

Nghiên cứu xác định đồng thời kẽm và gluconat trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp CE-C⁴D

Bùi Quốc Bình¹, Phạm Gia Bách¹, Lưu Thị Huyền Trang², Vũ Thị Nhật Lệ²,
Lữ Thị Minh Hiền², Vũ Anh Phương³, Đỗ Thị Trang³, Nguyễn Thị Ngân³,
Nguyễn Quang Huy⁴, Nguyễn Việt Trụ¹, Hoàng Quốc Anh¹,
Phạm Thị Ngọc Mai¹, Vũ Thị Trang^{2*}, Nguyễn Thị Ánh Hoàng^{1†}

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

²Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Chống độc, Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội, Việt Nam

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

(Ngày đến tòa soạn: 26/05/2023; Ngày chấp nhận đăng: 05/07/2023)

Tóm tắt

Các thực phẩm bảo vệ sức khỏe bổ sung vi chất cho cơ thể, như các nguyên tố kẽm (Zn), maggesi (Mg)... dưới các dạng muối dễ hấp thu như gluconat, sterat, lactat... ngày càng trở nên phổ biến. Tuy nhiên, một số loại tá dược (ví dụ các dạng muối vô cơ như kẽm sulfat, maggesi sulfat...) có chứa các nguyên tố này cũng thường được sử dụng trong quá trình bào chế. Vì vậy, nếu sử dụng các phương pháp phân tích tổng hàm lượng kim loại sẽ không đánh giá được chính xác hàm lượng các vi chất ở dạng muối dễ hấp thu, đặt ra yêu cầu phải phân tích đồng thời cả vi chất và các gốc muối để đánh giá đúng dạng muối bổ sung vào sản phẩm. Trong nghiên cứu này, phương pháp điện di mao quản với detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) được sử dụng để xác định đồng thời hàm lượng Zn²⁺ và gluconat trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Điều kiện phân tích được lựa chọn bao gồm: (1) đệm Tris/Ace 10 mM ở pH = 5,0; (2) mao quản silica đường kính trong 50 µm với chiều dài hiệu dụng 30 cm; (3) thế tách +15 kV; (4) bơm mẫu thủy động học kiểu xiphong ở chiều cao 10 cm trong 20 s. Phương pháp đạt được giới hạn phát hiện của Zn²⁺ và gluconat lần lượt là 1,0 mg/L và 1,5 mg/L. Phương pháp có độ chụm tốt (RSD < 3%) và độ đúng được đánh giá qua độ thu hồi tốt đối với Zn²⁺ (89-103%) và gluconat (88-107%). Phương pháp đã được áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng Zn²⁺ và gluconat trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe trên thị trường. Kết quả này cũng đã được đối chứng với phương pháp HPLC-PDA (cho gluconat) và phương pháp ICP-OES (cho Zn²⁺) cho kết quả khá tương đồng.

Từ khóa: Zn, Gluconat, CE-C⁴D, thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

*Điện thoại: 0916149106

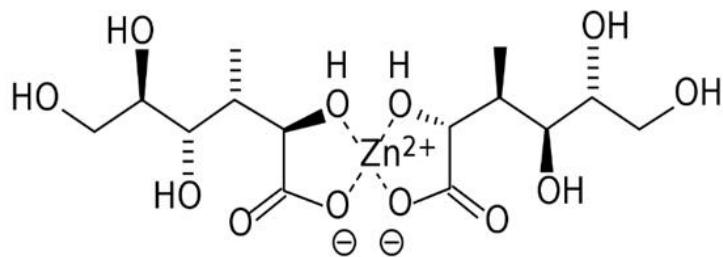
Email: trang2103@gmail.com

†Điện thoại: 0946593969

Email: nguyenthianhhuong@hus.edu.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kẽm là một nguyên tố vi lượng thiết yếu, có vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng cấu trúc và xúc tác của hơn 200 enzym tham gia vào quá trình trao đổi chất [1]. Hiện nay tình trạng thiếu vi lượng kẽm trong cơ thể ngày càng phổ biến và đang báo động, gây ra các triệu chứng rụng tóc, mất trí nhớ, ảnh hưởng đến khả năng miễn dịch cũng như sự phát triển thần kinh... Sự thiếu kẽm của cơ thể thường do chế độ ăn không đầy đủ, khả năng hấp thu kẽm thấp hoặc sử dụng thức ăn có nguồn gốc thực vật chứa nhiều acid phytic làm ức chế sự hấp thu kẽm. Trong khi đó, gluconat là muối của acid gluconic thường được phối trộn với kẽm (Hình 1) trong cùng một sản phẩm dưới dạng siro hoặc viên nén giúp cơ thể hấp thu kẽm tốt hơn [1-4]. Để đánh giá chất lượng sản phẩm, việc xác định đồng thời hàm lượng kẽm và gluconat trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe là cần thiết.



Hình 1. Công thức cấu tạo của kẽm gluconat

Do kẽm (trong dung dịch tồn tại dưới dạng Zn^{2+}) và gluconat (trong dung dịch tồn tại dưới dạng ion âm) có tính chất hoàn toàn khác nhau nên dù phối hợp trong cùng một sản phẩm nhưng để phân tích chúng thường cần sử dụng các phương pháp khác nhau. Trong đó, các phương pháp thường được sử dụng để phân tích Zn^{2+} là quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) [5], quang phổ phát xạ nguyên tử (AES) [6], quang phổ phát xạ plasma (ICP-OES) [7], khối phổ plasma cảm ứng phân giải cao (HR-ICP-MS) [8], phương pháp điện hóa [9], điện di mao quản [10]. Trong khi đó, để phân tích gluconat, các phương pháp thường được sử dụng là ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [11, 12] và điện di mao quản (CE) [13]. Phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) đã được sử dụng để xác định đồng thời các chất có tính chất khác nhau như glucosamin và Ca^{2+} , Mg^{2+} và vitamin B6 [14], do đó cũng có tiềm năng xác định đồng thời Zn^{2+} và gluconat. Vì vậy, trong nghiên cứu này, phương pháp CE-C⁴D đã được lựa chọn để nghiên cứu xác định đồng thời Zn^{2+} và gluconat trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, kẽm và gluconat là các đối tượng được lựa chọn để xác định đồng thời trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) dạng dung dịch và viên nén.

