

Xác định glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang (HPLC-FLD)

Phạm Thị Mai Hương¹, Trương Thị Mỹ Hạnh², Đặng Thị Huyền My²,
Vũ Thị Trang³, Cao Công Khánh³, Hoàng Quốc Anh², Mai Thị Ngọc Anh³,
Nguyễn Thị Minh Thu², Nguyễn Quang Huy^{2,4*}, Nguyễn Thị Ánh Hương^{2†}

¹Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, Việt Nam

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

³Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

⁴Trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 26/07/2021; Ngày chấp nhận đăng: 25/02/2022)

Tóm tắt

Phương pháp sắc ký lỏng sử dụng detector huỳnh quang (HPLC-FLD) với các ưu điểm như đơn giản, nhanh và chọn lọc đã được nghiên cứu nhằm xác định glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng cách dẫn xuất với 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). Điều kiện phân tích gồm: cột C18 (150 mm × 4,6 mm × 5 μm); pha động theo chế độ gradient có thành phần gồm nước và acetonitrile với tốc độ dòng 1,0 mL/phút; detector FLD ở bước sóng kích thích (λ_{ex}) 265 nm và bước sóng phát xạ (λ_{em}) 315 nm. Các mẫu phân tích là thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) dạng viên nang cứng hoặc viên nén được xử lý bằng cách nghiền nhỏ, trộn đều và chiết siêu âm với nước, tạo dẫn xuất trước khi phân tích bằng HPLC-FLD. Phương pháp đã được đánh giá về độ đặc hiệu, độ tuyến tính của đường chuẩn, độ chính xác và độ chụm đạt yêu cầu theo AOAC. Trong đó, đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ glucosamine từ 6,7 đến 135 ppm cho hệ số tương quan tuyến tính tốt ($R^2 = 0,9988$). Độ lặp và độ tái lặp nội bộ được đánh giá qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) tương ứng trong khoảng 2,54 đến 3,23 % (n = 6) và 2,24 đến 3,07 %, (n = 4), cho thấy phương pháp có độ chụm tốt. Độ đúng được đánh giá qua hiệu suất thu hồi đạt trong khoảng 98,0 đến 101,5 % và qua chương trình thử nghiệm thành thạo liên phòng H21.11 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia tổ chức với kết quả đạt (z-score là $-0,89 < 2$). Phương pháp đã được áp dụng để xác định hàm lượng glucosamine dưới dạng các loại muối khác nhau trong 15 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe với kết quả dao động trong khoảng từ 87,8 mg/viên đến 1088 mg/viên.

Từ khóa: Glucosamine, HPLC-FLD, thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

*Điện thoại: 0944100039

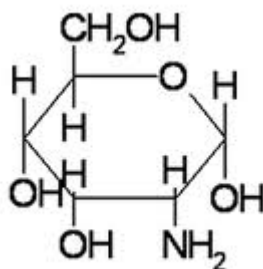
Email: huydhydncs@gmail.com

†Điện thoại: 0946593969

Email: nguyenthianhuong@hus.edu.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Glucosamine (Hình 1) là một amino monosaccharide được tìm thấy trong cơ thể người, là một thành phần giúp tổng hợp glycosaminoglycan cấu tạo nên mô sụn trong cơ thể và các chất khác liên quan đến tạo gân, dây chằng, lớp dịch nhầy ở khớp [1]. Cơ thể có thể tự tổng hợp glucosamine nhưng khả năng này sẽ giảm đi khi tuổi ngày càng cao. Glucosamine được dung nạp tốt, hầu như không gây tác dụng phụ kể cả khi dùng lâu dài, được coi là một giải pháp an toàn và hiệu quả cho người mắc bệnh thoái hóa khớp [1-3].

