

Ứng dụng kỹ thuật LC-MS/MS để xác định chất cấm Cyproheptadin trong thực phẩm chức năng

Mạc Thị Thanh Hoa^{1*}, Nguyễn Ngọc Diệp², Vũ Thị Thanh An^{1,3},
Nguyễn Quang Hùng¹, Nguyễn Thị Vân Anh², Cao Công Khánh¹

¹Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

³Đại học Keimyung, Daegu, Hàn Quốc

(Ngày đến tòa soạn: 01/09/2022; Ngày chấp nhận đăng: 07/10/2022)

Tóm tắt

Cyproheptadin (CYP) là một kháng histamin H1 thường bị trộn trái phép trong các thực phẩm chức năng để kích thích sự thèm ăn, tăng cân của trẻ nhỏ, hiện đã bị cấm sử dụng trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe theo quy định tại Thông tư 10/2021-BYT. Phương pháp được nghiên cứu sử dụng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ hai lần của Agilent Triple Quadrupole 6460 với mảnh 288,1 → 96,1 và 288,1 → 191,2 được lựa chọn để định lượng và định tính. Cột sắc ký XBridge C18 (100 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) với pha động gồm acetonitril và acid formic 0,1% được lựa chọn cho phép tách sắc ký. Chất phân tích được chiết bằng methanol và làm sạch bằng hỗn hợp bột PSA (*Primary Secondary Amine*) và bột C18. Độ thu hồi đạt trong khoảng 80 – 110% và độ đúng của phương pháp đạt yêu cầu về thẩm định phương pháp theo quy định của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thống (AOAC) ở các mức nồng độ thêm chuẩn trên ba nền mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng cốm, dạng siro và thực phẩm bổ sung dạng sữa bột. Giới hạn phát hiện và định lượng đạt được 0,08 mg/kg và 0,25 mg/kg với nền mẫu siro; 0,15 mg/kg và 0,50 mg/kg với nền mẫu cốm và nền sữa bột. Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 30 mẫu thực phẩm chức năng trên thị trường và phát hiện 01 mẫu siro dương tính (hàm lượng 1,67 mg/liều dùng 10 mL). Phương pháp có thể ứng dụng phương pháp để phân tích CYP trong các mẫu thực phẩm chức năng trên thị trường cũng như phát triển để phân tích đồng thời các chất trộn trái phép khác có tính chất và tác dụng tương tự trong các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Cyproheptadin, kháng histamin H1, thực phẩm chức năng, LC-MS/MS

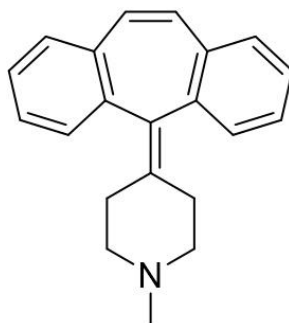
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cyproheptadin là một phân tử có chứa vòng piperidin liên kết với một hệ ba vòng (Hình 1) nên được xếp vào phân nhóm piperidin của các thuốc kháng histamin, được sử dụng

*Điện thoại: 0949934881

Email: thithanhhoa.mac@gmail.com

trong lâm sàng từ năm 1961 trong các trường hợp dị ứng như viêm da, chàm, viêm mũi theo mùa, viêm kết mạc dị ứng v.v [1]. Do tác dụng kích thích sự thèm ăn, tăng cân nên CYP được sử dụng ngoài chỉ định của thuốc để điều trị cho các trường hợp biếng ăn, suy dinh dưỡng nặng, suy kiệt, trên cả người lớn và trẻ em. Tuy nhiên, bên cạnh sự cải thiện về cân nặng là nguy cơ béo phì, tình trạng chán ăn sau khi ngưng dùng thuốc và các vấn đề sức khỏe khác như gây khô miệng, táo bón, nhìn mờ, khó tiểu tiện, ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương [2]. Mặc dù thuốc đã được nhiều nước khuyến cáo không sử dụng cho mục đích tăng cân nhưng CYP vẫn bị trộn trái phép trong một số sản phẩm dành cho trẻ nhỏ [3]. Tháng 6 năm 2021, Bộ Y tế đã ban hành Thông tư 10/2021/TT-BYT [4], quy định Cyproheptadin là một trong những chất cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Trên cơ sở đó, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng phương pháp để xác định Cyproheptadin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe và thực phẩm bổ sung trên nền sữa bột thường dùng cho trẻ dưới 36 tháng tuổi.



Hình 1. Cấu trúc hoá học của CYP

Hiện nay, đã có nhiều phương pháp được sử dụng để định lượng Cyproheptadin như quang phổ UV-Vis [5], sắc ký miễn dịch [6], sắc ký lỏng với nhiều detector khác nhau [7–10]. Có thể thấy các phương pháp quang phổ tương đối đơn giản, dễ thực hiện và ít tốn kém. Tuy nhiên, các phương pháp này thường chỉ áp dụng cho các mẫu chỉ có Cyproheptadin, vì thế chưa thể hiện sự đặc hiệu nếu xác định Cyproheptadin trong các mẫu đa thành phần. Phương pháp sắc ký miễn dịch có độ đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện thấp nhưng chưa phổ biến ở Việt Nam, quá trình chuẩn bị phức tạp và giá thành cao. Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu xác định một số chất nhóm kháng histamin H1 và một số thuốc chống dị ứng bao gồm Cyproheptadin trong chế phẩm đông dược bằng kỹ thuật sắc ký lỏng HPTLC, HPLC-PDA, LC-MS/MS [7, 8]. Kết quả cho thấy phương pháp sử dụng LC-MS/MS có độ nhạy tốt, giới hạn phát hiện thấp hơn so với các phương pháp khác, phù hợp để phân tích các chất trộn trái phép trong mẫu phân tích, phù hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây trên thế giới [9, 10].