2.2 Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất, chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết phân tích. Chất chuẩn kẽm gluconat (độ tinh khiết > 99%) được cung cấp từ hãng Sigma- Aldrich (Mỹ). Dung dịch chuẩn gốc 1.000 mg/L được pha từ chất chuẩn và sử dụng để pha loãng thành các dung dịch chuẩn làm việc. Các hóa chất khác được sử dụng bao gồm “tris (hydroxymethyl) aminomethane” (Tris), acid acetic (Ace), L-histidine (His), L-arginine (Arg) của hãng Merck hoặc Fluka. Nước deion được sử dụng để pha các dung dịch.

2.3 Thiết bị

Thiết bị CE-C⁴D sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Công ty 3S Analysis. Thiết bị sử dụng nguồn thế cao lên đến ±25 kV, mao quản silica có đường kính trong (ID) là 50 µm, đường kính ngoài (OD) là 375 µm với tổng chiều dài là 50 cm (chiều dài hiệu dụng là 30 cm); detector độ dẫn không tiếp xúc (C⁴D). Thông tin về đặc điểm kỹ thuật của hệ thiết bị có thể tham khảo trong các công bố trước đây của nhóm nghiên cứu [15].

Ngoài thiết bị CE-C⁴D, nghiên cứu cũng sử dụng các trang thiết bị, dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm như: máy ly tâm, máy rung siêu âm có gia nhiệt, máy đo pH HANNA, cân phân tích Scientech (Mỹ) với độ chính xác 0,1 mg.

2.4 Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thông tin lấy mẫu và xử lý mẫu

Ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (M1-M3) được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Mẫu được bào chế ở hai dạng chính là dung dịch và viên nén. Hàm lượng và thành phần của chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa đồng thời kẽm và gluconat được công bố trên nhãn sản phẩm (Bảng 6). Hàm lượng kẽm và gluconat công bố trên nhãn của nhà sản xuất sẽ được đối chiếu với kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D và các phương pháp đối chứng để đánh giá chất lượng của sản phẩm đối với hai chất này.

Đối với mẫu dạng dung dịch: mẫu được lắc đều và lọc qua màng 0,45 µm rồi pha loãng (nếu cần) trước khi phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

Đối với mẫu dạng viên nén: cân chính xác 10 viên để xác định khối lượng trung bình của 1 viên rồi nghiền mịn, trộn đều. Một phần mẫu thuốc (khoảng 0,3 g) được cân chính xác trên cân phân tích, sau đó hòa tan vào 10 mL nước deion, rung siêu âm trong 30 phút để hòa tan mẫu. Ly tâm, chuyển phần dịch phía trên vào bình định mức 25 mL. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 µm và pha loãng (nếu cần) trước khi phân tích trên thiết bị CE-C⁴D. Hiệu quả xử lý mẫu được đánh giá qua hiệu suất thu hồi trên nền mẫu trắng.

Mẫu trắng sử dụng để đánh giá phương pháp là mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng viên nang cứng được thu thập trên địa bàn Hà Nội, không chứa kẽm và gluconat (trên nhãn công bố không có hàm lượng kẽm, gluconat và đã được xác định bằng phương pháp CE-C⁴D (Hình 10) cùng các phương pháp đối chứng không chứa kẽm và gluconat.

Mẫu thêm chuẩn là mẫu trắng thêm chuẩn, trộn đều và bảo quản trong bình hút ẩm ở điều kiện nhiệt độ phòng ít nhất trong 3 giờ. Mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn đều được xử lý tương tự các mẫu phân tích dạng viên nén trước khi phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

2.4.2. Khảo sát điều kiện phân tích và đánh giá phương pháp

Việc khảo sát điều kiện thích hợp để phân tích đồng thời Zn^{2+} và gluconat bằng phương pháp CE-C⁴D được thực hiện với dung dịch chuẩn kẽm gluconat 150 mg/L. Các điều kiện khảo sát bao gồm: dung dịch đệm điện di (thành phần, pH và nồng độ dung dịch), thế tách, thời gian và chiều cao bơm mẫu theo kỹ thuật thủy động học kiểu xiphong. Đây là các yếu tố có vai trò quyết định đến quá trình phân tách điện di và tín hiệu của các chất trong phương pháp CE-C⁴D. Các yếu tố này giúp duy trì, ổn định dòng điện di thẩm thấu (EOF) trong mao quản và ảnh hưởng đến tốc độ điện di của các chất phân tích [17].

Khi phân tích trên thiết bị CE-C⁴D ở khoảng pH khảo sát (pH = 5,0 ÷ 9,0) và áp thế dương ở đầu bơm mẫu, kẽm tồn tại ở dạng cation (Zn^{2+}) sẽ cho tín hiệu trước dòng EOF, gluconat ở dạng anion có độ linh động kém được dòng EOF kéo theo nên sẽ cho tín hiệu sau dòng EOF.

Phương pháp thêm chuẩn được sử dụng để xác nhận tín hiệu và định lượng các chất phân tích (Zn^{2+} và gluconat) trong mẫu.

Phương pháp cũng được đánh giá thông qua các thông số cơ bản gồm: xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện và định lượng, đánh giá độ chụm thông qua độ lặp lại và độ đúng thông qua độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định của AOAC [16].

