, cho đến nay đã có khoảng 540 loài được báo cáo [1,2]. Trong đó *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) và *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) được dùng chủ yếu trong các sản phẩm TPBVSK, loại sản phẩm lưu hành rộng rãi trên thị trường và có giá thành cao. Hiện nay trên thị trường Hà Nội lưu hành số lượng lớn các sản phẩm TPBVSK chứa Đông trùng hạ thảo tự nhiên và nấm Đông trùng hạ thảo nuôi cấy nhân tạo. Do đó việc xác định chất lượng các sản phẩm này là cần thiết, nhằm bảo vệ quyền lợi của người tiêu dùng.

Phần dược tính của Đông trùng hạ thảo (ĐTHT) đã được nghiên cứu là do các chất chiết xuất từ nấm *Cordyceps*, trong đó adenosin và cordycepin là hai thành phần đã được chứng minh có nhiều tác dụng dược lý và được dùng để đánh giá chất lượng ĐTHT [1-3]. Đã có nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước xác định hàm lượng adenosin, cordycepin trong

* Điện thoại: 0979797562

Email: CNLname@yahoo.com

các nền mẫu là dược liệu ĐTHT với phương pháp sử dụng trong các nghiên cứu chủ yếu là HPLC-DAD [3-6] hoặc LC/MS-MS [7]. Tuy nhiên với đối tượng TPBVSK có rất ít nghiên cứu và chỉ mới được thực hiện trên dạng rắn, dạng lỏng [8] hoặc chỉ mới xác định hàm lượng adenosin [9], chưa có nghiên cứu nào xác định đồng thời adenosin và cordycepin ở cả 3 nền mẫu rắn, lỏng, dầu của TPBVSK. Để có thể áp dụng trong kiểm tra chất lượng mẫu thử thì phương pháp phải được đánh giá sự phù hợp với đối tượng thử nghiệm, do đó nghiên cứu này thực hiện với mục tiêu thẩm định phương pháp phân tích và xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong chế phẩm TPBVSK chứa ĐTHT với các dạng bào chế khác nhau lưu hành trên thị trường Hà Nội bằng HPLC-DAD.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng của nghiên cứu này gồm chất phân tích là adenosin, cordycepin và các mẫu TPBVSK chứa Đông trùng hạ thảo ở các dạng bào chế khác nhau.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn: Adenosin hàm lượng 98,9 % $C_{10}H_{13}N_5O_4$, lô CFS202101 và cordycepin hàm lượng 99,2 % $C_{10}H_{13}N_5O_3$, lô CFS202101 của ChemFaces - Trung Quốc.

- Dung môi: Methanol, đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

- Hóa chất: Ethylendiamintetraacetic acid disodium (dinatri edetat) đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

2.3. Thiết bị và dụng cụ

Đã được hiệu chuẩn theo qui định của ISO/IEC 17025 và GLP.

- Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu - LC - 2030C 3D Plus (Nhật) với detector DAD.

- Cột sắc ký: Cột InertSustain C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μ m) (GL Sciences - Nhật Bản).

- Cân phân tích độ chính xác 0,01 mg, bể rung siêu âm và các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm.

2.4. Mẫu nghiên cứu

- *Mẫu nền*: 03 mẫu tự tạo được chế tạo theo công thức mẫu thử nghiệm (dạng rắn, dạng lỏng, dạng dầu) nhưng không chứa chất phân tích.

- *Mẫu thử trong thẩm định phương pháp*:

Mẫu TPBVSK chứa Đông trùng hạ thảo lưu hành trên thị trường gồm:

+ Mẫu dạng rắn: TPBVSK Viên nang cứng thành phần chứa bột Đông trùng hạ thảo 150 mg, isoflavan, collagen, ginkgo biloba, magnesi stearat, tinh bột, talc, natri benzoat vừa đủ 1 viên.

+ Mẫu dạng lỏng: TPBVSK Dung dịch uống thành phần chứa: Chiết xuất Đông trùng hạ thảo 400 mg, collagen, vitamin B5, vitamin B3, vitamin E, sorbitol, kali sorbat, acid citric, nước vừa đủ 1000 mL.

+ Mẫu dạng dầu: TPBVSK Viên nang mềm thành phần chứa: Chiết xuất Đông trùng hạ thảo 300 mg, gelatin, sáp ong trắng, sorbitol, dầu cọ, lecithin, nipagin, nipasol vừa đủ 1 viên.

- Mẫu tự tạo: Thêm chuẩn vào các mẫu nền ở nồng độ phù hợp theo yêu cầu nghiên cứu.