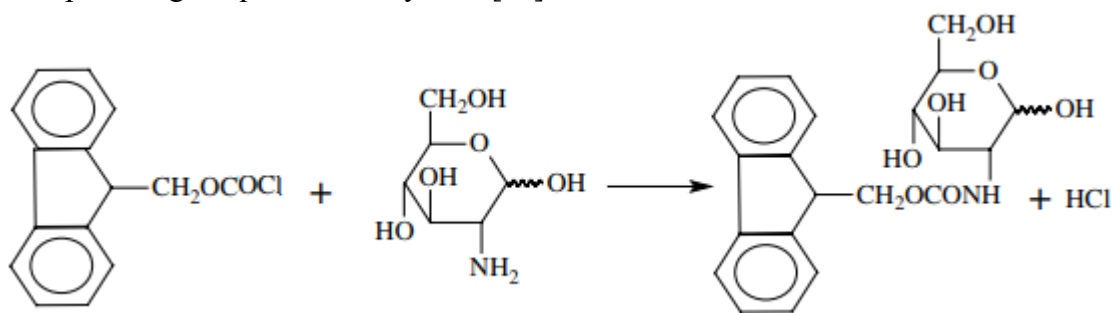


Hình 1. Công thức cấu tạo của glucosamine

Glucosamine trên thị trường được sử dụng trong hỗ trợ điều trị thoái hóa khớp gồm có ba dạng chính: glucosamine sulfate, glucosamine hydrochloride và *N*-acetyl glucosamine. Cho đến nay, nhiều thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện để chứng minh tác dụng của glucosamine trong điều trị viêm xương khớp, đặc biệt khi so sánh với nhóm thuốc chống viêm NSAIDs (không chứa steroid và corticosteroid), glucosamine có khả năng cải thiện tốt tình trạng viêm và đau khớp, nhưng không kèm theo các tác dụng không mong muốn [1-3]. Việc bổ sung glucosamine không chỉ tái cung cấp nguyên liệu cho quá trình tổng hợp và phục hồi glycosaminoglycan ở sụn khớp mà còn là nguồn cung cấp dinh dưỡng cho sụn khớp, tạo dịch nhầy quanh khớp, làm tăng khả năng bôi trơn và đệm chống va đập của sụn khớp. Nhờ đó, glucosamine không chỉ làm giảm đau tốt mà còn hỗ trợ điều trị nguyên nhân của viêm xương khớp [3]. Để có hiệu quả, liều dùng glucosamine thường trong khoảng 1250 mg - 1500 mg/ngày.

Glucosamine có thể được bào chế dưới dạng thuốc hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Trong đó, các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe thường được ưa chuộng sử dụng theo xu hướng hiện nay do có nguồn gốc tự nhiên. Để đáp ứng nhu cầu này, nhiều loại thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa glucosamine đã xuất hiện ngày càng nhiều trên thị trường. Tuy nhiên, một số nhà sản xuất vì lợi nhuận đã làm nhái hoặc làm giả các sản phẩm của các thương hiệu uy tín, gian lận về hàm lượng trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe, có thể gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của người sử dụng. Do đó, việc xác định hàm lượng glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe là cần thiết, nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm và quyền lợi người tiêu dùng.

Hiện nay, nhiều phương pháp đã được sử dụng để xác định glucosamine trong nguyên liệu, dược phẩm và thực phẩm bảo vệ sức khỏe bao gồm: sensor huỳnh quang [4], điện di mao quản [5-7] và phổ biến nhất là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với một số loại detector khác nhau [8-11]. Trong đó, phương pháp HPLC thường được kết hợp với việc dẫn xuất trước cột bằng 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl), *N*-9-fluorenylmethoxycarbonyloxy succinimide (FMOC-Su), phenylisothiocyanate (PITC) hoặc 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Các nghiên cứu chủ yếu sử dụng phương pháp HPLC kết hợp với detector UV-Vis. Trong đó, FMOC-Su được sử dụng trong phương pháp chính thống của AOAC [8, 9]. Trên cơ sở này và tham khảo tài liệu [12], cùng với các khảo sát thực tế, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp detector huỳnh quang (FLD) đã được thẩm định và áp dụng để xác định glucosamine trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (dạng viên nang cứng hoặc viên nén) sử dụng chất dẫn xuất 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). Trong đó, glucosamine phản ứng với FMOC-Cl ở dạng base tự do (Hình 2), nên các dạng hoạt chất khác không ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng và quá trình xử lý mẫu [12].



Hình 2. Phản ứng tạo dẫn xuất glucosamine với FMOC-Cl

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 glucosamine và mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) dạng viên nang cứng hoặc viên nén.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất, chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết dùng cho HPLC, bao gồm chất chuẩn: Glucosamine hydrochloride (độ tinh khiết > 99 %) (Lot # BCCB2605) được cung cấp từ hãng Sigma (Mỹ). Dung dịch chuẩn gốc 1000 ppm: cân chính xác khoảng 0,1 g chuẩn Glucosamine HCl, hòa tan bằng nước khử ion vào bình định mức 100 mL và định mức đến vạch. Dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị bằng cách pha loãng với tỷ lệ thích hợp từ chuẩn gốc để đường chuẩn nằm trong khoảng 1-100 ppm.

Dung môi và hóa chất khác gồm: 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) (độ tinh khiết > 99 %) được cung cấp từ hãng Sigma (Mỹ), acetonitrile (ACN), acid boric, natri hydroxide, acid hydrochloric được cung cấp bởi hãng Merck (Đức). Nước khử ion được điều chế bởi hệ thống Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Mỹ).