2.4.3. Xử lý số liệu

Xử lý các số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

Hàm lượng các chất phân tích (Zn^{2+} , gluconat) trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe được tính theo công thức:

$$A = B \cdot 0,05 \cdot \frac{M_A}{M_G} \cdot \frac{KLV}{KLC}$$

Trong đó: - A là hàm lượng chất phân tích ở dạng hoạt chất ghi trên nhãn (mg/viên)

- B là hàm lượng chất phân tích thu được trong dung dịch mẫu (mg/L)

- M_A là khối lượng mol của dạng hoạt chất chứa chất phân tích (g/mol)

- M_G là khối lượng mol của chất phân tích (g/mol)

- KLV là khối lượng trung bình của 1 viên mẫu (mg)

- KLC là khối lượng cân của mẫu (mg)

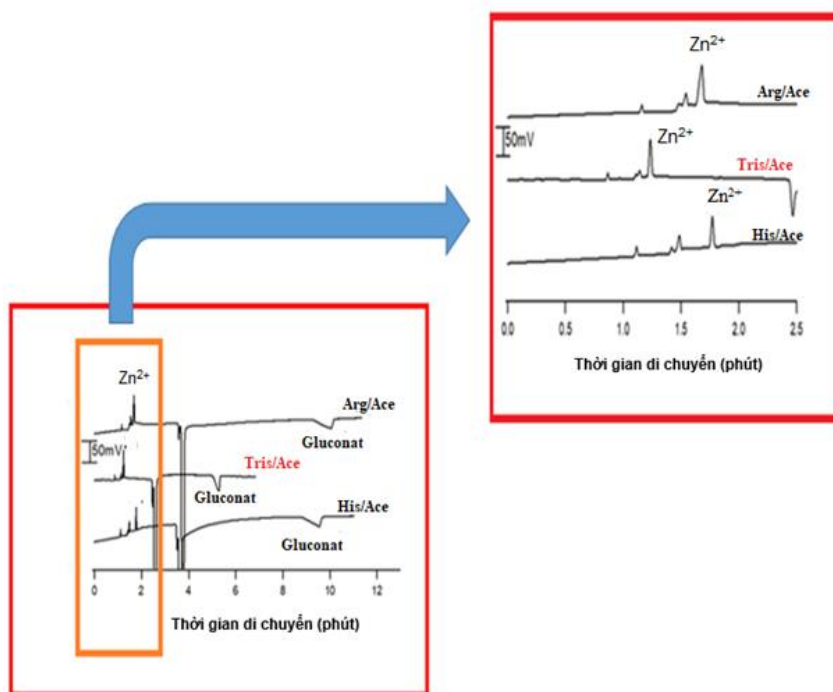
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát điều kiện phân tích đồng thời kẽm và gluconat bằng CE-C⁴D

3.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

3.1.1.1. Khảo sát thành phần dung dịch đệm điện di

Các dung dịch đệm điện di được lựa chọn khảo sát bao gồm: Tris, Arg, His với cùng nồng độ là 10 mM và được điều chỉnh bằng acid acetic đến pH = 5,0. Kết quả khảo sát các loại đệm điện di thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần dung dịch đệm điện di

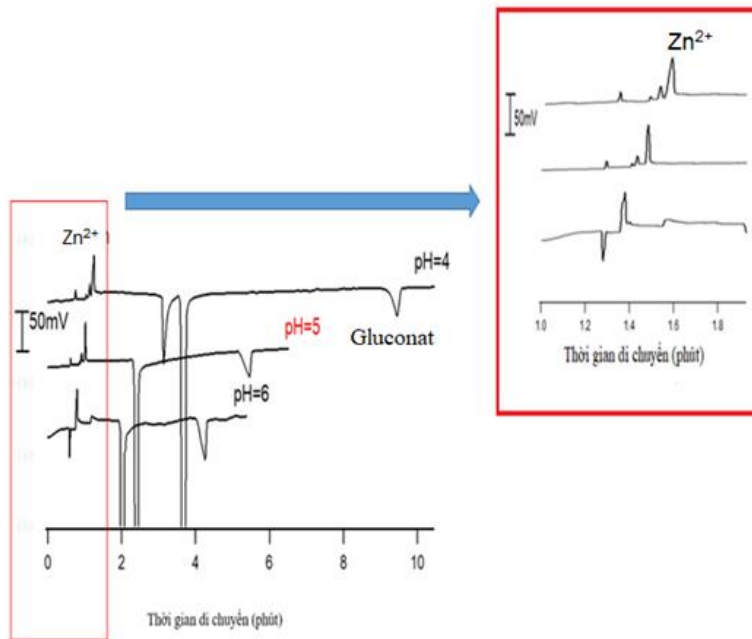
Kết quả ở Hình 2 cho thấy, với đệm điện di His/Ace, đường nền thu được không ổn định, có sự tăng tín hiệu nền theo thời gian. Hai đệm điện di Arg/Ace và Tris/Ace đều cho đường nền ổn định, tuy nhiên với Arg/Ace thời gian di chuyển của gluconat dài làm cho peak bị giãn rộng, trong khi thời gian di chuyển của gluconat trong đệm Tris/Ace khá ngắn (khoảng 6 phút), cho peak cân đối và tín hiệu rõ nét. Do đó, dung dịch đệm điện di Tris/Ace được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.1.1.2. Khảo sát pH của dung dịch đệm điện di

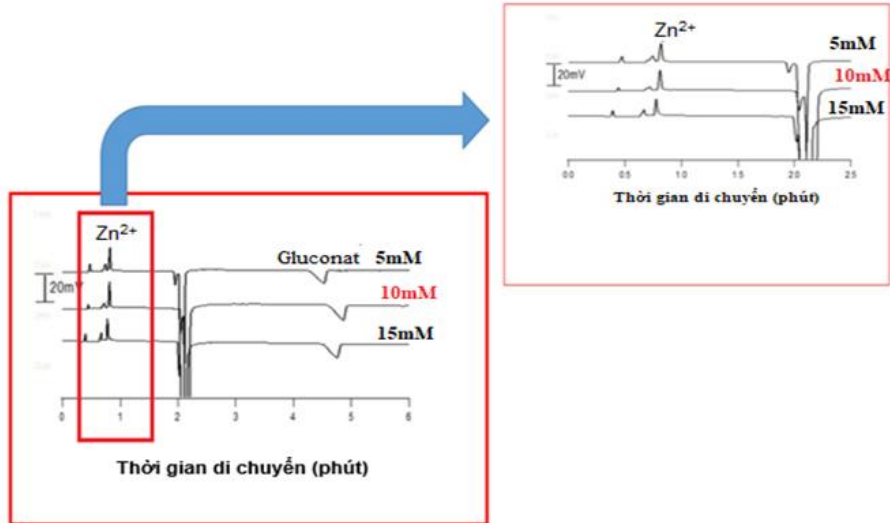
pH là yếu tố ảnh hưởng nhiều đến quá trình phân ly và phân tách điện di của các chất [17]. Trong nghiên cứu này, việc khảo sát được thực hiện trong khoảng pH từ 4,0 đến 9,0 với dung dịch đệm điện di lựa chọn là Tris/Ace 10 mM. Kết quả khảo sát trong Hình 3 cho thấy, khi pH tăng, thời gian di chuyển của gluconat giảm nhưng tín hiệu lại tăng dần, tuy nhiên tín hiệu của Zn lại giảm dần và không phân tách với peak nhỏ tạp chất (Na^+) ở phía trước. Ở pH = 5,0, tín hiệu các chất phân tích đều sắc nét, độ phân giải phù hợp, đường nền ổn định, thời gian phân tích hợp lý, do đó được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.1.1.3. Khảo sát nồng độ dung dịch đệm