- *Mẫu thử trong nghiên cứu mẫu thực*: 24 mẫu TPBVSK chứa Đông trùng hạ thảo ở các dạng bào chế khác nhau, lưu hành trên thị trường Hà Nội.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Phương pháp phân tích

Qua tham khảo một số tài liệu [3, 5, 8] nhóm nghiên cứu đã khảo sát một số điều kiện phân tích, lựa chọn chương trình pha động cho phù hợp. Tham khảo quy trình xử lý mẫu đối với mẫu dạng lỏng của tài liệu [8]. Khảo sát quy trình xử lý mẫu trên mẫu thực đối với mẫu dạng rắn (chiết hồi lưu với methanol 50 %, chiết siêu âm với methanol 50 %, chiết siêu âm với acid phosphoric 0,1 %, số lần chiết). Khảo sát quy trình xử lý mẫu với mẫu dạng dầu trên mẫu thực (chiết hồi lưu với methanol 50 %, chiết siêu âm với methanol 50 % kết hợp loại béo bằng n-hexan, chiết siêu âm với methanol 50 % kết hợp loại béo, loại ảnh hưởng của nền mẫu và phân tán mẫu bằng dinatri edetat) từ đó lựa chọn được điều kiện phân tích như sau:

2.5.1.1. Điều kiện sắc ký:

- *Cột sắc ký*: Cột InertSustain C18 (250 × 4,6 mm; 5µm).
- *Pha động*: Hỗn hợp gồm methanol và nước được phối hợp theo chương trình dung môi dưới đây:

Bảng 1. Chương trình dung môi

<i>Thời gian (phút)</i>	<i>Methanol (% tt/tt)</i>	<i>Nước (% tt/tt)</i>
0 - 2	5 → 10	95 → 90
2 - 5	10 → 20	90 → 80
5 - 25	20 → 50	80 → 50
25 - 27	50	50
27 - 29	50 → 20	50 → 80
30 - 35	5	95

- *Tốc độ dòng*: 1,0 mL/phút.
- *Detector*: DAD bước sóng 260 nm.
- *Thể tích tiêm*: 20 µl.

2.5.1.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn, thử

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Hòa tan riêng biệt chuẩn adenosin và chuẩn cordycepin trong methanol để được dung dịch gốc có nồng độ chính xác khoảng 1 mg/mL. Từ các dung dịch chuẩn gốc pha dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa nồng độ mỗi chất khoảng 0,2; 1; 10; 20; 30; 40; 50 µg/mL.

- *Mẫu thử dạng rắn*: Đồng nhất mẫu thử của 20 đơn vị thành bột mịn, cân chính xác khoảng 2 g bột chế phẩm, cho vào bình định mức 50 mL, thêm 35 mL methanol 50 %, rung siêu âm ở khoảng 50°C trong 30 phút. Để nguội, thêm methanol 50 % vừa đủ đến vạch, lắc đều. Ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút, gạn lấy dịch trong, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- Mẫu thử dạng lỏng: Đồng nhất mẫu thử của 5 đơn vị, hút chính xác 10,0 mL chế phẩm, cho vào bình định mức 50 mL, thêm 35 mL methanol 50 %, rung siêu âm ở khoảng 50°C trong 30 phút. Để nguội, thêm methanol 50 % vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- Mẫu thử dạng dầu: Đồng nhất dịch mẫu thử của 20 đơn vị, cân chính xác khoảng 2 g dịch chế phẩm, cho vào bình định mức 50 mL, thêm 1 g dinatri edetat, lắc cho phân tán mẫu, thêm 35 mL methanol 50 %, rung siêu âm ở khoảng 50°C trong 30 phút. Để nguội, thêm methanol 50 % vừa đủ đến vạch, lắc đều. Ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 5 phút, gạn lấy dịch trong, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

2.5.2. Thảm định phương pháp phân tích

Theo hướng dẫn của AOAC 2019 [9] với các tiêu chí gồm độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác (độ đúng và độ chụm).

2.5.3. Xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu TPBVSK

Định lượng adenosin và cordycepin trong 24 mẫu TPBVSK chứa ĐTHT ở các dạng bào chế khác nhau, lưu hành trên thị trường Hà Nội bao gồm 11 mẫu lấy và 13 mẫu gửi theo quy trình đã nghiên cứu, từ đó đưa ra đánh giá về hàm lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu.