Nền mẫu thực phẩm chức năng hỗ trợ tăng cân, giúp ăn ngon miệng thường chứa các thành phần như vitamin, acid amin (lysin, taurin) v.v. Kỹ thuật LC-MS/MS được lựa chọn nhờ độ nhạy và độ đặc hiệu cao cũng như có khả năng ứng dụng để sàng lọc các chất có cấu trúc tương tự trong nhiều đối tượng mẫu khác nhau. Để loại tạp chất như đường trong nền

mẫu siro, chất béo trong nền mẫu sữa và hạn chế ảnh hưởng của nền mẫu, kỹ thuật làm sạch sử dụng chiết phân tán pha rắn (d-SPE) được khảo sát là điểm mới của nghiên cứu này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Phương pháp được khảo sát trên thực phẩm chức năng hỗ trợ tăng cân gồm thực phẩm bổ sung vi chất dinh dưỡng (TPBS) dành cho trẻ dưới 36 tháng tuổi (sữa bột) và thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) dạng cốm và siro. Phương pháp sau khi thẩm định được áp dụng để phân tích 30 mẫu dịch vụ gửi đến Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia trong năm 2022.

2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất, chất chuẩn

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Nghiên cứu sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm, bao gồm:

- Thiết bị: hệ thống LC-MS/MS Agilent 6460 Triple Quad (Agilent), cột sắc ký pha đảo XBridge C18 (100 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) (Waters). Các thiết bị khác gồm: cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg (Mettler Toledo), máy rung siêu âm kết hợp gia nhiệt (S180H, Elma), máy ly tâm (Mikro 200R, Hettich), máy ly tâm (mZ 207H, Hermle), máy lắc vortex (Vortex 3, IKA).

- Dụng cụ: micropipet có thể hút chính xác thể tích 10-100 μL, 100-1000 μL (Eppendorf), pipet paster, ống ly tâm 15 mL và 50 mL (Corning), bình định mức các loại (Isolab), giấy lọc, màng lọc PTFE RC15 0,22 μm (Sartorius), lọ đựng mẫu 1,8 mL (Agilent).

2.2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất đều đạt tinh khiết sắc ký, gồm: methanol (MeOH), acetonitril (ACN), acid formic 98%, amoni format, magie sulfat khan (MgSO₄) cung cấp bởi Merck, bột làm sạch C18, PSA (Agilent) và nước tinh khiết dùng cho sắc ký của phòng thí nghiệm. Chất chuẩn Cyproheptadine hydrochloride (số lô 1016606, độ tinh khiết 91,7%) của LGC. Dung dịch chuẩn gốc được pha trong methanol, bảo quản ở 4°C. Các dung dịch chuẩn làm việc được pha loãng từ chuẩn gốc bằng methanol.

2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát điều kiện phân tích CYP bằng LC-MS/MS

Khảo sát điều kiện khối phổ: sử dụng dung dịch chuẩn CYP 1,0 μg/mL, tối ưu tự động bằng phần mềm của thiết bị. Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng: cột sắc ký pha đảo XBridge C18 (100 mm × 2,1 mm, 3,5 μm), khảo sát lựa chọn dung môi gồm kênh A: acid formic 0,1% (HCOOH 0,1%) và amoni format 10 mM (HCOONH₄ 10 mM) và kênh B: methanol (MeOH), acetonitril (ACN).

Khảo sát chương trình gradient:

+ Chương trình 1 (CT1): 0 – 1,5 phút: 80% A; 1,5 – 2 phút: 80 – 10%; 2 – 5 phút: 10% A; 4 – 6 phút: 10 – 80%; 6 – 8 phút: 80% A

+ Chương trình 2 (CT2): 0 – 3,5 phút: 100% A; 3,5 – 5 phút: 100 – 10%; 5 – 7 phút: 10% A; 7 – 7,5 phút: 10 – 100%; 7,5 – 8 phút: 100% A

+ Chương trình 3 (CT3): đẳng dòng theo tỷ lệ 50: 50

+ Chương trình 4 (CT4): 0 – 2 phút: 90% A; 2 – 3 phút: 90 – 10%; 3 – 5 phút: 10% A; 5 – 6 phút: 10 – 90%; 6 – 8 phút: 90% A.