Cùng với thành phần và pH, nồng độ đệm cũng là yếu tố ảnh hưởng nhiều đến kết quả phân tách điện di của các chất [17]. Việc khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch đệm điện di được thực hiện với đệm Tris/Ace ở các nồng độ Tris khảo sát trong khoảng 5 mM đến 15 mM và điều chỉnh đến pH = 5,0 bằng acid acetic. Kết quả thu được trong Hình 4 và Hình 5.



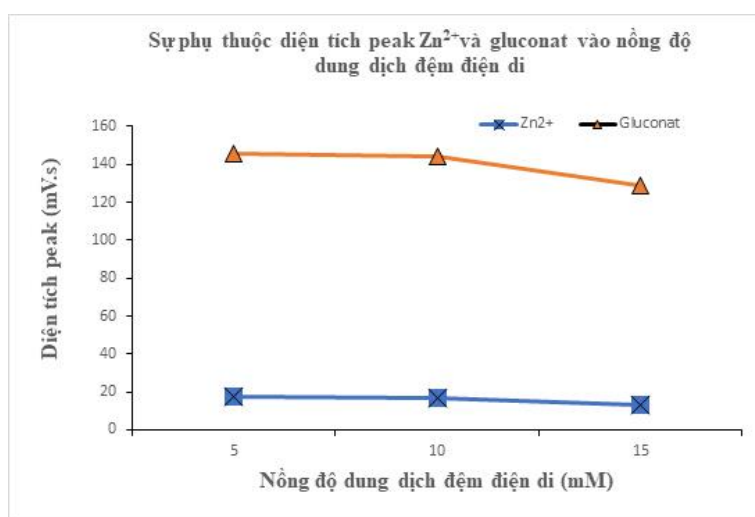
Hình 3. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của pH dung dịch đệm điện di



Hình 4. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch đệm điện di

Tris/Ace pH = 5,0

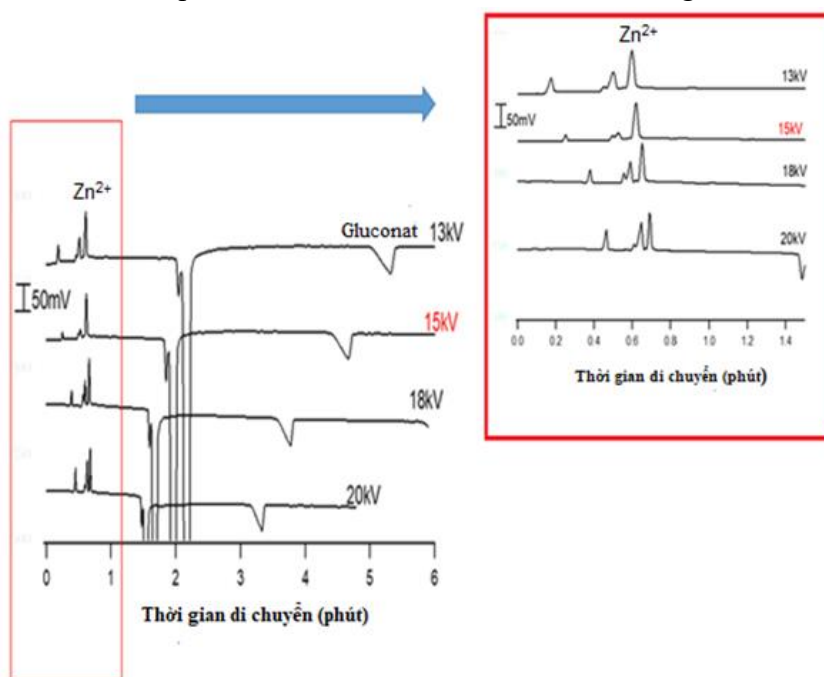
Từ kết quả ở Hình 4 và Hình 5 có thể nhận thấy, ở nồng độ dung dịch đệm điện di Tris 10 mM/Ace, pH = 5,0, Zn^{2+} và gluconat được tách tốt, peak sắc nét, tín hiệu đường nền ổn định nên được lựa chọn cho khảo sát tiếp theo.