2.3. Thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Thiết bị

Nghiên cứu sử dụng hệ thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối detector FLD (Hình 3) sử dụng cột C18 Symmertry (150 mm × 4,6 mm × 5 μm) của Waters và ODS-3 100 Å (150 × 3,2 mm × 5 μm) của Phenomenex. Một số thiết bị phụ trợ khác bao gồm: bể rung siêu âm, máy ly tâm Hermle Z200A (Mỹ); cân phân tích Mettler Toledo XS105 (có độ chính xác 0,1 mg) và các thiết bị, dụng cụ phục vụ xử lý mẫu khác.



Hình 3. Hệ thiết bị HPLC-FLD sử dụng trong nghiên cứu

2.3.2. Thông tin mẫu và xử lý mẫu

Mẫu trắng là mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng viên nang cứng không chứa glucosamine.

Mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe trong chương trình thử nghiệm thành thạo H21.11 được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia.

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [8-9] và khảo sát thực tế, quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau: mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng viên nang cứng được tháo vỏ nang, lấy phần bột bên trong, nghiền mịn (nếu cần); mẫu dạng viên nén được nghiền mịn, trộn đều thành dạng bột đồng nhất. Sau đó, cân chính xác trên cân phân tích khoảng 0,5 - 1,0 g mẫu dạng bột đã được đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 30 mL nước khử ion, rung siêu âm 30 phút. Ly tâm gạn dịch vào bình định mức 50 mL. Chiết lần 2 bằng 15 mL nước khử ion. Gộp dịch chiết và định mức đến vạch (50 mL) bằng nước khử ion, lắc đều.

Glucosamine là chất không tự phát xạ huỳnh quang, do đó việc tạo dẫn xuất là cần thiết để phân tích glucosamine bằng phương pháp HPLC với detector FLD. Quá trình tạo dẫn xuất glucosamine với FMOC-Cl [12] được thực hiện như sau: dùng pipet hút chính xác 200 μ L dung dịch mẫu vào lọ 1,8 mL, thêm 400 μ L đệm borate (pH = 8,0) và 400 μ L dẫn xuất FMOC-Cl 500 ppm, lắc 10 giây, để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút [12], lọc qua màng lọc 0,2 μ m, pha loãng (nếu cần) trước khi phân tích trên thiết bị HPLC-FLD.

2.3.3. *Đánh giá phương pháp*

Tiền hành đánh giá phương pháp đã tối ưu thông qua các thông số cơ bản gồm: độ đặc hiệu; đường chuẩn; giới hạn phát hiện và định lượng; độ chụm thông qua độ lặp lại, độ tái lập nội bộ và độ đúng thông qua độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định của AOAC [13].

Ngoài ra, phương pháp cũng được đánh giá thông qua chương trình “Thử nghiệm thành thạo xác định hàm lượng Glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe”, mã số H21.11 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia tổ chức tháng 10 năm 2021 với 15 phòng thí nghiệm tham gia.

2.3.4. *Phương pháp xử lý số liệu*

Xử lý các số liệu thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010. Hàm lượng glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe được tính bằng phần mềm Empower trên thiết bị HPLC-FLD.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. *Lựa chọn điều kiện phân tích glucosamine bằng HPLC-FLD*

Glucosamine có hai đồng phân quang học tự nhiên (α và β) có thể chuyển hóa lẫn nhau trong dung môi nước, do đó sau khi dẫn xuất với FMOC-Cl và phân tích bằng thiết bị HPLC-FLD sẽ cho kết quả hai pic trên sắc đồ tương ứng với đồng phân α và β (Hình 4).

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [8, 9, 12], hai cột tách được lựa chọn để khảo là ODS-3 100 Å (tham khảo phương pháp chính thống của AOAC [9]) và C18 Symmetry (tham khảo tài liệu [12]). Kết quả cho thấy, khả năng tách của hai cột là tương tự nhau. Tuy nhiên, cùng với thời gian, lượng FMOC-Cl dư sẽ gây bẩn cột ODS-3 100 Å và ảnh hưởng nhiều đến khả năng tách của hai pic glucosamine khi phân tích sắc ký. Trong khi đó, cột C18 Symmetry cho kết quả tách tốt (Hình 4) và không bị ảnh hưởng theo thời gian sử dụng. Do đó, cột tách C18 Symmetry được lựa chọn trong nghiên cứu này.