2.3.2. Khảo sát dung môi chiết

Khảo sát điều kiện xử lý mẫu trên mẫu trắng (TPBVSK dạng cốm, siro và TPBS trên nền sữa dạng bột) được thêm chuẩn với nồng độ xác định. Mỗi khảo sát được phân tích hai mẫu lặp lại và tính kết quả trung bình. Dựa trên độ tan của chất phân tích và để hạn chế chiết tạp chất (kết tủa protein, hòa tan kém đường), tiến hành khảo sát với hai loại dung môi: MeOH và ACN. Quy trình xử lý mẫu dự kiến như sau:

Cân 1,0 g mẫu trắng vào ống ly tâm 50 mL. Thêm chuẩn. Thêm 4 mL nước, lắc vortex trong 1 phút cho phân tán đều. Thêm khoảng 30 mL dung môi, đậy nắp, rung siêu âm trong 10 phút. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn dịch vào bình định mức 50 mL. Chiết lặp lại với 10 – 15 mL dung môi. Gộp dịch và định mức bằng dung môi chiết. Lọc qua giấy lọc 0,45 μm , màng lọc 0,22 μm , phân tích bằng LC-MS/MS. Mỗi khảo sát được phân tích lặp lại ba lần, tính giá trị trung bình và so sánh độ thu hồi.

2.3.3. Khảo sát điều kiện làm sạch

Dịch chiết sau khi lựa chọn dung môi (2.3.2) được làm sạch theo các cách sau:

(1): chỉ làm sạch qua màng lọc 0,22 μm ,

(2): hút 1 mL dịch chiết vào ống d-SPE chứa 50 mg bột C18,

(3): hút 1 mL dịch chiết vào ống d-SPE chứa 50 mg bột PSA,

(4): hút 1 mL dịch chiết vào ống d-SPE chứa 50 mg bột C18 và 50 mg bột PSA.

Lắc xoáy 1 phút và ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 1 phút. Hút 0,8 mL dịch chiết vào lọ đựng mẫu, phân tích bằng LC-MS/MS. Mỗi khảo sát được phân tích lặp lại ba lần, tính giá trị trung bình và so sánh độ thu hồi.

2.3.3. Đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu

Dựng đường chuẩn dung môi và đường chuẩn trên nền mẫu trắng có nồng độ trong khoảng 5 – 200 ng/mL. Ảnh hưởng nền (ME%) được tính theo công thức:

$$ME (\%) = \frac{a_m - a_s}{a_s} \times 100$$

Trong đó: a_m là độ dốc của đường chuẩn pha trên nền mẫu trắng,

a_s là độ dốc của đường chuẩn pha trên dung môi.

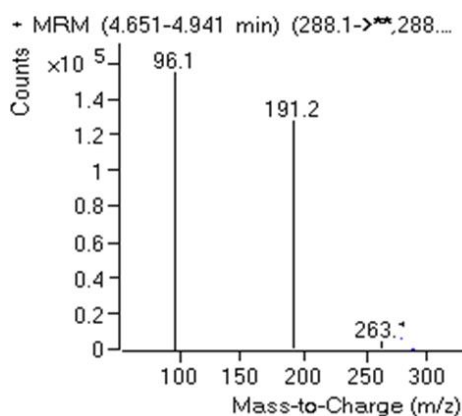
2.3.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp sau khi xây dựng được thẩm định các tiêu chí theo yêu cầu của AOAC [11] bao gồm: độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ lặp lại.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện LC-MS/MS

Thử nghiệm trên hệ thống LC-MS/MS cho thấy điều kiện phân tích CYP sử dụng nguồn ion hóa phun điện từ ion hóa dương (ESI+), chế độ quét MRM với mảnh định lượng 288,1 → 96,1 và 288,1 → 191,2 (Hình 2) với thế va chạm (CE) là 38 V với cả hai mảnh cho tín hiệu chất phân tích cao và ổn định nhất.



Hình 2. Phổ khối của Cyproheptadin

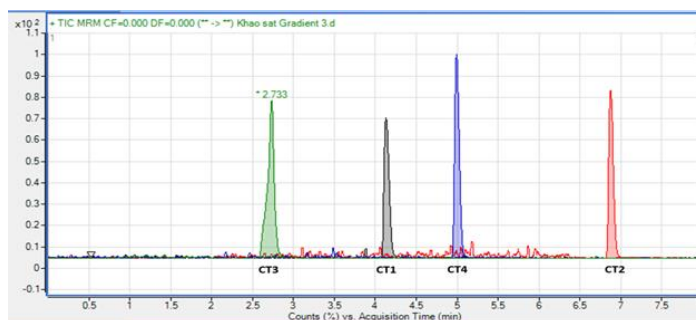
Cột sắc ký được lựa chọn sau khi tham khảo tài liệu và dựa trên điều kiện có sẵn của phòng thí nghiệm. Hệ pha động sử dụng được khảo sát gồm pha động kênh A: HCOONH₄ 20 mM, HCOOH 0,1% và kênh B: methanol (MeOH) và acetonitril (ACN) với cùng chương trình dung môi. Kết quả khảo sát lựa chọn thành phần pha động được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát lựa chọn thành phần pha động

STT	Kênh A	Kênh B	Diện tích pic	Chiều cao pic	Độ rộng chân pic
Pha động 1	HCOONH ₄ 10 mM	ACN	26549	8988	0,249
Pha động 2	HCOONH ₄ 10 mM	MeOH	8324	597	0,464
Pha động 3	HCOOH 0,1%	MeOH	11131	1510	0,646
Pha động 4	HCOOH 0,1%	ACN	42824	19222	0,215

Từ kết quả Bảng 1 cho thấy hệ pha động 4 gồm acid formic 0,1% và ACN với chương trình gradient cho pic có diện tích và chiều cao lớn nhất, độ rộng chân pic nhỏ nhất, pic cân đối, không có hiện tượng bị chẻ pic hay kéo đuôi được lựa chọn. Do đó, lựa chọn hệ pha động chứa HCOOH 0,1% và ACN để khảo sát chương trình gradient.