Hình 5. Sự phụ thuộc diện tích peak Zn²⁺ và gluconat vào nồng độ dung dịch đệm điện di

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

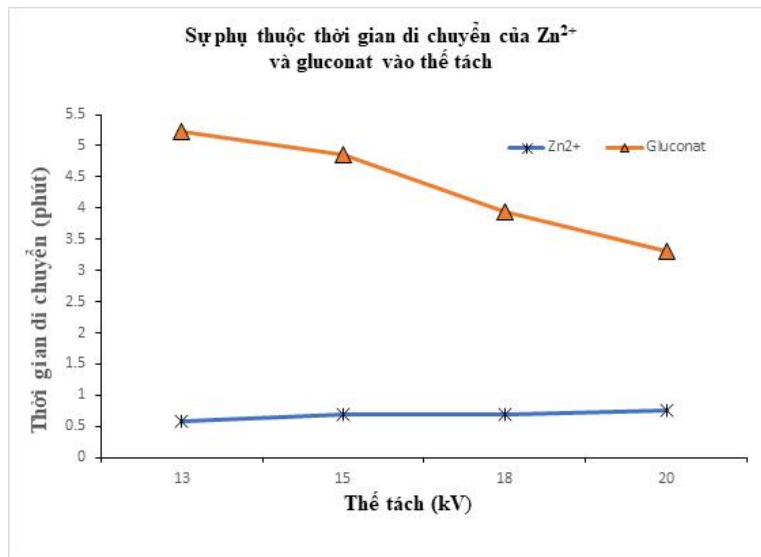
Quá trình điện di mao quản xảy ra khi có nguồn thế (E) một chiều nhất định đặt vào hai đầu mao quản, điều khiển và duy trì sự điện di của các chất [17]. Để có kết quả phân tách tốt và ổn định của các chất thì cần phải chọn thế tách thích hợp nhất và giữ cho thế này luôn ổn định trong suốt quá trình phân tích. Các thế tách được lựa chọn khảo sát là +13 kV, +15 kV, +18 kV và +20 kV. Kết quả khảo sát thế tách được thể hiện trong Hình 6 và Hình 7.



Hình 6. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Từ kết quả khảo sát ở Hình 6 và Hình 7 cho thấy, khi tăng thế tách làm cho tốc độ di chuyển của các chất tăng lên, thời gian phân tích ngắn hơn nhưng đồng thời cũng tạo các tín

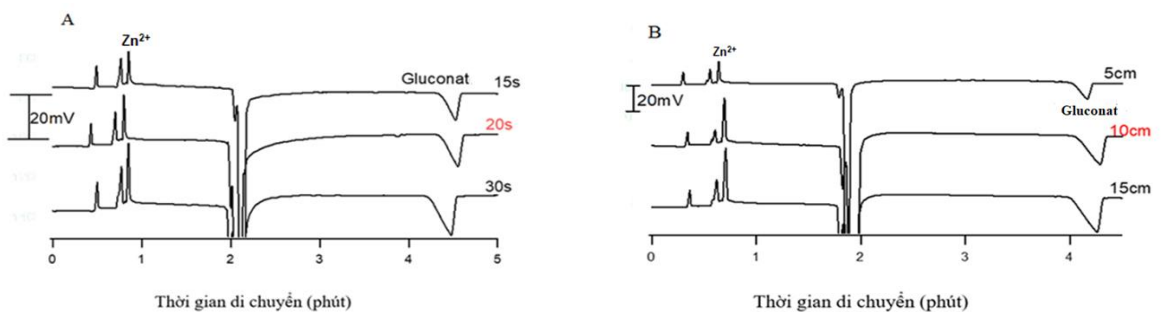
hiệu nhiều nên gia tăng do hiệu ứng nhiệt Jun tăng lên. Ở thế tách +15 kV, tín hiệu phân tích tốt và độ phân giải phù hợp, do đó được lựa chọn cho khảo sát tiếp theo.



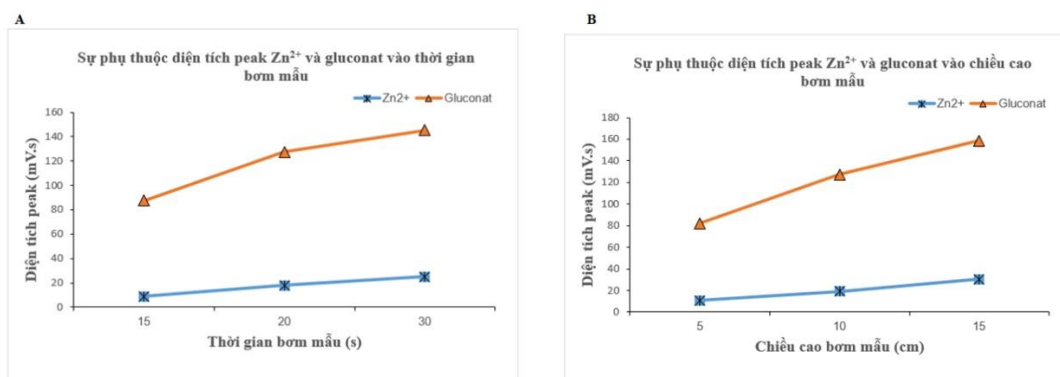
Hình 7. Sự phụ thuộc thời gian di chuyển của Zn và gluconat vào thế tách

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện bơm mẫu

Trong quá trình nạp mẫu vào mao quản, lượng mẫu nạp phải đủ lớn để đảm bảo đạt độ nhạy tốt, nhưng nếu vùng nạp vào quá lớn thì sự phân tán sẽ xuất hiện mạnh do hiện tượng khuếch tán làm giảm hiệu suất tách. Do đó, thời gian bơm mẫu và chiều cao bơm mẫu hợp lý cũng cần được khảo sát để đảm bảo thu được tín hiệu lớn nhất mà pic không bị giãn rộng. Trong nghiên cứu này, phương pháp bơm mẫu thủy động học kiểu xiphong được lựa chọn. Từ đó, chiều cao và thời gian bơm mẫu sẽ được khảo sát để thu được điều kiện phù hợp nhất. Trên cơ sở khảo sát với các chiều cao bơm mẫu 5, 10, 15 cm và thời gian bơm mẫu 15, 20, 30s (Hình 8, Hình 9) cho thấy, khi thời gian và chiều cao bơm mẫu tăng, tín hiệu (diện tích) peak tăng đáng kể do lượng mẫu được bơm vào mao quản tăng lên. Tuy nhiên, để đảm bảo hiệu quả phân tách và độ nhạy phù hợp đối với các mẫu thực tế, cũng như độ phân giải của các chất phân tích và các chất có thể có trong nền mẫu, thời gian 20 s và chiều cao bơm mẫu là 10 cm được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 8. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của A) thời gian bơm mẫu; B) chiều cao bơm mẫu