Tương tự cột tách, pha động cũng được khảo sát trên cơ sở tham khảo phương pháp chính thống của AOAC [9] với hệ pha động 1: H₂O-acid trifluoroacetic (TFA) (kênh A) và acetonitrile (ACN) (kênh B) và hệ pha động 2 (tham khảo tài liệu [12]): H₂O (kênh A) và ACN (kênh B). Kết quả cho thấy, hệ pha động 2 sử dụng H₂O (kênh A) và ACN (kênh B) cho hiệu quả phân tách tốt tương tự hệ pha động 1, đồng thời giúp bảo vệ cột và thiết bị

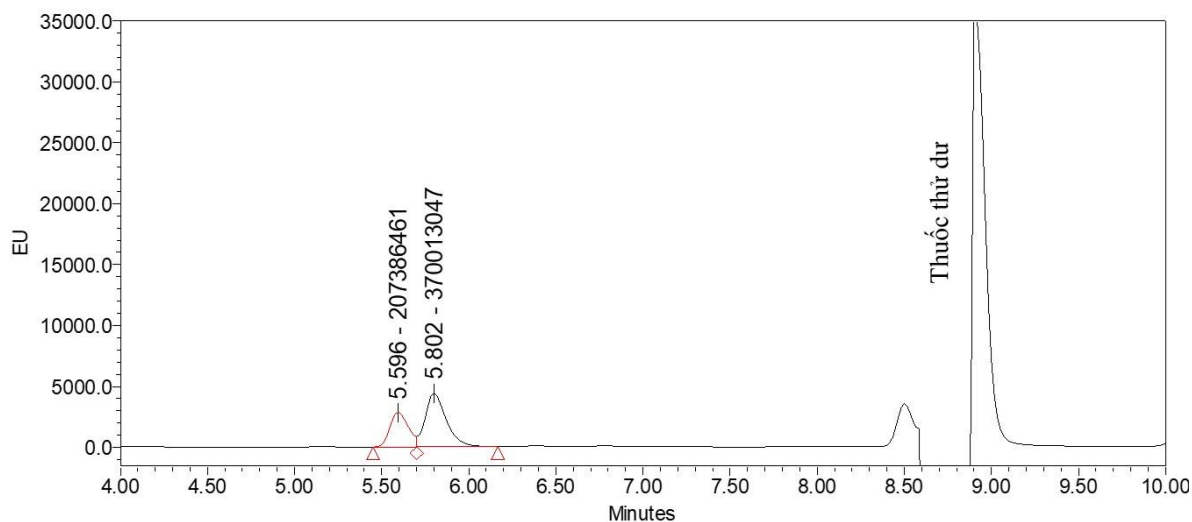
phân tích tốt hơn, thân thiện hơn với môi trường và tiết kiệm chi phí. Do đó, hệ pha động 2 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Từ đó, các điều kiện sắc ký để phân tích glucosamine bằng phương pháp HPLC-FLD được lựa chọn như sau: sử dụng cột tách C18 Symmertry (150 mm × 4,6 mm × 5 μm), pha động theo chế độ gradient (Bảng 1) gồm kênh A là H₂O và kênh B là ACN với tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích bơm mẫu 20 μL, detector FLD ở bước sóng kích thích (λ_{ex}) 265 nm và bước sóng phát xạ (λ_{em}) 315 nm.

Bảng 1. Chương trình gradient xác định glucosamine bằng HPLC-FLD

Thời gian (phút)	A (%)	B (%)
0,00	70	30
6,00	10	90
8,00	10	90
8,01	70	30
13,00	70	30

Với điều kiện phân tích đã lựa chọn, sắc đồ phân tích dung dịch chuẩn glucosamine 40,5 ppm được thể hiện trong Hình 4.

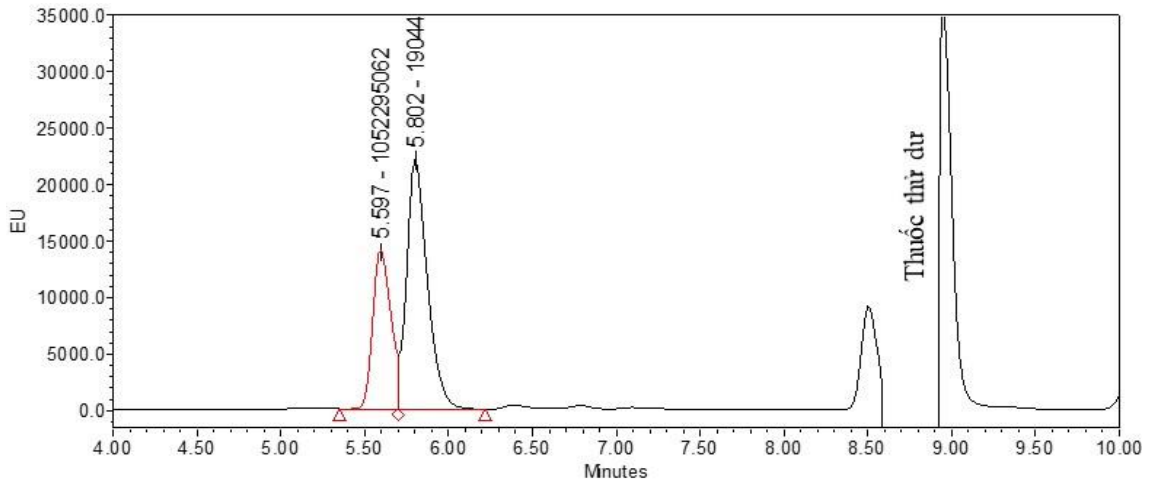


Hình 4. Sắc đồ phân tích dung dịch chuẩn glucosamine ở điều kiện sắc ký lựa chọn

Kết quả trên sắc đồ ở Hình 4 cũng cho thấy, hai pic tương ứng với hai đồng phân α và β của glucosamine có thời gian lưu là 5,596 và 5,802 phút, tách riêng biệt với chất dẫn xuất dư Fmoc-Cl. Từ đó, điều kiện phân tích bằng phương pháp HPLC-FLD đã lựa chọn có thể áp dụng để xác định glucosamine.