Tiến hành khảo sát một số chương trình gradient theo 2.3.1, sắc ký đồ được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích CYP theo các chương trình gradient

Từ sắc ký đồ Hình 3 thấy rằng chương trình 3 tuy có diện tích pic lớn hơn nhưng pic bị kéo chân, thời gian lưu sớm, có thể bị ảnh hưởng bởi các tạp chất phân cực có trong nền mẫu. Chương trình gradient 4 cho tín hiệu chiều cao và diện tích pic cao hơn so với chương trình 1 và 2, pic cân đối, tín hiệu phân tích tốt và ổn định tương tự với kết quả của một số nghiên cứu khác [5-8]. Do đó lựa chọn chương trình gradient 4 với pha động HCOOH 0,1% và ACN.

Các thông số khối phổ và điều kiện sắc ký lỏng đã lựa chọn được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2. Điều kiện LC-MS/MS phân tích CYP

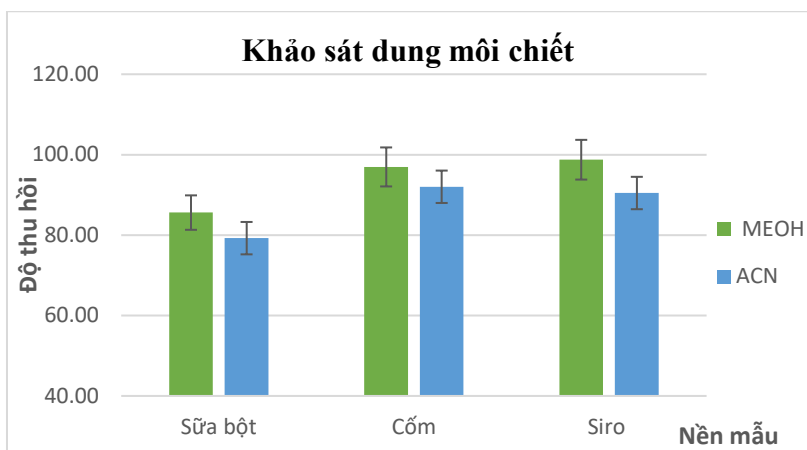
Thông số	Giá trị
Mảnh ion định lượng (CE*)	288,1 → 96,1 (38)
Mảnh ion định tính (CE*)	288,1 → 191,2 (38)
Cột sắc ký	XBridge C18 (100 mm × 2,1 mm, 3,5 μm) (Waters)
Pha động	Kênh A: Acid formic 0,1% trong nước, Kênh B: ACN
Chương trình gradient	0 – 2 phút: 90% A; 2 – 3 phút: 90 – 10%; 3 – 5 phút: 10% A; 5 – 6 phút: 10 – 90%; 6 – 8 phút: 90% A
Tốc độ dòng	0,3 mL/phút
Thời gian phân tích	8 phút
Thể tích bơm	5 μL

*CE: thế va chạm (V)

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Tiến hành thêm 50 μL dung dịch chuẩn trung gian 50 μg/mL trên nền mẫu trắng, tương đương nồng độ 50 μg/mL dịch chiết hay 2,5 mg/kg mẫu thử. Khảo sát hai loại dung môi chiết gồm MeOH và ACN theo quy trình xử lý mẫu dự kiến mục 2.3.2 và so sánh độ thu hồi. Kết quả được trình bày trong Hình 4.

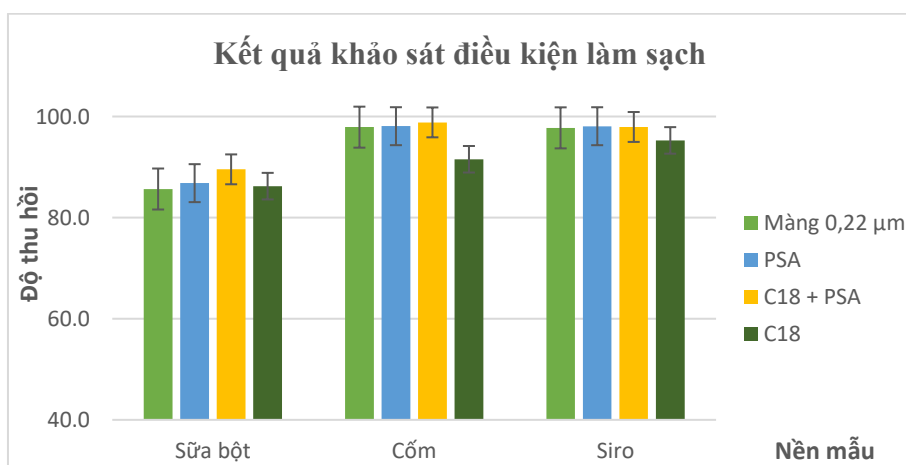


Hình 4. Kết quả độ thu hồi khảo sát dung môi chiết

Kết quả biểu diễn trên Hình 4 cho thấy methanol cho hiệu suất chiết tốt nhất, phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây [10]. Mặt khác, methanol là dung môi phổ biến, có giá thành rẻ nên việc lựa chọn dung môi chiết là methanol giúp tiết kiệm chi phí và thời gian với hai lần chiết lặp bằng kỹ thuật rung siêu âm trong 10 phút/lần mà vẫn đảm bảo độ thu hồi theo yêu cầu của AOAC [11]. Do đó, lựa chọn dung môi chiết là methanol cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Khảo sát điều kiện làm sạch

Dịch chiết methanol (3.2.1) được dùng để khảo sát điều kiện làm sạch. Kỹ thuật chiết phân tán pha rắn d-SPE là kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng được nhóm nghiên cứu lựa chọn. Tiến hành khảo sát với hai loại chất hấp phụ phổ biến là bột C18 và PSA, thu được kết quả ở Hình 5.