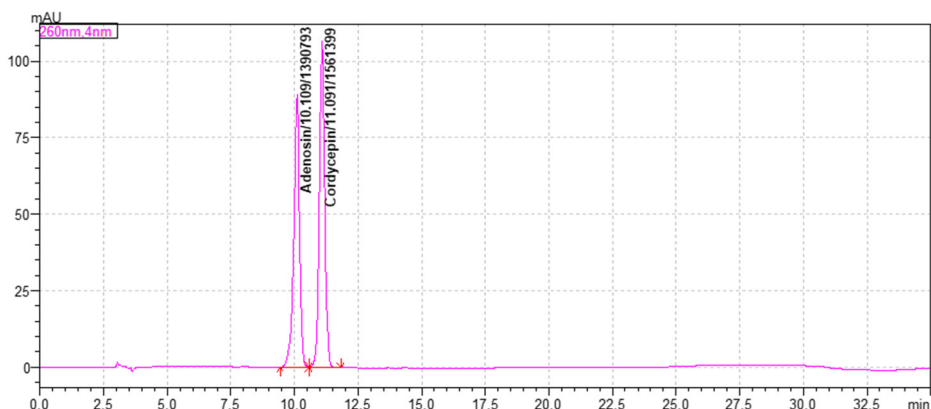
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thảm định phương pháp phân tích

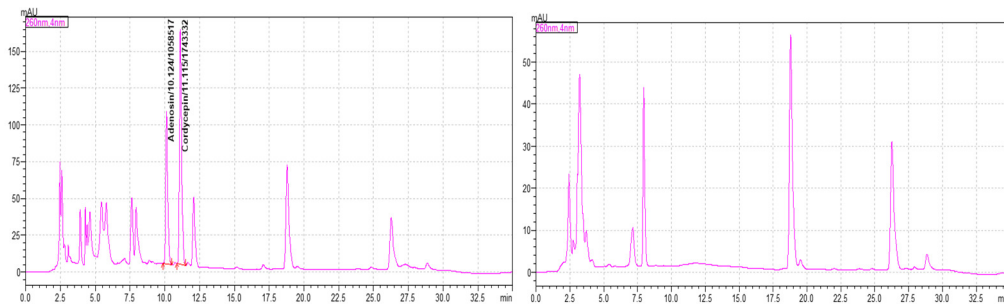
Tiến hành thảm định phương pháp theo hướng dẫn về thảm định phương pháp hóa học [10-11].

3.1.1. Độ chọn lọc

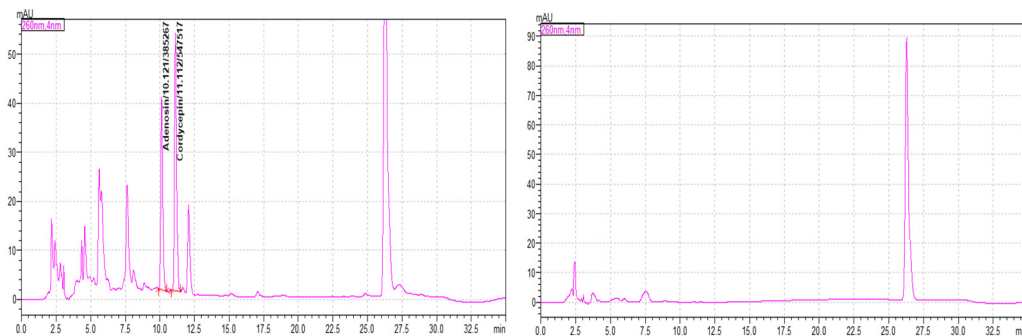
Phân tích mẫu nền, mẫu chuẩn hỗn hợp 20 $\mu\text{g/mL}$, mẫu thử dạng rắn, dạng lỏng, dạng dầu được chuẩn bị theo quy trình phân tích. Kết quả cho thấy: Trên sắc ký đồ của các mẫu nền, tại thời gian lưu của adenosin (10,1 phút) và cordycepin (11,1 phút) không có pic, trên sắc ký đồ của các mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với các pic trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Phổ UV của các chất phân tích trên sắc ký đồ dung dịch thử tương tự các chất trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn với hệ số match $\geq 0,997$. Kết quả được minh họa ở Hình 1, 2, 3, 4.