3.2. Xử lý mẫu

Với quy trình xử lý mẫu nêu ở mục 2.3.2, sắc đồ phân tích glucosamine trong nền mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe được thể hiện ở Hình 5.



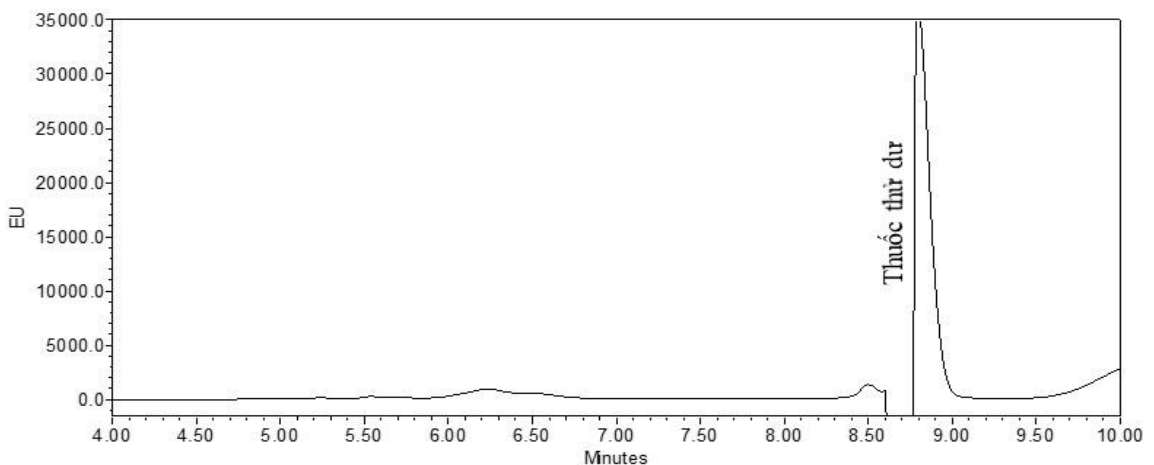
Hình 5. Sắc đồ phân tích mẫu TPBVSK chứa glucosamine

Từ sắc đồ ở Hình 5 cho thấy, sắc đồ phân tích glucosamine trong mẫu thực tế tương tự như sắc đồ của dung dịch chuẩn, hai pic đồng phân quang học tự nhiên (α và β) của glucosamine xuất hiện rõ ràng ở các thời gian lưu 5,597 và 5,802 phút, tách riêng biệt với chất dẫn xuất dư FMOC-Cl, không xuất hiện các tín hiệu lạ và tín hiệu nhiễu. Như vậy, quy trình xử lý mẫu và dẫn xuất này có thể sử dụng để phân tích hàm lượng glucosamine trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.3. Đánh giá phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Chất chuẩn, mẫu trắng và mẫu TPBVSK chứa glucosamine được tiến hành dẫn xuất theo quy trình đã được lựa chọn và phân tích trên thiết bị HPLC-FLD.



Hình 6. Sắc đồ phân tích mẫu trắng

Kết quả cho thấy, sắc đồ phân tích chuẩn có hai pic tách biệt là hai pic đồng phân tự nhiên dạng α và β của glucosamine (Hình 4) tương ứng ở các thời gian lưu 5,596 và 5,802. Sắc đồ phân tích mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của chất chuẩn (Hình 6) trong khoảng từ 4 đến 6 phút, mà chỉ xuất hiện pic của chất dẫn xuất dư. Trong khi đó, mẫu chứa glucosamine cho sắc đồ tương tự sắc đồ chuẩn, chất phân tích trùng thời gian lưu với chất chuẩn tại 5,597 và 5,802 (Hình 5). Như vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu tốt, phù hợp để xác định glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.3.2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Khoảng tuyến tính được khảo sát trong vùng nồng độ glucosamine hydrochloride 8,1 đến 405 ppm. Kết quả xác định được khoảng tuyến tính giữa tổng diện tích hai pic (dạng α , β) và nồng độ của glucosamine hydrochloride là từ 8,1 đến 162 ppm (tương ứng với nồng độ glucosamine trong khoảng 6,7 đến 135 ppm). Từ đó, đường chuẩn 5 điểm xác định glucosamine được xây dựng trong khoảng nồng độ này cho phương trình hồi quy là $y = 31671x - 41347$ với hệ số tương quan R^2 là 0,9988. Kết quả cho thấy, giữa diện tích pic và nồng độ glucosamine có mối tương quan tuyến tính tốt.

