

Research Article**Applications of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detector (CE-C⁴D) for the determination of glucosamine, vitamin B6 and minerals**

Nguyen Linh Trang¹, Nguyen Thi Thao Nguyen¹, Nguyen Quang Huy², Do Yen Nhi¹, Luu Thi Huyen Trang³, Vu Thi Trang³, Le Duc Dung¹, Hoang Quoc Anh¹, Pham Gia Bach¹, Pham Thi Ngoc Mai², Le Thi Hong Hao³, Nguyen Thi Anh Huong^{1*}

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

²Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy, Thai Nguyen, Vietnam

³National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

(Received: 22 Aug 2024; Revised: 12 Sep 2024; Accepted: 17 Sep 2024)

Abstract

Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detector (CE-C⁴D) is renowned for its numerous advantages, such as compact equipment, low cost of setup and operation, simplicity in functionality, and minimal use of samples and chemical solvents. This method has been applied across various fields, including environmental analysis, forensic science, biochemistry, pharmaceuticals, and food science. In this study, the CE-C⁴D method was applied to determine the presence of glucosamine, vitamin B6, and certain minerals in dietary supplements. Notably, glucosamine was simultaneously determined with calcium, and vitamin B6 with magnesium. The method was validated to meet the requirements of AOAC. The detection limits achieved for calcium, glucosamine, vitamin B6 and magnesium were 0.05 ppm; 0.50 ppm; 0.10 ppm and 1.00 ppm, respectively. The concurrent determination of active substances with different properties within a single product is crucial, optimizing analytical efficiency and yielding high accuracy for the analysis.

Keywords: CE-C⁴D, vitamin B6, glucosamine, calcium, magnesium, dietary supplements.

* Corresponding author: Nguyen Thi Anh Huong (E-mail: nguyenthianhhuong@hus.edu.vn)

Doi: <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4373>

Copyright © 2024 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Ứng dụng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) trong xác định glucosamin, vitamin B6 và một số khoáng chất

Nguyễn Linh Trang¹, Nguyễn Thị Thảo Nguyên¹, Nguyễn Quang Huy², Đỗ Yến Nhi¹, Lưu Thị Huyền Trang³, Vũ Thị Trang³, Lê Đức Dũng¹, Hoàng Quốc Anh¹, Phạm Gia Bách¹, Phạm Thị Ngọc Mai³, Lê Thị Hồng Hảo³, Nguyễn Thị Ánh Hường¹

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

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Thái Nguyên, Thái Nguyên, Việt Nam

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

Tóm tắt

Phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) được biết đến với nhiều ưu điểm như thiết bị nhỏ gọn, chi phí thiết bị và vận hành thấp, hoạt động đơn giản, lượng mẫu và dung môi hóa chất sử dụng ít. Phương pháp đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: phân tích môi trường, pháp y, y sinh, dược phẩm và thực phẩm. Trong nghiên cứu này, phương pháp CE-C⁴D đã được ứng dụng để xác định glucosamin, vitamin B6 và một số khoáng chất trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Trong đó, glucosamin được xác định đồng thời với canxi, vitamin B6 xác định đồng thời với magie. Phương pháp đã được thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC. Giới hạn phát hiện đạt được với canxi, glucosamin, vitamin B6 và magie tương ứng là 0,05 ppm; 0,50 ppm; 0,10 ppm và 1,00 ppm. Việc xác định đồng thời các hoạt chất có tính chất khác nhau cùng phối hợp trong một sản phẩm là rất quan trọng, vừa tối ưu hóa hiệu quả phân tích, vừa mang lại độ chính xác cao cho phép phân tích.

Từ khóa: CE-C⁴D, vitamin B6, glucosamin, canxi, magie, thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) ngày càng được sử dụng rộng rãi nhằm giúp tăng cường, bổ trợ, nâng cao sức đề kháng cho người sử dụng. Do có nguồn gốc từ tự nhiên nên các sản phẩm này rất được ưa chuộng trên toàn thế giới [1]. Tuy nhiên, một số sản phẩm đã bị làm giả hoặc bổ sung trái phép các chất không được dùng cho TPBVSK, gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người tiêu dùng [2, 3]. Do đó, việc đảm bảo chất lượng và sản phẩm an toàn ngày càng được quan tâm. Để kiểm nghiệm chất lượng các sản phẩm TPBVSK, nhiều phương pháp phân tích khác nhau đã được sử dụng. Trong đó, phương pháp quang phổ (UV-Vis, AAS, ICP-MS,...) thường được sử dụng để xác định các khoáng chất như Mg, Ca,... trong khi đó, phương pháp sắc ký lỏng kết nối các detector khác nhau thường được sử dụng để xác định các hợp chất hữu cơ như vitamin, glucosamin,... [4-7]. Các thiết bị này thường được triển khai tại các phòng thí nghiệm tuyến trung ương hoặc các thành phố lớn do có chi phí đầu tư và vận hành cao. Tuy nhiên, chúng lại không phù hợp để triển khai