Hình 5. Kết quả độ thu hồi khảo sát điều kiện làm sạch

Tham khảo tài liệu [12], sử dụng 50 mg mỗi chất hấp phụ cho 1,0 mL dịch chiết. So sánh độ thu hồi sau khi làm sạch bằng d-SPE với độ thu hồi của dịch chiết chỉ lọc qua màng 0,22 μm. Kết quả được trình bày trong Hình 5.

Kết quả khảo sát cho thấy việc sử dụng kết hợp PSA và C18 giúp tăng đáng kể độ thu hồi. Chất hấp phụ PSA giúp loại bỏ đường và các acid hữu cơ, trong khi C18 có khả năng giữ lại chất béo và các hợp chất không phân cực có trong nền mẫu. Do đó, hỗn hợp 50 mg PSA và 50 mg C18 được lựa chọn để làm sạch cho 1 mL dịch chiết. Đây là điểm mới của quy trình so với các kết quả trước đây [7-10]. Việc sử dụng bột làm sạch PSA và C18 giúp loại tạp chất và giảm ảnh hưởng của nền mẫu, cũng như giúp bảo vệ cột và tăng tuổi thọ và hiệu quả sử dụng thiết bị mà vẫn đảm bảo hiệu suất thu hồi.

Quy trình xử lý mẫu tối ưu được lựa chọn như sau: cân 1,0 g mẫu trắng vào ống ly tâm 50 mL. Thêm 4 mL nước, lắc vortex trong 1 phút cho phân tán đều. Thêm khoảng 30 mL methanol, đậy nắp, rung siêu âm trong 10 phút. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn dịch vào bình định mức 50 mL. Lặp lại với 10-15 mL MeOH. Gộp dịch và định mức bằng MeOH. Hút 1 mL dịch chiết vào ống d-SPE chứa 50 mg PSA và 50 mg C18. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 1 phút. Lọc qua màng 0,22 μ m vào lọ đựng mẫu và phân tích bằng LC-MS/MS.

3.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu

Ảnh hưởng của nền mẫu được tính toán thông qua độ dốc của đường chuẩn, theo hướng dẫn xác nhận của FDA [11]. Tiến hành xây dựng đường chuẩn trong dung môi và đường chuẩn trên nền mẫu trắng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nền

Nền mẫu	Sữa bột	Cốm	Siro
Độ dốc a_m	234	205	233
Độ dốc a_s	235	235	235
ME%	-0,49%	-12,7%	-0,83%

Kết quả trong Bảng 3 cho thấy mức độ ảnh hưởng của nền mẫu trong nghiên cứu với CYP là khác nhau, thường có xu hướng giảm. Tuy nhiên ảnh hưởng của cả ba nền mẫu nằm trong giới hạn cho phép $\leq \pm 20\%$ theo quy định của AOAC. Do đó có thể sử dụng đường chuẩn dung môi để phân tích CYP.

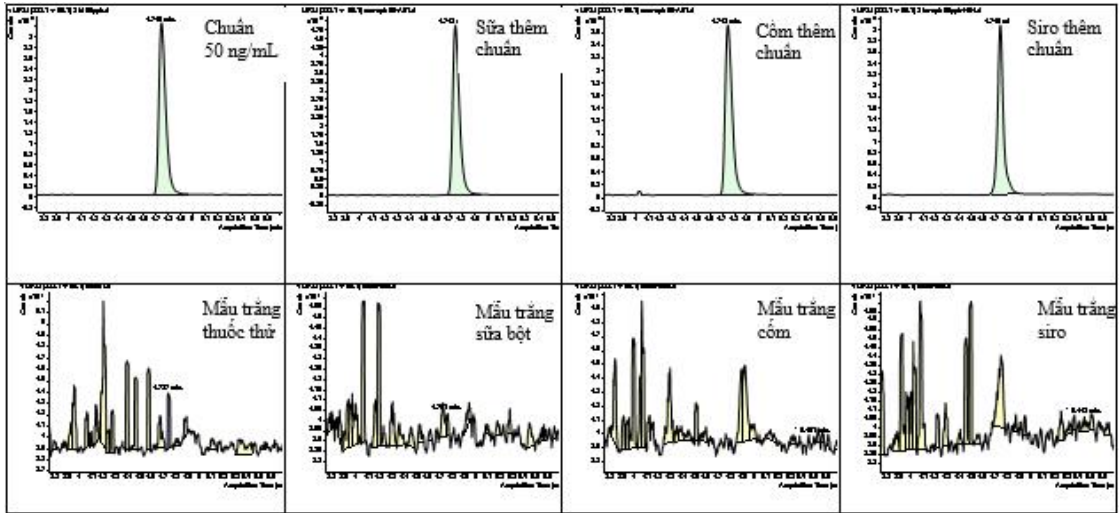
3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, dung dịch chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn ở mức 50 ng/mL. Kết quả thu được (Bảng 4) cho thấy độ đặc hiệu của phương pháp đáp ứng yêu cầu về tỷ lệ ion với 5 điểm nhận dạng (IP) (kỹ thuật LC, 1 ion mẹ và 2 ion con) [11]. Thời gian lưu của CYP trong mẫu thêm chuẩn chênh lệch không quá 0,1 phút với thời gian lưu của chất phân tích trong mẫu chuẩn, trên sắc đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu của chất phân tích (Hình 6).