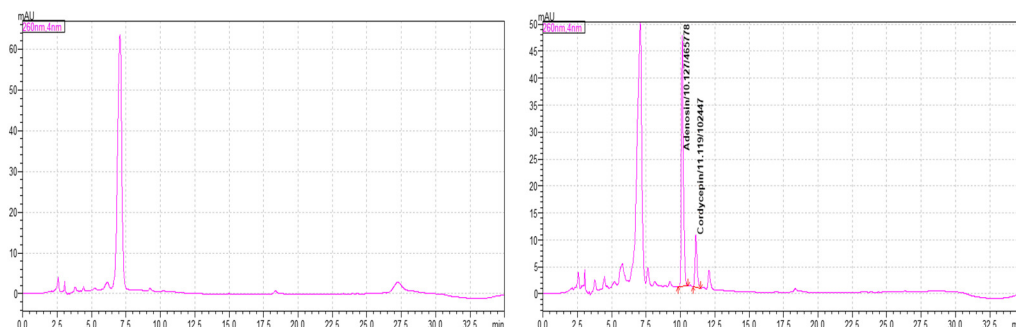
Hình 1. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp adenosin và cordycepin



Hình 2. Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử và mẫu nền dạng dầu



Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử và mẫu nền dạng lỏng



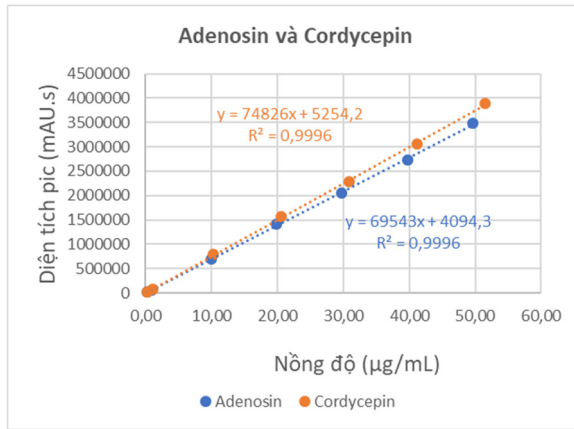
Hình 4. Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử và mẫu nền dạng rắn

3.2.2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Phân tích các mẫu chuẩn hỗn hợp theo quy trình ở mục 2.5.1.2. Xác định sự tương quan giữa nồng độ các chất phân tích có trong mẫu và diện tích pic tương ứng thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp hồi qui tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan này được trình bày ở Bảng 2 và Hình 5.

Bảng 2. Khoảng tuyến tính

Chất phân tích	Khoảng nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Phương trình đường chuẩn	Độ chệch (%)
Adenosin	0,20 - 49,65	$y = 69543x + 4094,3;$ $R^2 = 0,9996$	1,0 - 14,1
Cordycepin	0,21 - 51,50	$y = 74826x + 5254,2;$ $R^2 = 0,9996$	0,9 - 12,8



Hình 5. Đường chuẩn adenosin và cordycepin

Kết quả cho thấy phương pháp có khoảng tuyến tính rộng (0,2 - 50 µg/mL) phù hợp để phân tích hàm lượng adenosin và cordycepin trong các loại mẫu TPBVSK với các mức khác nhau.

3.2.3. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

LOD của phương pháp được xác định dựa vào độ lệch chuẩn của mẫu thử [10]: Chuẩn bị mẫu tự tạo thêm chuẩn vào các mẫu nền để sau khi xử lý mẫu dung dịch phân tích có nồng độ 0,5 µg/mL đối với mỗi chất phân tích. Phân tích mẫu thử 06 lần lặp lại theo quy trình đã xây dựng, tính giá trị trung bình \bar{x} và độ lệch chuẩn SD. Từ đó tính LOD = 3SD. Tính $R = \bar{x} / \text{LOD}$, nếu $4 \leq R \leq 10$ thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy. Kết quả LOD của phương pháp được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. LOD của phương pháp

Chất phân tích	LOD			R
	Rắn (µg/g)	Dầu (µg/g)	Lỏng (µg/mL)	
Adenosin	1,19	1,23	0,21	9,3 - 10,0
Cordycepin	1,94	1,40	0,32	6,0 - 8,3

LOQ của phương pháp được xác định dựa trên độ đúng và độ chụm [11]: Chuẩn bị mẫu tự tạo thêm chuẩn vào các mẫu nền để sau khi xử lý mẫu dung dịch phân tích có nồng độ ở điểm thấp nhất của đường chuẩn (0,2 µg/mL) đối với mỗi chất phân tích. Phân tích mẫu thử 06 lần lặp lại theo quy trình, xác định độ thu hồi và độ lặp (RSD), kết quả nếu đạt yêu cầu theo AOAC ở mức nồng độ tương ứng thì xác nhận 0,2 µg/mL là giá trị LOQ của phương pháp. Kết quả phân tích thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Độ đúng và độ chụm xác định LOQ của phương pháp

Chất phân tích	Độ thu hồi trung bình (%)			RSD (%)		
	Rắn	Dầu	Lỏng	Rắn	Dầu	Lỏng
Adenosin	94,54	87,81	98,66	5,69	5,18	3,39
Cordycepin	100,0	85,13	98,91	5,43	5,11	5,51