3.3.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện được xác định trên cơ sở phân tích lặp lại 10 lần mẫu thêm chuẩn ở mức nồng độ glucosamine hydrochloride 3,2 ppm, từ đó tính được độ lệch chuẩn SD và xác định được giới hạn phát hiện (LOD) là 0,81 ppm glucosamine hydrochloride, tương ứng với nồng độ glucosamine là 0,67 ppm trên chuẩn và 0,67 mg/g trên mẫu. Giới hạn định lượng (LOQ) tính được là 2,7 ppm đối với glucosamine hydrochloride và tương ứng với glucosamine là 2,2 ppm trên chuẩn và 2,2 mg/g trên mẫu.

3.3.4. Độ chụm và độ đúng

Độ chụm của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại ($n = 6$) và độ tái lập nội bộ ($n = 4$) (thực hiện bởi hai kỹ thuật viên khác nhau) khi xác định hàm lượng glucosamine trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) dạng viên nang cứng và viên nén. Kết quả độ lặp và độ tái lập nội bộ đánh giá qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) tương ứng trong khoảng 2,54 đến 3,23 % và 2,42 đến 3,07 % (Bảng 2, 3), đáp ứng yêu cầu của AOAC [13].

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp

Nền mẫu	Lần thí nghiệm	Khối lượng cân (g)	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng trung bình (mg/g)	RSD (%)
Viên nang cứng	1	0,0697	11,21	11,43	2,54
	2	0,0660	11,48		
	3	0,0571	11,94		
	4	0,0725	11,48		
	5	0,0515	11,11		
	6	0,0635	11,37		

Nền mẫu	Lần thí nghiệm	Khối lượng cân (g)	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng trung bình (mg/g)	RSD (%)
Viên nén	1	0,0705	65,30	64,78	2,69
	2	0,0504	66,78		
	3	0,0511	66,70		
	4	0,0604	63,12		
	5	0,0576	64,12		
	6	0,0705	62,71		
Viên nang cứng	1	0,0689	97,07	96,27	3,23
	2	0,0585	99,02		
	3	0,0697	91,56		
	4	0,0542	93,33		
	5	0,0616	98,99		
	6	0,0785	97,63		

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ tái lập nội bộ thực hiện bởi hai kỹ thuật viên khác nhau

Nền mẫu	Kỹ thuật viên	Lần thí nghiệm	Khối lượng cân (g)	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng trung bình (mg/g)	RSD (%)
Viên nang cứng	KTV 1	1	0,0529	16,31	16,09	2,42
		2	0,0471	15,96		
		3	0,0624	15,35		
		4	0,0766	16,42		
	KTV 2	1	0,0614	15,87		
		2	0,0615	16,64		
		3	0,0458	16,06		
		4	0,0519	16,09		
Viên nang cứng	KTV 1	1	0,0604	55,89	54,84	3,07
		2	0,0526	56,58		
		3	0,0714	54,60		
		4	0,0617	56,39		
	KTV 2	1	0,0844	51,87		
		2	0,0727	54,38		
		3	0,0798	55,95		
		4	0,0784	53,09		
Viên nén	KTV 1	1	0,0616	92,22	96,50	2,94
		2	0,0528	99,28		
		3	0,0608	94,44		
		4	0,0825	93,45		
	KTV 2	1	0,0642	97,75		
		2	0,0765	98,27		
		3	0,0649	100,0		
		4	0,0641	96,58		

Độ đúng được đánh giá thông qua độ thu hồi xác định bằng cách thêm chuẩn glucosamine hydrochloride vào nền mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng viên nén chứa glucosamine hydrochloride 114,3 mg/g ở ba mức hàm lượng 4,05 mg, 8,10 mg và 16,20 mg, tại mỗi mức nồng độ tiến hành phân tích lặp lại 6 lần. Kết quả hiệu suất thu hồi đạt được trong khoảng từ 98,0 đến 101,5 % (Bảng 4), cho thấy phương pháp có độ đúng đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [13].