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu

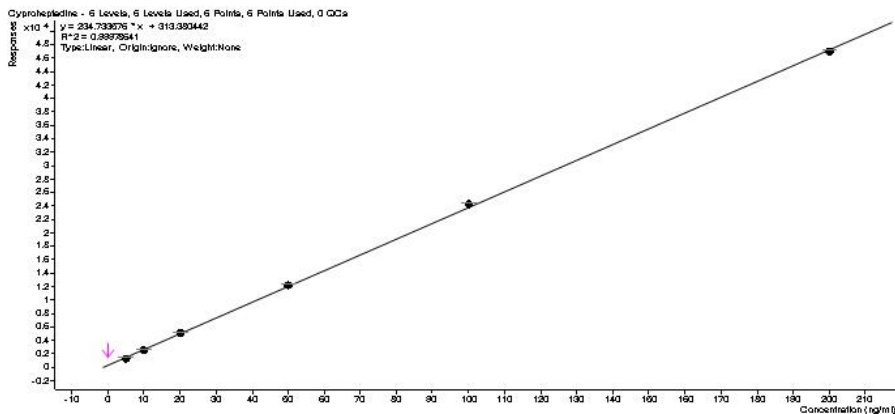
Dung dịch phân tích	Số điểm IP	Thời gian lưu (phút)	Tỷ lệ ion định tính/định lượng (%)	Mức yêu cầu về tỷ lệ ion
Dung dịch chuẩn	5	4,734±0,039	82,3±1,36	±20%
Mẫu sữa thêm chuẩn		4,734±0,043	87,8±1,05	
Mẫu cơm thêm chuẩn		4,740±0,119	83,2±1,71	
Mẫu siro thêm chuẩn		4,736±0,099	83,8±1,42	



Hình 6. Kết quả phân tích độ đặc hiệu

3.3.2. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL, sử dụng phần mềm của thiết bị để dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic (Hình 7). Kết quả cho thấy đường chuẩn CYP tuyến tính trong khoảng 5 – 200 ng/mL với hệ số xác định $R^2 \geq 0,995$ và độ chệch tại mỗi điểm của đường chuẩn $\leq 15\%$.



Hình 7. Đường chuẩn CYP 5 – 200 ng/mL

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

Tiến hành phân tích lặp lại 10 lần mẫu trắng thêm chuẩn ở mức 10 ng/mL dịch chiết (tương đương 0,5 mg/kg mẫu thử) trên ba nền mẫu TPBVSK dạng cốm, siro và TPBS trên nền sữa dạng bột. Giá trị LOD và LOQ của phương pháp dựa trên độ lệch chuẩn: $LOD=3 \times SD$; $LOQ=10 \times SD$; yêu cầu $4 \leq R \leq 10$ ($R=x_{tb}/LOD$) [11]. Với nền mẫu sữa dạng bột, giá trị $R=3,44$ không đạt yêu cầu, do đó, tiến hành thêm chuẩn ở mức 20 ng/mL và tiến hành phân tích lại. Kết quả LOD, LOQ xác định được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Nền mẫu	Giá trị ước lượng		R	Giá trị công bố	
	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
TPBVSK dạng siro	1,42	4,75	6,67	1,5	5,0
TPBVSK dạng cốm	2,29	7,63	4,08	3,0	10
TPBS dạng sữa bột	2,67	8,91	7,76	3,0	10

Từ giá trị LOD, LOQ xác định được trong Bảng 5, lựa chọn giá trị LOD, LOQ công bố tương đương 0,08 mg/kg và 0,25 mg/kg với nền mẫu siro; 0,15 mg/kg và 0,50 mg/kg với nền mẫu cốm và nền sữa bột. Độ đúng và độ chụm tại LOQ được đánh giá trong mục 3.3.4. Tính tỉ lệ tín hiệu/nhiều bằng phần mềm của thiết bị thấy rằng $S/N \geq 10$ (60,2 với nền cốm, 88,0 với nền sữa và 40,3 với nền siro). Như vậy, mức giới hạn phát hiện và định lượng đã xác định được là phù hợp.