ở các phòng thí nghiệm tuyến địa phương với ngân sách hạn chế và đòi hỏi cơ sở hạ tầng phức tạp, chi phí đầu tư và vận hành cao, cần đội ngũ có tay nghề kỹ thuật.

Mặt khác, các sản phẩm TPBVSK thường được phối hợp đồng thời nhiều thành phần nhằm tăng cường hiệu quả [1-3]. Ví dụ, glucosamin thường được kết hợp cùng canxi (một khoáng chất cần thiết trong sự hình thành và chuyển hóa của xương) trong các TPBVSK liên quan đến các vấn đề về xương khớp. Bên cạnh đó, magie là một loại khoáng chất thường được kết hợp với vitamin B6 giúp duy trì lượng đường huyết, ngăn ngừa bệnh tim mạch, cải thiện hệ thần kinh và phát triển thai nhi [3]. Tuy nhiên, hầu hết các phương pháp hiện nay đều xác định các chất một cách riêng rẽ, dù sản phẩm bổ sung đồng thời nhưng lại cần dùng nhiều phương pháp khác nhau để kiểm nghiệm. Do đó, nếu có một quy trình phân tích đồng thời các chất sẽ giúp tăng cường hiệu quả phân tích, đặc biệt trong cùng một sản phẩm.

Phương pháp điện di mao quản tích hợp detector đo độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) [8] có ưu điểm vượt trội là có thể xác định được đồng thời các chất có tính chất hoàn toàn khác nhau như một số loại khoáng chất (Mg, Ca) và một số vi chất hữu cơ (glucosamin, vitamin nhóm B). Hơn nữa, phương pháp CE-C⁴D còn có các ưu điểm như: trang thiết bị nhỏ gọn, có thể tự động hóa, sử dụng lượng mẫu và hóa chất nhỏ, chi phí phân tích thấp. Do đó, nghiên cứu này giới thiệu hai ứng dụng của phương pháp CE-C⁴D nhằm xác định đồng thời các chất có tính chất khác nhau cùng phối hợp trong một sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe: (1) canxi và glucosamin trong sản phẩm hỗ trợ xương khớp và (2) vitamin B6 và magie trong sản phẩm hỗ trợ tim mạch.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng/vật liệu nghiên cứu

Đối tượng của nghiên cứu này gồm chất phân tích là glucosamin, canxi, B6, magie và các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa các hoạt chất này.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất, chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết bao gồm:

Chất chuẩn:

+ Glucosamin hydroclorid (Sigma- Aldrich; độ tinh khiết 99,8%; số lô BCCB2605).

Dung dịch chuẩn gốc glucosamin 1000 ppm: cân chính xác 0,025 gam chất chuẩn glucosamin hydrochloride, hòa tan bằng nước deion vào bình định mức 25 mL và định mức đến vạch.

+ Dung dịch chuẩn Ca²⁺ 1000 ppm (Merck; độ tinh khiết 98%; số lô 03.S.15.02))

+ Vitamin B6 (pyridoxin hydrochloride) (Chất chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương; độ tinh khiết 99%; số lô G1162253).

Dung dịch chuẩn gốc vitamin B6 500 ppm: cân chính xác 12,63 mg chất chuẩn vitamin B6, hòa tan bằng nước deion vào bình định mức 25 mL và định mức đến vạch.