Kết quả cho thấy ở mức nồng độ 0,2 µg/mL tương ứng với 5,0 µg/g chế phẩm ở dạng rắn, dạng dầu và 1,0 µg/mL chế phẩm ở dạng lỏng, đạt yêu cầu về độ đúng và độ chụm theo AOAC (độ thu hồi phải đạt từ 80 - 115 %, RSD ≤ 6,0 %). Do đó, lấy LOQ của phương pháp là 5,0 µg/g chế phẩm ở dạng rắn, dạng dầu và 1,0 µg/mL chế phẩm ở dạng lỏng.

3.2.4. Độ chính xác

Độ chính xác của phương pháp được đánh giá thông qua độ chụm và độ đúng.

Độ chụm của phương pháp được tiến hành phân tích trên mẫu thực tế của từng dạng nền mẫu theo quy trình ở mục 2.5.1.2, tính RSD (n = 6) trong ngày và RSD khác ngày tính (n = 12). Kết quả thu được tại Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ chụm

Nền mẫu	n	Adenosin			Cordycepin		
		Hàm lượng (µg/g)	RSD (%)	RSD (%) theo AOAC	Hàm lượng (µg/g)	RSD (%)	RSD (%) theo AOAC
Rắn	n = 6	161,1	1,20	≤ 3	33,73	2,17	≤ 4
	n = 12	160,1	1,30	≤ 6	33,37	2,37	≤ 8
Dầu	n = 6	312,6	1,25	≤ 3	476,8	1,07	≤ 3
	n = 12	311,3	1,29	≤ 6	474,6	1,05	≤ 6
Lỏng	n = 6	24,73	1,29	≤ 4	32,38	1,33	≤ 4
	n = 12	24,52	1,64	≤ 8	32,09	2,01	≤ 8

Độ đúng của phương pháp được đánh giá dựa trên độ thu hồi của mẫu tự tạo, thêm chuẩn hỗn hợp vào các mẫu nền để sau khi xử lý mẫu dung dịch phân tích có nồng độ mỗi chất phân tích khoảng 0,2 µg/mL(LOQ), 5 µg/mL, 20 µg/mL và 40 µg/mL, mỗi mức thực hiện lặp lại 03 lần. Kết quả độ đúng tại mức nồng độ LOQ được thể hiện ở Bảng 4, mục 3.2.3, ở các mức nồng độ còn lại kết quả như ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng

Nền mẫu	Nồng độ phân tích (µg/mL)	Adenosin		Cordycepin		Yêu cầu AOAC	
		Độ thu hồi (%)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)	Độ thu hồi (%)	RSD (%)
Rắn	5	99,54	2,31	94,57	1,27	90 - 108	≤ 3
	20	100,6	0,98	97,84	1,04	90 - 108	≤ 3
	40	99,55	0,91	97,37	0,62	90 - 108	≤ 3
Dầu	5	99,69	2,23	92,93	2,87	90 - 108	≤ 3
	20	101,3	1,27	98,16	1,33	90 - 108	≤ 3
	40	100,7	1,37	96,25	1,26	90 - 108	≤ 3
Lỏng	5	98,13	1,02	92,62	1,97	85 - 110	≤ 4
	20	96,09	1,65	94,21	2,36	85 - 110	≤ 4
	40	100,7	1,10	96,03	1,74	90 - 108	≤ 3

Các kết quả tại Bảng 5 và Bảng 6 cho thấy độ chụm và độ thu hồi của phương pháp đáp ứng yêu cầu của AOAC [10] ở các mức nồng độ tương ứng.

Từ các thực nghiệm độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác cho thấy phương pháp đã xây dựng có đủ độ chọn lọc và độ tin cậy để có thể áp dụng cho phân tích adenosin và cordycepin trong mẫu thực.

3.3. Xác định hàm lượng adenosin và cordycepin trong các mẫu TPBVSK lưu hành trên thị trường Hà Nội

Nghiên cứu được thực hiện theo quy trình phân tích trên 11 mẫu TPBVSK chứa thành phần Đông trùng hạ thảo được lấy tại các nhà thuốc, công ty trên địa bàn thành phố Hà Nội và 13 mẫu gửi do các công ty, cá nhân gửi đến Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Hà Nội, mỗi mẫu thực hiện 03 lần, tính giá trị trung bình. Kết quả được thể hiện ở Bảng 7.