Hình 9. Sự phụ thuộc diện tích peak của Zn²⁺ và gluconat vào A) thời gian bơm mẫu; B) chiều cao bơm mẫu

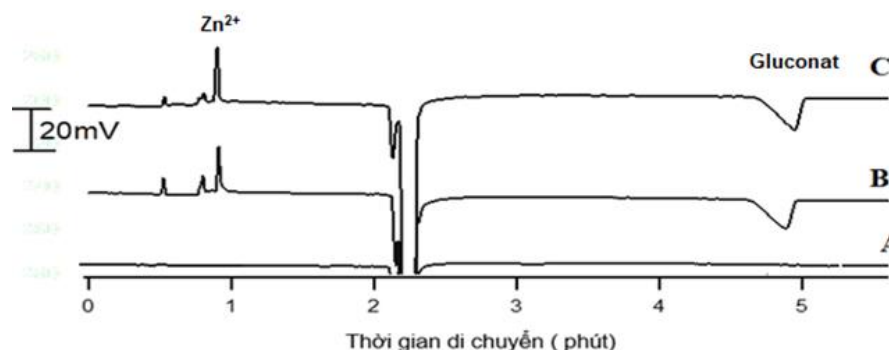
3.2 Đánh giá phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu của phương pháp

Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp được trình bày trong Bảng 1 và Hình 10. Mẫu trắng không có tín hiệu trùng với thời gian lưu của chất phân tích. Mẫu trắng thêm chuẩn có tín hiệu trùng với thời gian di chuyển của các chất phân tích trong mẫu chuẩn (độ lệch chuẩn tương đối (RSD) ≤ 2%). Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đáp ứng yêu cầu.

Bảng 1. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

Tên chất	Loại mẫu	Thời gian di chuyển (phút)	RSD (%)
Zn	Mẫu trắng	-	
	Mẫu chuẩn	0,9825	0,253
Gluconat	Mẫu trắng thêm chuẩn	0,9755	
	Mẫu chuẩn	5,0012	0,355
	Mẫu trắng thêm chuẩn	4,9512	



Hình 10. Điện di đồ mẫu trắng (A), dung dịch chuẩn (B) và mẫu trắng thêm chuẩn (C)

3.2.2. Xây dựng đường chuẩn

Các dung dịch dùng để dựng đường chuẩn được pha từ các dung dịch chuẩn gốc. Các khoảng nồng độ dùng để xây dựng đường chuẩn phân tích Zn²⁺ và gluconat tương ứng là

3,0-80 mg/L và 5,0-100 mg/L. Đường chuẩn được xây dựng trên cơ sở sự phụ thuộc của giá trị trung bình diện tích peak các lần đo lặp lại ($n = 3$) vào nồng độ chất phân tích. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, đường chuẩn của Zn^{2+} và gluconat có hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích peak vào nồng độ lần lượt là $R^2 = 0,9990$ và $R^2 = 0,9998$ và giá trị $p < 0,05$, chứng tỏ diện tích peak và nồng độ có quan hệ tuyến tính, đồng thời phương pháp không mắc sai số hệ thống.

Bảng 2. Kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	R^2	p
Zn	$y = 0,2116x - 0,5227$	0,9990	< 0,05
Gluconat	$y = 0,8228x - 1,0451$	0,9998	

3.2.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách pha loãng dần dung dịch chuẩn của Zn^{2+} và gluconat đến nồng độ nhỏ nhất sao cho tỷ số tín hiệu và nhiễu nền (S/N) bằng 3. Giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng 10 lần tỷ số S/N. Kết quả xác định LOD và LOQ được thể hiện trong Bảng 3 và thu được các giá trị LOD của Zn^{2+} và gluconat lần lượt là 1,00 và 1,50 mg/L. Giá trị LOQ tương ứng của Zn^{2+} và gluconat là 3,33 và 5,00 mg/L.

Bảng 3. Kết quả xác định LOD và LOQ

Chất phân tích	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Chiều cao pic (S)	Tín hiệu nhiễu nền (N)	S/N ở giá trị LOD
Zn^{2+}	1,00	3,33	0,18	0,06	3,00
Gluconat	1,50	5,00	0,25	0,08	3,125

3.2.4. Độ chụm và độ đúng

Độ chụm của phương pháp phân tích được đánh giá ở ba mức nồng độ của Zn^{2+} và gluconat là 10, 20, 40 mg/L thêm vào mẫu trắng, mỗi mức được tiến hành với 5 lần độc lập. Tín hiệu diện tích peak được sử dụng để tính độ lệch chuẩn (SD), diện tích peak trung bình (Stb), từ đó xác định được độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Kết quả thu được ở Bảng 4 cho thấy, ở cả ba mức nồng độ, giá trị RSD dao động trong khoảng từ 0,79-2,60%. Như vậy phương pháp có độ lặp lại đáp ứng yêu cầu theo AOAC [16].

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chụm

Chất	Nồng độ (mg/L)	SD (mV.s)	Stb (mV.s)	RSD (%)
Zn^{2+}	10	6,00	2,33	2,60
	20	0,05	4,33	1,24
	40	0,07	8,34	0,79
Gluconat	10	0,18	9,12	2,06
	20	0,26	15,94	1,60
	40	0,52	34,21	1,53

Độ đúng của phương pháp phân tích được đánh giá qua hiệu suất thu hồi ở ba mức nồng độ của Zn^{2+} và gluconat là 20, 40, và 50 mg/L thêm vào mẫu trắng, mỗi mức được tiến hành với 3 lần độc lập. Kết quả đánh giá độ đúng được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng

<i>Chất</i>	<i>Nồng độ chuẩn thêm vào (mg/L)</i>	<i>Nồng độ thu hồi (mg/L)</i>	<i>Hiệu suất thu hồi (%)</i>	<i>Hiệu suất thu hồi trung bình (%)</i>
Zn^{2+}	20	20,64	103,19	96,42
	40	38,97	97,44	
	50	44,31	88,62	
Gluconat	20	21,40	106,99	96,14
	40	37,28	93,20	
	50	44,10	88,21	

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, độ thu hồi của Zn^{2+} và gluconat trong khoảng 88,21-106,99%, đáp ứng yêu cầu của AOAC [16].