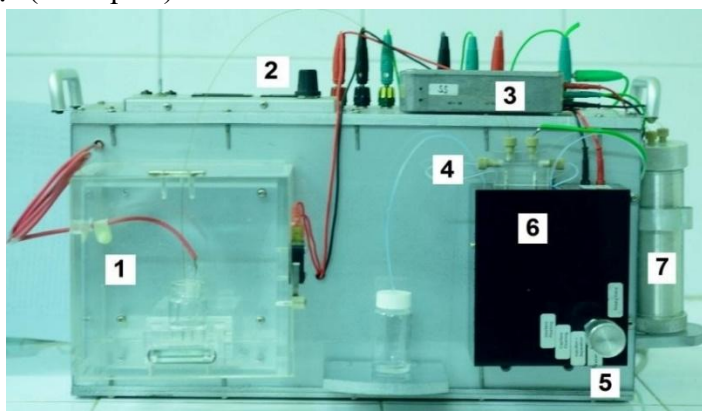
+ Magie nitrat (Mg(NO₃)₂.6H₂O) (Merck; độ tinh khiết 98%; số lô 2064886).

Dung dịch chuẩn gốc Mg²⁺ 500 ppm: cân chính xác 131,87 mg Mg(NO₃)₂.6H₂O hòa tan bằng nước deion vào bình định mức 25 mL và định mức đến vạch.

Các hóa chất khác: Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (Fluka, >99%), *N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS) (Fluka, >99%), Acid acetic (Ace) (Merck, > 99%), L-Histidin (His) (Fluka, >99%), Arginin (Arg) (Fluka, >99%), acid trichloroacetic (TCA) (Merck, > 99%). Nước deion được sử dụng trong nghiên cứu này.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị CE- C^4D (Hình 1) sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Công ty 3Sanalysis (<http://www.3sanalysis.vn/>). Thiết bị CE- C^4D có nguồn thế cao lên đến 25 kV, sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (C^4D). Các 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 [8]. Phương pháp được phát triển mạnh mẽ trong những năm gần đây và có nhiều ưu điểm như: hoạt động đơn giản, chi phí đầu tư và vận hành thấp, tốn ít mẫu và dung môi, hóa chất, cho hiệu quả tách tương đối tốt. Đặc biệt, phương pháp có tiềm năng xác định đồng thời các hoạt chất có tính chất khác nhau trong cùng một lần đo do đặc điểm phân tích dựa trên sự di chuyển khác nhau của các ion trong dung dịch điện ly dưới tác dụng của điện trường khi áp điện thế cao vào hai đầu cột (mao quản) tách.



Hình 1. Ảnh chụp hệ thiết bị CE- C^4D sử dụng trong nghiên cứu (1: Hộp thế an toàn, 2: Bộ điều khiển cao thế, 3: Cảm biến độ dẫn không tiếp xúc, 4: Ống dẫn dung dịch đệm, 5: Núm điều chỉnh, 6: Bộ phận điều khiển, 7: Bình khí nén)

Ngoài thiết bị CE- C^4D , nghiên cứu cũng sử dụng hệ thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang (HPLC-FLD), với detector mảng diod quang (HPLC-PDA) và quang phổ phát xạ nguyên tử plasma cảm ứng (ICP-OES) trong phân tích đối chứng và một số thiết bị, dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm như: máy ly tâm của hãng LCEN -200, máy rung siêu âm có gia nhiệt BRANSON 521, máy đo pH của hãng HANNA, tủ lạnh Sanaky VH-2899W, cân phân tích với độ chính xác 0,1mg.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu

Các mẫu TPBVSK chứa các hoạt chất nghiên cứu (có ghi trên nhãn) được mua ngẫu nhiên tại các nhà thuốc trên địa bàn Hà Nội. Mẫu trắng là mẫu TPBVSK không chứa chất phân tích (trên nhãn không có hàm lượng các chất phân tích, phân tích bằng các phương pháp phân tích tương ứng đều cho kết quả không phát hiện các chất phân tích) được sử dụng để khảo sát và đánh giá phương pháp.