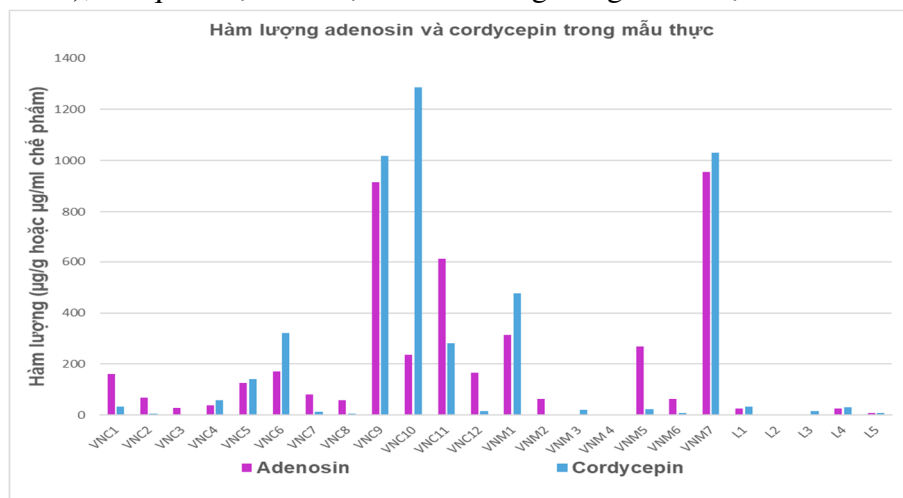
Bảng 7. Kết quả phân tích mẫu thực

STT	Mã hóa mẫu thử	Thành phần ĐTHT ghi nhãn	Hàm lượng trong chế phẩm ($\mu\text{g/g}$ hoặc $\mu\text{g/mL}$) $TB \pm SD, n = 3$	
			Adenosin	Cordycepin
1	VNC1	Bột <i>C.sinensis</i> 150 mg/viên	161,1 \pm 1,93	33,73 \pm 0,73
2	VNC2	Cao khô ĐTHT tương ứng 100 mg dược liệu/viên (Không rõ loài)	68,38 \pm 0,35	5,25 \pm 0,05
3	VNC3	Cao khô tương ứng 500 mg dược liệu <i>C.sinensis</i> /viên	28,19 \pm 0,48	+
4	VNC4	Bột <i>C.sinensis</i> 50 mg/viên	37,76 \pm 0,35	56,92 \pm 0,20
5	VNC5	Bột <i>C.sinensis</i> 50 mg/viên	124,5 \pm 1,86	140,3 \pm 0,46
6	VNC6	Bột <i>C.sinensis</i> 50 mg/viên	170,6 \pm 0,89	320,6 \pm 1,67
7	VNC7	Bột <i>C.militaris</i> 50 mg/viên	80,41 \pm 0,42	13,52 \pm 0,07
8	VNC8	Bột ĐTHT 70mg/viên (Không rõ loài)	57,38 \pm 0,07	6,23 \pm 0,07
9	VNC9	Bột <i>C.militaris</i> 350 mg/viên	915,2 \pm 11,35	1017 \pm 11,19
10	VNC10	Bột ĐTHT 500mg/viên (Không rõ loài)	235,3 \pm 0,54	1287 \pm 2,18
11	VNC11	Bột <i>C.militaris</i> 300 mg/viên	611,2 \pm 0,06	281,2 \pm 0,11
12	VNC12	Cao từ hỗn hợp dược liệu khô chứa ĐTHT tương ứng với 500 mg dược liệu <i>C.sinensis</i> /viên	165,3 \pm 0,03	16,13 \pm 0,08
13	VNM1	Cao khô <i>C.militaris</i> 300 mg/viên	312,6 \pm 3,90	476,8 \pm 5,12
14	VNM2	Bột <i>C.sinensis</i> 12 mg/viên	62,73 \pm 0,40	+
15	VNM 3	Bột <i>C.sinensis</i> 50 mg/viên	-	19,19 \pm 0,31
16	VNM 4	Bột <i>C.sinensis</i> 50 mg/viên	-	-
17	VNM5	Cao <i>C.sinensis</i> 200 mg/viên	268,9 \pm 2,34	23,33 \pm 0,04