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ thu hồi

Mức thêm	Lần thí nghiệm	Khối lượng cân (mg)	Lượng thêm chuẩn (mg)	Hàm lượng phân tích được (mg/g)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hiệu suất thu hồi trung bình (%)
1	1	0,0758	4,05	167,0	98,6	99,5
	2	0,0639	4,05	177,5	99,8	
	3	0,058	4,05	184,8	101,0	
	4	0,0559	4,05	186,9	100,2	
	5	0,0598	4,05	180,7	98,0	
	6	0,0581	4,05	183,8	99,6	
2	1	0,0548	8,10	264,4	101,5	99,6
	2	0,0788	8,10	217,4	100,3	
	3	0,0571	8,10	253,9	98,4	
	4	0,0617	8,10	243,4	98,3	
	5	0,0649	8,10	240,0	100,7	
	6	0,0554	8,10	258,0	98,3	
3	1	0,0718	16,20	337,3	98,8	100,1
	2	0,0688	16,20	347,7	99,1	
	3	0,0655	16,20	365,4	101,5	
	4	0,0743	16,20	335,3	101,4	
	5	0,0799	16,20	320,2	101,5	
	6	0,0773	16,20	319,8	98,0	

Ngoài độ lặp, tái lặp nội bộ, độ thu hồi, phương pháp cũng đã được đánh giá khi tham gia chương trình “Thử nghiệm thành thạo xác định hàm lượng Glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe”, mã số H21.11 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia tổ chức tháng 10 năm 2021 với 15 phòng thí nghiệm tham gia. Kết quả, phương pháp cho kết quả đạt với giá trị z-score là - 0,89 ($z < 2$). Điều này góp phần khẳng định độ chính xác của phương pháp đáp ứng yêu cầu, có thể sử dụng để phân tích hàm lượng glucosamine trong mẫu thực tế.

3.4. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Trên cơ sở đánh giá đạt yêu cầu của AOAC, phương pháp đã được áp dụng để phân tích 15 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Trong đó, các dạng của glucosamine gồm: glucosamine (Glu.), glucosamine sulphate (Glu. Sul.), glucosamine sulphate 2 NaCl (Glu. Sul. 2NaCl), glucosamine sulphate 2KCl (Glu. Sul. 2KCl). Các sản phẩm TPBVSK thường bào chế ở dạng muối nên kết quả sẽ được quy ra hàm lượng glucosamine. Kết quả thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng các dạng glucosamine trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe

<i>Tên mẫu</i>	<i>Dạng mẫu</i>	<i>Dạng hoạt chất</i>	<i>Hàm lượng công bố (mg/viên)</i>	<i>Hàm lượng phân tích được (mg/viên)</i>	<i>Sai khác (%)</i>
<i>Mẫu 1</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	750	742	- 1,1
<i>Mẫu 2</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu. Sul. 2NaCl	450	397	- 11,8
<i>Mẫu 3</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu. Sul.	500	369	- 26,2
<i>Mẫu 4</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	750	677	- 9,7
<i>Mẫu 5</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2KCl	750	637	- 15,1
<i>Mẫu 6</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu.	341	379	+ 11,1
<i>Mẫu 7</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu.	415	473	+ 14,0
<i>Mẫu 8</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu. Sul. 2NaCl	300	274	- 8,7
<i>Mẫu 9</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	750	734	- 2,1
<i>Mẫu 10</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu. Sul. 2NaCl	500	429	- 14,2
<i>Mẫu 11</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	1100	1088	- 1,1
<i>Mẫu 12</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	750	818	+ 9,1
<i>Mẫu 13</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	750	616	- 17,9
<i>Mẫu 14</i>	<i>Viên nang cứng</i>	Glu.	100	87,8	- 12,2
<i>Mẫu 15</i>	<i>Viên nén</i>	Glu. Sul. 2NaCl	500	590	+ 18,0

Kết quả phân tích trong Bảng 5 cho thấy, hàm lượng các dạng glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe được tìm thấy với hàm lượng dao động trong khoảng từ 87,8 mg/viên đến 1088 mg/viên, tùy thuộc vào loại sản phẩm. So với công bố trên nhãn, hàm lượng các dạng glucosamine phân tích được có sự sai khác trong khoảng từ -26,2 % đến +18,0 %.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc xác định hàm lượng glucosamine trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp detector FLD. Quy trình phân tích khá nhanh và đơn giản. Kết quả thẩm định phương pháp về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, đường chuẩn, độ chụm và độ đúng cho thấy đáp ứng các yêu cầu của AOAC. Với kết quả đạt khi tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo liên phòng do Viện Kiểm nghiệm an toàn thực phẩm quốc gia tổ chức, quy trình đã được áp dụng để xác định hàm lượng các dạng glucosamine trong 15 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe với sai khác so với nhãn công bố trong khoảng từ -26,2 % đến +18,0 %. Điều này cho thấy quy trình phân tích hiệu quả, có tiềm năng áp dụng để xác định glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