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [4-7] và khảo sát thực tế, quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau: Mẫu TPBVSK (dạng viên nang) được tháo vỏ nang, lấy phần bên trong, nghiền mịn (nếu cần); mẫu dạng viên nén được nghiền mịn, trộn đều thành dạng bột đồng nhất. Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001 g). Thêm 25 mL dung dịch acid trichloroacetic (TCA) 4%, rung siêu âm trong 30 phút và ly tâm trong 15 phút. Chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 25 mL, định mức tới vạch bằng TCA 4%. Dung dịch được lọc qua màng lọc 0,45 μm và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

2.4.2. Phương pháp phân tích

Phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) được sử dụng trong nghiên cứu. Trong đó, các điều kiện phân tích được khảo sát sử dụng hệ thiết bị CE-C⁴D với cột mao quản đường kính trong 50 μm có chiều dài 50 cm (chiều dài hiệu dụng 35 cm). Các điều kiện này được giữ nguyên trong tất cả các thí nghiệm. Các điều kiện khảo sát bao gồm: dung dịch đệm điện ly (thành phần, pH, nồng độ dung dịch), thế tách, điều kiện bơm mẫu (thời gian và chiều cao bơm mẫu). Việc khảo sát được thực hiện theo phương pháp đơn biến, thay đổi một thành phần trong khi giữ nguyên các thành phần còn lại để thu được thông số phù hợp đáp ứng các yêu cầu phân tích.

Các phương pháp phân tích đối chứng cũng được sử dụng bao gồm: sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang (HPLC-FLD) phân tích glucosamin [4], với detector mảng diod quang (HPLC-PDA) phân tích vitamin B6 [5], quang phổ phát xạ nguyên tử plasma cảm ứng (ICP-OES) phân tích canxi và magie [7].

2.4.3. Đánh giá phương pháp

Phương pháp phân tích được đánh giá thông qua các thông số cơ bản như: xây dựng đường chuẩn; xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ); đánh giá độ chụm thông qua độ lặp lại (độ lệch chuẩn tương đối RSD%) và độ đúng thông qua độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định của AOAC [9].

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

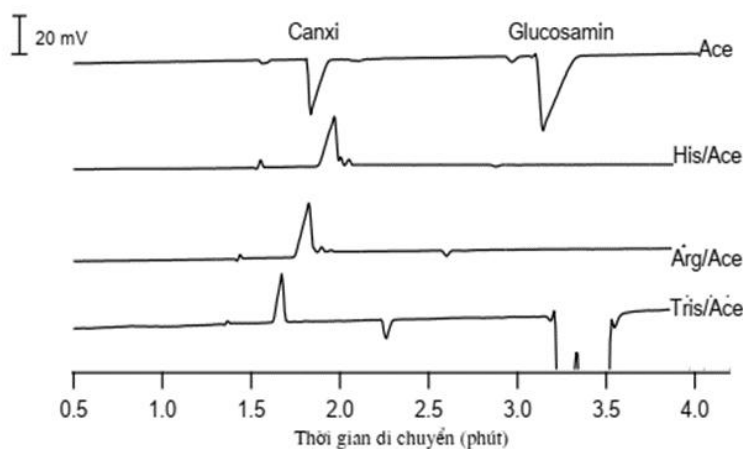
Các kết quả đánh giá phương pháp và phân tích mẫu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Hàm lượng các chất trong TPBVSK được định lượng bằng phương pháp thêm chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xác định đồng thời canxi và glucosamin

3.1.1. Khảo sát điều kiện phân tích đồng thời canxi và glucosamin bằng phương pháp CE-C⁴D

Với công thức cấu tạo có sự xuất hiện của nhóm NH₂ (pK_a = 7,58) thì khi pH < pK_a glucosamin tồn tại ở dạng cation (R-NH₃⁺). Do đó, các dung dịch điện ly phân tích đồng thời glucosamin và canxi cần có pH dưới 7,0 nhằm đảm bảo các chất phân li hoàn toàn ở dạng cation. Khi đó, phân cực dương được sử dụng để phân tích các chất ở dạng cation. Các hệ đệm điện ly được khảo sát có hợp phần base là Arg, Tris, His kết hợp với hợp phần acid là acid acetic, đồng thời dung dịch điện ly chỉ bao gồm acid acetic cũng được tiến hành khảo sát. Kết quả được thể hiện trong Hình 2.



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

Kết quả ở Hình 3 cho thấy, dung dịch điện ly Ace cho tín hiệu pic của hai chất phân tích tốt nhất trong các hệ đệm, đường nền ổn định nên sẽ được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Nồng độ dung dịch điện ly Ace cũng được khảo sát với các giá trị là 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM và 400 mM. Kết quả cho thấy, dung dịch điện ly Ace 200mM cho đường nền ổn định và pic hai chất có tín hiệu tốt nhất. Do đó, nồng độ dung dịch điện ly Ace 200 mM được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.