STT	Mã hóa mẫu thử	Thành phần ĐTHT ghi nhãn	Hàm lượng trong chế phẩm ($\mu\text{g/g}$ hoặc $\mu\text{g/mL}$) $TB \pm SD, n = 3$	
			Adenosin	Cordycepin
18	VNM6	Bột <i>C.sinensis</i> 50mg/viên	63,53 \pm 1,21	6,89 \pm 0,07
19	VNM7	Cao khô ĐTHT tương ứng 100 mg dược liệu/viên (Không rõ loài)	956,2 \pm 16,26	1031 \pm 10,83
20	L1	Chiết xuất <i>C.sinensis</i> 400mg/1000 mL	24,73 \pm 0,32	32,38 \pm 0,43
21	L2	<i>C.militaris</i> 300mg/180 mL	1,26 \pm 0,025	1,91 \pm 0,008
22	L3	Không rõ thành phần công thức	1,49 \pm 0,008	14,35 \pm 0,34
23	L4	<i>C.militaris</i> ngâm rượu (Không rõ công thức)	25,31 \pm 0,06	31,06 \pm 0,02
24	L5	Chiết xuất <i>C.militaris</i> 500mg/50 mL	8,15 \pm 0,002	8,78 \pm 0,004

Ghi chú: “VNC”: Viên nang cứng; “VNM”: Viên nang mềm; “L”: Lỏng; “-”: Dưới LOD; “+”: Phát hiện được nhưng dưới LOQ.

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu trên thị trường Hà Nội sử dụng nguồn nguyên liệu chủ yếu là hai loài *C.sinensis* và *C.militaris* dạng bột dược liệu hoặc cao dược liệu. Thành phần *C.sinensis* trong mẫu từ 12 mg dược liệu trong 1 đơn vị đóng gói nhỏ nhất đến 150 mg/đơn vị, thông dụng nhất là 50 mg/đơn vị và khoảng 200 - 400 mg đối với dạng cao. Ở loài *C.militaris* thường được cho vào công thức với lượng nhiều hơn từ 50 mg đến 350 mg/đơn vị ở dạng dược liệu và 300 - 500 mg đối với dạng cao. Một số mẫu không công bố lượng cao ĐTHT mà chỉ công bố lượng dược liệu tương ứng (VNC2, VNC3, VNC12, VNM 7). Một số mẫu thành phần chỉ ghi ĐTHT mà không nêu rõ loài (VNC2, VNC8, VNC 10, VNM7, L5). Hàm lượng adenosin và cordycepin cũng có sự khác biệt giữa các mẫu, mặc dù có nhiều mẫu công thức công bố thành phần ĐTHT như nhau (VNC4, VNC5, VNC6, VNM3, VNM4), kết quả được thể hiện chi tiết trong Bảng 7 và được mô tả ở Hình 5.



Hình 5. Biểu đồ hàm lượng adenosin và cordycepin trong mẫu thực

Các mẫu lấy trên thị trường (VNC1, VNC2, VNC3, VNC4, VNC6, VNC7, VNM2, VNM5, VNM6, L2, L4), có hàm lượng adenosin nằm trong khoảng 28,19 - 268,9 $\mu\text{g/g}$ với dạng rắn, dầu và 1,26 - 25,31 $\mu\text{g/mL}$ với dạng lỏng; Hàm lượng cordycepin nằm trong khoảng 5,25 - 320,6 $\mu\text{g/g}$ với dạng rắn, dầu và 1,91 - 31,06 $\mu\text{g/mL}$ với dạng lỏng, có 01 mẫu hàm lượng cordycepin dưới LOQ (VNM2). Các mẫu gửi, hàm lượng adenosin nằm trong khoảng 57,38 - 956,3 $\mu\text{g/g}$ với dạng rắn, dầu và 1,49 - 24,73 $\mu\text{g/mL}$ với dạng lỏng; cordycepin nằm trong khoảng 6,23 - 1287 $\mu\text{g/g}$ với dạng rắn, dầu và 8,78 - 32,38 $\mu\text{g/mL}$ với dạng lỏng, có 01 mẫu không phát hiện được adenosin (VNM3) và 01 mẫu không phát hiện được cả adenosin và cordycepin (VNM4). Các mẫu không phát hiện đã được kiểm tra lại bằng cách thêm chuẩn vào thử, chiết theo quy trình phân tích và tính độ thu hồi để đảm bảo tính chính xác của kết quả phân tích.