Bảng 6. Kết quả phân tích độ lặp lại và độ thu hồi

Nền mẫu	Mức thêm chuẩn		Độ thu hồi (H%)		Độ lặp lại (RSD%)	
	Hàm lượng (mg/kg)	Nồng độ (ng/mL)	Kết quả	Yêu cầu AOAC	Kết quả	Mức yêu cầu (PRSD _r %)
TPBVSK dạng siro	0,25	5,0	86,9 – 97,9	80 – 110	4,12	13,0
	0,50	10,0	86,1 – 101		5,00	11,8
	2,50	50,0	96,1 – 101		1,71	9,2
TPBVSK dạng cốm	0,50	10,0	85,0 – 108		3,80	11,8
	1,00	20,0	99,4 – 109		3,08	10,6
	5,00	100	80,5 – 84,0		1,75	8,3
TPBS sữa bột	0,50	10,0	82,7 – 93,0	4,91	11,8	
	1,0	20,0	96,6 – 103	2,45	10,6	
	5,0	100	92,6 – 97,7	1,89	8,3	

3.3.4. Độ đúng và độ chụm

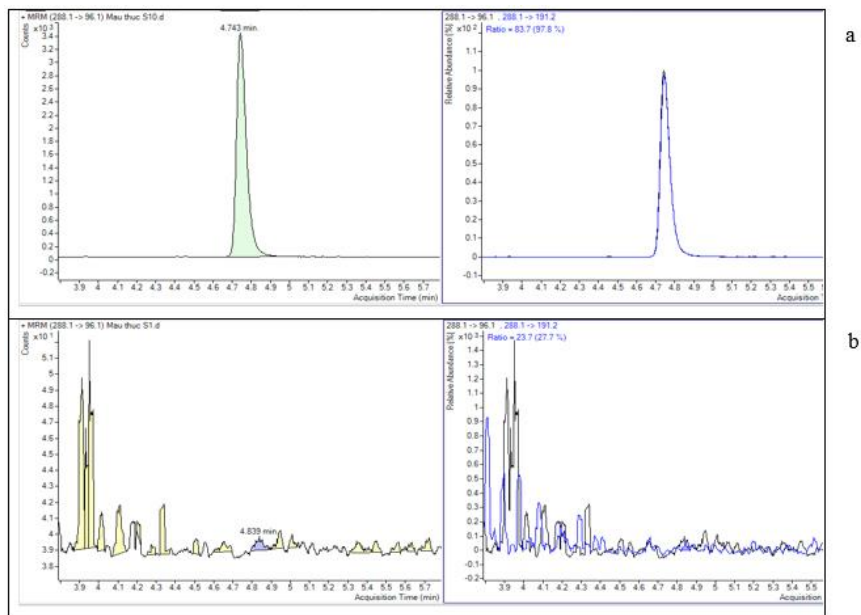
Tiến hành thêm chuẩn trên nền mẫu trắng ở ba mức nồng độ LOQ, $2 \times LOQ$, $10 \times LOQ$ với cả ba nền mẫu, mỗi mức tiến hành lặp lại 06 lần. Độ đúng và độ chụm được đánh giá

thông qua độ thu hồi (H%) và độ lặp lại (RSD%). Yêu cầu độ lặp lại theo AOAC ở mức 1 – 10 mg/kg là 80 – 100%. Độ lệch chuẩn ước tính (PRSD_r%) được tính theo công thức Horwitz [11]. Kết quả độ lặp lại và độ thu hồi được trình bày trong Bảng 6.

Kết quả thẩm định tại ba mức nồng độ thêm chuẩn cho thấy phương pháp có độ lặp lại và độ thu hồi đạt yêu cầu theo AOAC. Mức giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng là 0,08 mg/kg và 0,25 mg/kg với nền mẫu siro; 0,15 mg/kg và 0,50 mg/kg với nền mẫu cốm và nền sữa bột tương đương với kết quả của các nghiên cứu trước đây [7–10].

3.4. Ứng dụng phương pháp trong phân tích mẫu thực

Phương pháp được ứng dụng để phân tích 30 mẫu, gồm 10 mẫu TPBVSK dạng cốm, 10 mẫu TPBVSK dạng siro và 10 mẫu TPBS dạng sữa bột được gửi đến Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia. Trong đó, phát hiện 1/10 mẫu thử dạng siro dương tính với Cyproheptadin với hàm lượng 0,17 mg/g tương đương 1,67 mg/đơn vị mẫu (lọ 10 mL), mức này là có ý nghĩa so với liều dùng 4 – 6 mg/ngày trong điều trị cho trẻ từ 2 – 6 tuổi. Việc sử dụng sản phẩm có chứa chất trộn trái phép quá liều hoặc trong thời gian dài có thể tác động không tốt đến sức khỏe người dùng. Mẫu phát hiện Cyproheptadin là mẫu không có thông tin nhãn, do đó, người dùng cần cân nhắc khi sử dụng các sản phẩm không có nguồn gốc, xuất xứ rõ ràng. Kết quả phân tích mảnh định lượng và định tính của mẫu thực dương tính và mẫu thực âm tính với Cyproheptadin được trình bày ở Hình 8.



Hình 8. Sắc ký đồ phân tích mẫu thực: a, mẫu dương tính; b, mẫu âm tính với Cyproheptadin