LỜI CẢM ƠN

Học viên cao học Đặng Thị Huyền My được tài trợ bởi [Nhà tài trợ] thuộc Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2021.ThS56.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. W. Anderson, R. J. Nicolosi, and J. F. Borzelleca, "Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, no. 2, pp. 187-201, 2005.
- [2]. J. Y. Reginster, R. Deroisy, L. C. Rovati, R. L. Lee, E. Lejeune, O. Bruyere, G. Giacovelli, Y. Henrotin, J. E. Dacre and C. Gossett, "Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial," *The Lancet*, vol. 357, no. 9252, pp. 251-256, 2001.
- [3]. R. Muniyappa, R. J. Karne, G. Hall, S. K. Crandon, J. A. Bronstein, M. R. Ver, G. L. Hortin and M. J. Quon, "Oral Glucosamine for 6 Weeks at Standard Doses Does Not Cause or Worsen Insulin Resistance or Endothelial Dysfunction in Lean or Obese Subjects," *Diabetes*, vol. 55, no. 11, pp. 3142-3150, 2006.

- [4]. K. Vongnam, C. Muangnoi, P. Rojsitthisak, M. Sukwattanasinitt and P. Rashatasakhon, "A highly selective turn-on fluorescent sensor for glucosamine from amidoquinoline-naphthalimide dyads," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 86, pp. 472-476, 2016.
- [5]. E. Václavíková and F. Kvasnička, "Isotachophoretic determination of glucosamine and chondroitin sulphate in dietary supplements," *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 31, pp. 55-65, 2013.
- [6]. P. Chaisuwan, T. Kongprasertsak, A. Sangcakul, N. W. Smith, D. Nachapricha, P. Wilairat and K. Uraisin, "Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamine determination by CE-C⁴D method," *Journal of Chromatography B*, vol. 879, no. 23, pp. 2185-2188, 2011.
- [7]. S. Akamatsu and T. Mitsuhashi, "Development of a simple capillary electrophoretic determination of glucosamine in nutritional supplements using in-capillary derivatisation with *o*-phthalaldehyde," *Food Chemistry*, vol. 130, no. 4, pp. 1137-1141, 2012.
- [8]. J. Z. Zhou, T. Waszkuc and F. Mohammed, "Determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization: collaborative study," *Journal of AOAC International*, vol. 88, no. 4, pp. 1048-58, 2005.
- [9]. AOAC Official Method 2005.01, *Glucosamine in Raw Materials and Dietary Supplements Containing Glucosamine Sulfate and/or Glucosamine Hydrochloride. High-Performance Liquid Chromatography with FMOC-Su Derivatization. First Action*, 2005.
- [10]. Y. Shao, R. Alluri, M. Mummert, U. Koetter and S. Lech, "A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 35, no. 3, pp. 625-631, 2004.
- [11]. Nguyễn Trung Dũng, Lê Thị Dung, Vũ Thị Kim Oanh, Vũ Thị Trang, "Xác định Glucosamin trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với detector tán xạ bay hơi (HPLC-ELDS)," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, số 52, tr. 87-93, 2014.
- [12]. Xiaolan Zhu, "Determination of Glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography" *Carbohydrate Research*, vol. 340, pp. 1732-1738, 2005.
- [13]. AOAC, "Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements," *AOAC Official Methods of Analysis*, 9, 2012.

Determination of glucosamine in functional food samples by high performance liquid chromatography (HPLC-FLD)

Pham Thi Mai Huong¹, Truong Thi My Hanh², Dang Thi Huyen My²,
Vu Thi Trang³, Cao Cong Khanh³, Hoang Quoc Anh², Mai Thi Ngoc Anh³,
Nguyen Thi Minh Thu², Nguyen Quang Huy^{2,4}, Nguyen Thi Anh Huong²

¹*Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry, Hanoi, Vietnam*

²*Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam*

³*National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam*

⁴*University of Medicine and Pharmacy, Thai Nguyen University, Thai Nguyen, Vietnam*

Abstract

A simple, rapid and specific method using high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD) was developed for quantification of glucosamine in supplements after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). The chromatographic separation was achieved on a C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm × 5 μm) using a gradient mobile phase containing acetonitrile and water at a flow rate of 1.0 mL/min. The FLD detector was operated at excitation and emission wavelengths of 265 and 315 nm, respectively. The analytical method was validated for specificity, linearity, accuracy, and precision. The detector response for glucosamine was linear over the selected concentration range from 6.7 to 135 ppm with a correlation coefficient of 0.9988. The repeatability (RSD, n = 6) and reproducibility (RSD, n = 4) were from 2.54 to 3.23 % and from 2.24 to 3.07 %, respectively. The recovery was between 98.0 and 101.5 %. In addition, we also joined the interlaboratory proficiency testing program (code: H21.11) organized by the National Institute of Food Control with good result (z-score value was -0.89 < 2). The method was successfully applied for the analysis of glucosamine in 15 supplement samples.

Keywords: *Glucosamine, HPLC-FLD, supplements.*