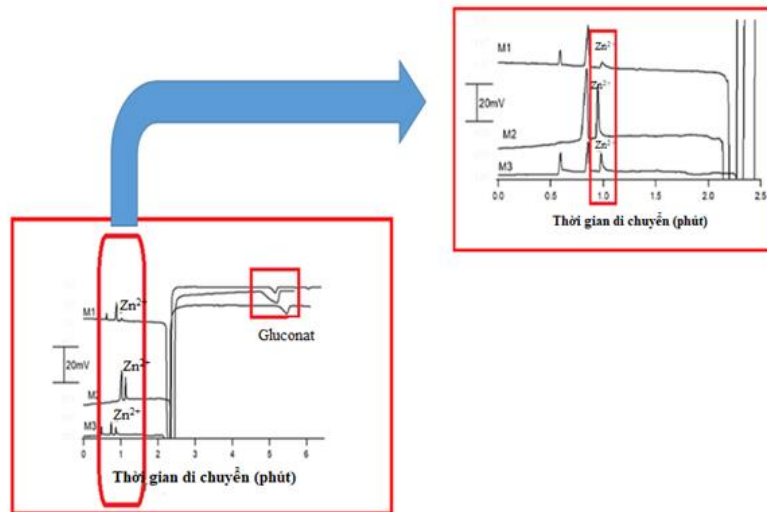
3.3. Phân tích mẫu thực tế

3.3.1. Kết quả phân tích mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp CE-C⁴D

Quy trình phân tích sau khi đánh giá đạt yêu cầu của AOAC đã được áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng Zn^{2+} và gluconat trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Phương pháp thêm chuẩn được sử dụng để xác nhận và định lượng các chất. Kết quả được thể hiện trong Bảng 6 và Hình 11.

Bảng 6. Kết quả xác định hàm lượng Zn và gluconat trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe

<i>STT</i>	<i>Kí hiệu mẫu</i>	<i>Dạng</i>	<i>Dạng hoạt chất ghi trên nhãn</i>	<i>Hàm lượng phân tích bằng CE-C⁴D</i>	<i>Hàm lượng công bố trên nhãn</i>	<i>Sai khác (%)</i>
1	M1	Dung dịch	Kẽm gluconat	3,65 mg/5 mL	3,75 mg/5 mL	-2,44
				20,69 mg/5 mL	22,50 mg/5 mL	-8,04
2	M2	Dung dịch	Kẽm gluconat	9,47 mg/10 mL	9,98 mg/10 mL	-5,10
				65,02 mg/10 mL	60,02 mg/10 mL	+8,33
3	M3	Viên nén	Kẽm gluconat	9,57 mg/viên	9,98 mg/viên	+4,11
				63,07 mg/viên	60,02 mg/viên	+0,74



Hình 11. Điện di đồ phân tích đồng thời Zn và gluconat trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe

Kết quả ở Bảng 6 và Hình 11 cho thấy, hàm lượng Zn^{2+} và gluconat công bố trên nhãn của các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe và phân tích được bằng phương pháp CE-C⁴D cho sai khác trong khoảng -8,04 đến +8,33% (< 10%). Đây là các kết quả bước đầu nhằm minh họa khả năng áp dụng của phương pháp. Nghiên cứu sẽ tiếp tục được mở rộng với các đối tượng mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe bào chế ở các dạng khác nhau.

3.3.2. Kết quả phân tích đối chứng

Để kiểm chứng kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D, hàm lượng Zn^{2+} và gluconat trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe đã được phân tích đối chứng tương ứng bằng phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử cảm ứng cộng hưởng plasma (ICP-OES) và phương pháp sắc kí lỏng sử dụng detector diod quang (HPLC-PDA). Kết quả được thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phân tích đối chứng hàm lượng Zn^{2+} và gluconat trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp ICP-OES và HPLC-PAD

TT	Kí hiệu mẫu	Dạng	Dạng hoạt chất ghi trên nhãn	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D	Hàm lượng phân tích bằng HPLC-PDA hoặc ICP-OES	Sai khác (%)
1	M1	Dung dịch	Kẽm	3,65 mg/5 mL	3,55 mg/5 mL	+2,82
			gluconat	20,69 mg/5 mL	21,75 mg/5 mL	-8,04
2	M2	Dung dịch	Kẽm	9,47 mg/10 mL	9,62 mg/10 mL	-1,58
			gluconat	65,02 mg/10 mL	66,01 mg/10 mL	-1,52
3	M3	Viên nén	Kẽm	9,57 mg/viên	10,70 mg/viên	-11,76
			gluconat	63,07 mg/viên	66,41 mg/viên	-5,30

Kết quả hàm lượng Zn^{2+} và gluconat trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe phân tích bằng hai phương pháp ở Bảng 7 cho thấy khá tương đồng. Phương pháp CE-C⁴D có thể sử dụng để phân tích sàng lọc và định lượng hai hoạt chất này trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