Kết quả phân tích trên mẫu thực cho thấy hàm lượng adenosin và cordycepin có sự khác biệt rất lớn giữa các mẫu: Adenosin từ 28,19 - 956,3 $\mu\text{g/g}$ với dạng rắn, dầu, từ 1,26 - 25,31 $\mu\text{g/mL}$ với dạng lỏng; cordycepin từ 5,25 - 1287 $\mu\text{g/g}$ với dạng rắn, dầu, từ 1,91 - 32,38 $\mu\text{g/mL}$ với dạng lỏng), đặc biệt phát hiện 1 mẫu không có cả 2 chất adenosin và cordycepin, 1 mẫu không có adenosin. Do vậy cần kiểm soát hàm lượng 2 hợp chất này với các sản phẩm chứa ĐTHT.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thẩm định phương pháp HPLC-DAD định lượng adenosin và cordycepin trong TPBVSK các chỉ tiêu độ chọn lọc, khoảng nồng độ tuyến tính, LOD, LOQ, độ chụm và độ đúng đáp ứng các yêu cầu của AOAC. Phương pháp đã áp dụng thành công trong xác định hàm lượng adenosin và cordycepin 30 mẫu TPBVSK chứa Đông trùng hạ thảo lưu hành trên thị trường Hà Nội. Những kết quả của nghiên cứu là tài liệu để các cơ sở sản xuất tham khảo trong công bố sản phẩm và tự đảm bảo chất lượng sản phẩm chứa Đông trùng hạ thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Dong, S. Guo, W. Wang, and X. Liu, "Cordyceps industry in China," *Mycology*, vol 6, no. 2, pp. 121-129, 2015.
- [2]. Science and Technology Information Center, "Technology trend analysis report, thematic: Cordyceps - Uses, production and commercial trends, Ho Chi Minh City, 2014".
- [3]. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, *Pharmacopoeia Commission of PRC*, vol. Ia, pp. 115, pp. 573, 2020.
- [4]. N. T. T. Ha, N. N. Trai, and N. T. Thao, "Study on extraction process and determination of Adenosin content in high ethanol of cordyceps (*Cordyceps militaris*) by HPLC-PDA," *Industry and trade magazine*, vol. 9, pp. 370-376, 2020.

- [5]. L. Huang, Q. Li, Y. Chen, X. Wang, and Xuanwei Zhou, "Determination and analysis of cordycepin and adenosin in the products of *Cordyceps spp.*", *African Journal of Microbiology Research*, vol. 3, no. 12, pp. 957-961, 2009.
- [6]. C. Y. Chang, M. Y. Lue, and T. M. Pan, "Determination of adenosin, cordycepin and ergosterol contents in cultivated *Antrodia camphorata* by HPLC method," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 13, no. 4, pp. 338-342, 2005.
- [7]. L. F. Huang, F. Q. Guo, Y. Z. Liang, and B. M. Chen, "Determination of adenosin and cordycepin in *Cordyceps sinensis* and *C. militaris* with HPLC-ESI-MS," *China Journal of Chinese Materia Medica*, vol. 29, no. 8, pp. 762-764, 2004.
- [8]. N. T. Q. Mai, "Developing a method for qualitative and quantitative simultaneous Adenosine and Cordycepin in preparations containing *Cordyceps* by high performance liquid chromatography method.," Master's thesis, Hanoi University of Pharmacy, 2015.
- [9]. L. T. Thuy, "Optimizing method to determine adenosine in some foods Cordyceps function by high performance liquid chromatography (HPLC)," Master's thesis, Hanoi University of Science and Technology, 2014.
- [10]. AOAC - Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals - Part I: AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2019.
- [11]. T. C. Son, *Method validation and uncertainty assessment in chemical analysis*, Science and technics publishing house, 2021.

Determination of adenosine and cordycepin in dietary supplements circulating on the Hanoi market

Nguyen Thanh Đạt^{1*}, Nguyen Thi Hong Hanh¹, Dam Thi Thu¹
Nguyen Van Hieu¹, Lai Thi Phuong¹, Duong The Bac¹

¹ Hanoi Drugs, Cosmetics, Food Quality Control Center

Abstract

High performance liquid chromatography with diode-array detector (HPLC-DAD) has been fully validated according to AOAC requirements for the determination of adenosine and cordycepin in dietary supplements containing *Cordyceps*. Chromatographic conditions using InertSustain C18 (250 mm × 4.6 mm; 5 μm) column, with gradient program composed of methanol and water eluted in 35 min, diode-array detector at 260 nm, flow rate of 1.0 mL/min. The study has determined the content of adenosine and cordycepin in 24 dietary supplement samples containing *Cordyceps* in different dosage forms circulating on the Hanoi market. The results showed that the contents of the two substances studied in the samples fluctuated greatly (adenosine from 28.19 - 956.3 μg/g with solid and oily form, from 1.26 - 25.31 μg/mL with the liquid form; cordycepin from 5.25 - 1287 μg/g with solid and oily form, from 1.91 - 32.38 μg/mL with liquid form), especially one sample was detected without both adenosine and cordycepin, one sample did not have adenosine.

Keywords: Adenosine, Cordycepin, *Cordyceps*, dietary supplements, HPLC.