Đây là các kết quả sơ bộ ban đầu, trong thời gian tới, nhóm nghiên cứu tiếp tục triển khai ứng dụng phương pháp phân tích này trên số lượng mẫu nhiều hơn để khảo sát chất lượng thực phẩm bảo vệ sức khỏe và thực phẩm bổ sung trên thị trường, cũng như phát triển phương pháp để phân tích các chất cấm khác có tính chất tương tự.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp LC-MS/MS với các bước xử lý mẫu đơn giản, nhanh với thời gian phân tích ngắn, độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho kết quả chính xác và tin cậy. Cyproheptadin trong mẫu thử được chiết bằng methanol, sau đó làm sạch bằng d-SPE chứa 50 mg PSA và 50 mg C18 với mỗi mL dịch chiết. Phân tích sắc ký khối phổ chế độ ion hóa ESI+ sử dụng cột XBrigde C18 với pha động gồm acid formic 0,1% và ACN. Quy trình phân tích được thẩm định đạt yêu cầu theo AOAC về độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ đúng và độ chụm. Giới hạn phát hiện và định lượng thấp cho thấy phương pháp phù hợp để xác định Cyproheptadin trong mẫu thực. Kết quả phân tích mẫu thực phát hiện 01/30 dương tính với cyproheptadine, mẫu TPBVSK dạng siro. Từ các kết quả đạt được, nhóm nghiên cứu tiếp tục ứng dụng phương pháp để phân tích Cyproheptadin trong các mẫu thực phẩm chức năng trên thị trường cũng như phát triển phương pháp để phân tích đồng thời các chất trộn trái phép khác có tính chất và tác dụng tương tự trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. K. Church, M. Maurer, F. E. Simons *et al.*, *Risk of first-generation H(1)-antihistamines: a GA(2)LEN position paper*, *Allergy*, vol. 65, no. 4, pp. 459-66, 2010.
- [2]. S. Madani, O. Cortes, R. Thomas, "Cyproheptadin Use in Children With Functional Gastrointestinal Disorders," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 62, no. 3, pp. 409-413, 2016.
- [3]. Food and Drug Administration Philippines, FDA Advisory No. 2020-1271, *Public Health Warning Against the Purchase and Use of the Following Unregistered Drug Products*, 2020.
- [4]. Ministry of Health (Vietnam), Circular 10/2021/TT-BYT Prescribing nomenclature list of agents prohibited from production and business of health protection food, 2021.
- [5]. Sayann, T. Veeraiah, C. Reddy, "Determination of Cyproheptadine hydrochloride in Pure and Pharmaceutical forms: A Spectrophotometric study," *Oriental Journal of Chemistry*, nol. 31, no. 3, pp. 1779-1786, 2015.
- [6]. Pan Li, Cuifeng Yang, Beibei Liu, "Sensitive Immunochromatographic Assay Using Highly Luminescent Quantum Dot Nanobeads as Tracer for the Detection of Cyproheptadine Hydrochloride in Animal-Derived Food," *Frontiers in Chemistry*, vol. 8, no. 575, pp. 1-11, 2020.
- [7]. P. T. T. Tuyen, "Developing a method to identify some anti-allergy drugs illegally mixed in oriental medicinal products by LC-MS/MS," Master's thesis in pharmacy, Hanoi University of Pharmacy, 2019 (in Vietnamese).
- [8]. V. S. Nguyen, H. D. Le, "Validation of LC-MS/MS method for determination of cyproheptadine in dietary supplements," *Journal of Food and Nutrition Sciences*, vol. 18, no. 2E, pp. 9-15, 2022.

- [9]. J. A. Do, J. Kim, J. Choi *et al.*, "Development of a LC-MS/MS method for simultaneous analysis of 20 antihistamines in dietary supplements," *Analytical Science and Technology*, vol. 28, pp. 86-97, 2015.
- [10]. J. Kim, J. Choi, C. Yoon *et al.*, "LC-MS/MS monitoring of 22 illegal antihistamine compounds in health food products from the Korean market," *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, vol. 58, pp. 137-147, 2015.
- [11]. T. C. Son, *Method validation and measurement uncertainty assessment in chemical analysis*, Science and Technics Publishing House, 2021 (in Vietnamese).
- [12]. AOAC Official Method 2007.01, *Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate*, 2007.

Application of LC-MS/MS method for the determination of cyproheptadine in dietary supplements

Mac Thi Thanh Hoa¹, Nguyen Ngoc Diep², Vu Thi Thanh An^{1,3},
Nguyen Quang Hung¹, Nguyen Thi Van Anh², Cao Cong Khanh¹

¹National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

²Vietnam University of Traditional of Medicine, Hanoi, Vietnam

³Keimyung University, Daegu, Korea

Abstract

Cyproheptadine is an H1 antihistamine, that is often illegally added in dietary supplements to stimulate appetite and gain weight in children, currently banned for use in health supplements according to the provisions of Circular 10/2021-BYT. The method was using the Agilent Triple Quadrupole 6460 with fragments 288.1 → 96.1 and 288.1 → 191.2 selected for quantitative and qualitative. The separation was carried out on XBridge C18 column (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile and 0,1% formic acid. The analyte was extracted with methanol and cleaned up by d-SPE technique using a mixture of PSA and C18 powder. The recovery was in the range of 80-110%, the accuracy met the requirements of AOAC for method validation at spiked concentrations on three matrices of dietary supplements (granules, syrup, and powdered milk). Limits of detection and quantification were achieved at 0.08 mg/kg and 0.25 mg/kg with the syrup; 0.15 mg/kg and 0.50 mg/kg with granule and powdered milk samples. The method has been applied to analyze 30 samples and detected cyproheptadine in a syrup sample at 1.67 mg/dose of 10 mL. This method can be applied to analyzing cyproheptadine in dietary supplements on the market as well as developing for simultaneous determination of other adulterants with similar properties and effects in our next studies.

Keywords: Cyproheptadine, H1 anti-histamine, dietary supplements, LC-MS/MS.