4. KẾT LUẬN

Như vậy, phương pháp CE-C⁴D đã được nghiên cứu thành công nhằm xác định đồng thời hàm lượng kẽm và gluconat trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Phương pháp đã được thẩm định về độ tuyến tính trong khoảng đường chuẩn, độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng kẽm và gluconat trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe với sai khác giữa nhãn công bố và kết quả phân tích được nhỏ hơn 10%. Kết quả này cũng đã được đối chứng với phương pháp HPLC-PDA (đối với gluconat) và ICP-OES (đối với Zn^{2+}) khá tương đồng, cho thấy phương pháp CE-C⁴D có thể áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng kẽm và gluconat trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. Frassinetti, G. L. Bronzetti, L. Caltavuturo, M. Cini and C. Della Croce, “The Role of Zinc in Life: A Review,” *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, vol. 25, no. 3, pp. 597-610, 2006.
- [2]. R. Wegmüller, F. Tay, C. Zeder, M. Brnić, R. F. Hurrell, “Zinc Absorption by Young Adults from Supplemental Zinc Citrate Is Comparable with That from Zinc Gluconate and Higher than from Zinc Oxide1, 2, 3,” *The Journal of Nutrition*, vol. 144, iss. 2, pp. 132-136, 2014.
- [3]. H. Hsieh, K. S. Vignesh, George S. Deepe, D. Choubey, H. G. Shertzer, M. B. Genter, “Mechanistic studies of the toxicity of zinc gluconate in the olfactory neuronal cell line Odora,” *Toxicology in Vitro*, vol. 35, pp. 24-30, 2016.
- [4]. N. M. Lowe, K. Fekete, T. Decsi, “Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, no. 6, pp. 2040S-2051S, 2009.
- [5]. G. Gumus, H. Filik, B. Demirata, “Determination of bismuth and zinc in pharmaceuticals by first derivative UV-Visible spectrophotometry,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 547, no. 1, pp. 138-143, 2005.
- [6]. J. Yu, X. Zhang, Q. Lu, X. Wang, D. Sun, Y. Wang, and W. Yang, “Determination of calcium and zinc in gluconates oral solution and blood samples by liquid cathode glow discharge-atomic emission spectrometry,” *Talanta*, vol. 175, pp. 150-157, 2017.
- [7]. Ş. Tokaloğlu, R. Clough, M. Foulkes, and P. Worsfold, “Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method,” *Food Chemistry*, vol. 150, pp. 321-327, 2014.

- [8]. K. Gellein, P. M. Roos, L. Evje, O. Vesterberg, T. P. Flaten, M. Nordberg, and T. Syversen, "Separation of proteins including metallothionein in cerebrospinal fluid by size exclusion HPLC and determination of trace elements by HR-ICP-MS," *Brain Research*, vol. 1174, pp. 136-142, 2007.
- [9]. M. H. Lee, Y. W. Kim, and K. M. Lim, "Electrochemical evaluation of zinc and magnesium alloy coatings deposited on electrogalvanized steel by PVD," *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, vol. 23, no. 3, pp. 876-880, 2013.
- [10]. Q. Feng, L. Jin-Ming, C. Zuliang, "Simultaneous separation of nine metal ions and ammonium with nonaqueous capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography A*, vol. 1022, no. 1-2, pp. 217-221, 2004.
- [11]. L. Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, R. Hájková, P. Solich, "HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, no. 3, pp. 1169-1173, 2007.
- [12]. P. Legrand, A. Desdion, and G. Boccadifuoco, "Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 155, pp. 298-305, 2018.
- [13]. K. Yoshikawa, S. Saito, and A. Sakuragawa, "Simultaneous analysis of acidulants and preservatives in food samples by using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection," *Food Chemistry*, vol. 127, no. 3, pp. 1385-1390, 2011.
- [14]. Q. H. Nguyen, T. H. M. Dang, T. P.Q. Le, T. H. T. Luu, T. D. Dinh, T. K. Mai, T. M. T. Nguyen, T. A. H. Nguyen, and T. D. Mai, "Inexpensive and simple tool for quality control of nutraceutical and tonic products with capillary electrophoresis and contactless conductivity detection: Some developments in Vietnam," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 150, no. 104882, 2023.
- [15]. T. A. H. Nguyen T. N. M. Pham, T. T. Doan, T. T. Ta, J. Saiz, T. Q. H. Nguyen, P. C. Hanser, T. M. Duc, "Simple semi-automated portable capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection for the determination of β -agonists in pharmaceutical and pig-feed samples," *Journal of Chromatography A*, vol. 1360, pp. 305-311, 2014.
- [16]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, 2012.
- [17]. L. T. H. Hao, P. T. N. Mai, N. T. A. Huong, N. V. Anh, P. T. Duc, V. T. Trang, *Application of electrophoresis in food analysis*. Hanoi: Science and Technology Publishing House, 2016 (in Vietnamese).

Study on simultaneous determination of zinc and gluconate in nutritional supplements by CE-C⁴D

**Bui Quoc Binh¹, Pham Gia Bach¹, Luu Thi Huyen Trang², Vu Thi Nhat Le²,
Lu Thi Minh Hien², Vu Anh Phuong³, Do Thi Trang³, Nguyen Thi Ngan³,
Nguyen Quang Huy⁴, Nguyen Viet Tru¹, Hoang Quoc Anh¹,
Pham Thi Ngoc Mai¹, Vu Thi Trang², Nguyen Thi Anh Huong¹**

¹*Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam*

²*National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam*

³*Poison Control Center, Bach Mai Hospital, Hanoi, Vietnam*

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

Abstract

Nutritional supplements providing bioavailable essential minerals, such as zinc (Zn) and magnesium (Mg), in forms of absorbable salts (e.g., gluconate, stearate, lactate, etc.) have been widely used. However, it should be noted that alongside these supplements, some excipients, including inorganic salts like zinc sulfate and magnesium sulfate, are frequently employed in pharmaceutical and nutraceutical products. Conventional analytical methods for total metal contents could not distinguish actual concentrations of bioavailable forms, suggesting the need for simultaneous analysis of both these essential minerals and their corresponding salts. In this study, we applied the capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) method to simultaneously measure zinc and gluconate in nutritional supplements. The optimal analytical parameters comprise: (1) 10 mM Tris/Ace electrolyte solution at pH 5.0; (2) silica capillary with an internal diameter of 50 μm and an effective length of 30 cm; (3) separation voltage of +15 kV; (4) hydrodynamic injection mode with siphoning technique at 10 cm height and injection time of 20 s. With these conditions, limit of detections of 1.0 mg/L for zinc and 1.5 mg/L for gluconate were achieved. The method has good repeatability (RSD < 3%) and good recovery (89-103% for zinc and 88-107% for gluconate). The validated method was applied to determine zinc and gluconate concentrations in three commercially available nutritional supplement samples. To ascertain the validity of the results, cross-validation was performed using the high-performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-PDA) for gluconate and the inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) for zinc, thereby reinforcing the reliability of the CE-C⁴D method.

Keywords: Zinc, Gluconate, CE-C⁴D, nutritional supplements.