Thế tách tạo ra lực điện trường và dòng điện trong mao quản, điều khiển, duy trì và là một yếu tố quan trọng quyết định kết quả điện di các chất phân tích. Việc khảo sát thế tách đồng thời glucosamin và canxi được thực hiện ở +12 kV, +15 kV và +20kV. Kết quả khảo sát thu được cho thấy, khi tăng thế tách từ +12 kV đến +20 kV, các chất phân tích có thời gian di chuyển nhanh hơn. Tại thế +20 kV, tín hiệu của đường nền thu được bị nhiễu và diện tích pic của các chất phân tích thấp hơn thế +15 kV. Với thế +12 kV, pic của glucosamin không được cân đối, doãng chân và thời gian phân tích các chất bị kéo dài. Do đó, thế tách +15 kV được lựa chọn để phân tách đồng thời canxi và glucosamin bằng phương pháp CE-C⁴D.

Trong nghiên cứu này, phương pháp thủy động học kiểu xi phong được lựa chọn để bơm mẫu vào cột tách. Trong đó, chiều cao và thời gian bơm mẫu được khảo sát nhằm thu được độ nhạy và khả năng tách tốt nhất cho các chất phân tích. Các thời gian bơm mẫu được khảo sát (khi giữ nguyên chiều cao bơm mẫu 15 cm) là 10 s, 20 s, 30 s và 40 s; các chiều cao bơm mẫu được lựa chọn khảo sát (khi giữ nguyên thời gian bơm mẫu 20 s) gồm: 5 cm, 10 cm và 15 cm. Kết quả thu được cho thấy các giá trị chiều cao và thời gian bơm mẫu tối ưu được lựa chọn cho kết quả tín hiệu đủ lớn, phân tách tốt là 10 cm và 20 s.

3.1.2. Đánh giá phương pháp

Trước hết, đường chuẩn xác định các chất được xây dựng trong khoảng 0,5-100,0 ppm đối với canxi và 2,0 - 100,0 ppm đối với glucosamin. Mỗi dung dịch được đo lặp lại 3 lần ở các điều kiện phân tích đã lựa chọn. Giá trị trung bình của các lần đo lặp lại là số liệu để dựng đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ. Các kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Phương trình đường chuẩn của canxi và glucosamin

Tên chất	Phương trình đường chuẩn ($y=a+bx$)	R	P
Canxi	$y = (20,4734 \pm 0,7883) + (4,0966 \pm 0,0169)x$	0,99993	< 0,001
Glucosamin	$y = (0,3003 \pm 0,3905) + (1,2329 \pm 0,0083)x$	0,99982	< 0,001

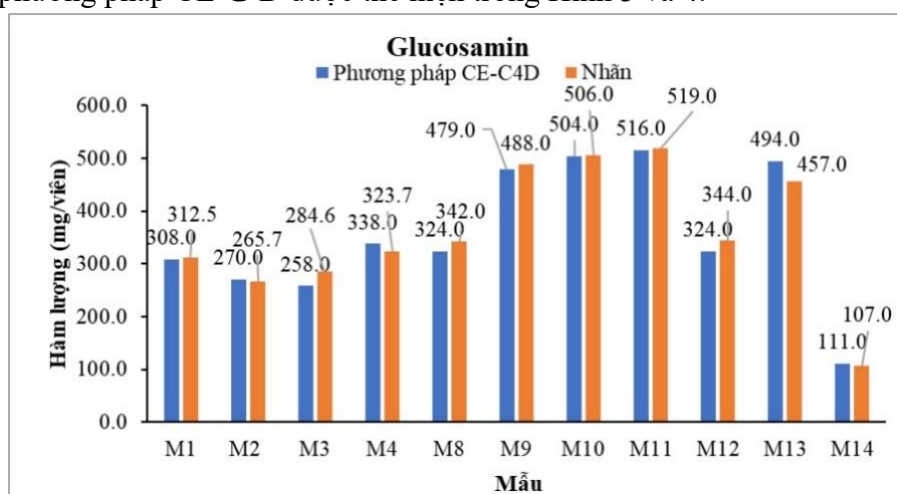
Kết quả thu được cho thấy, các hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ các chất phân tích đều khá tốt ($R \geq 0,9998$), đồng thời các giá trị $P < 0,05$ với cả hai chất chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính.

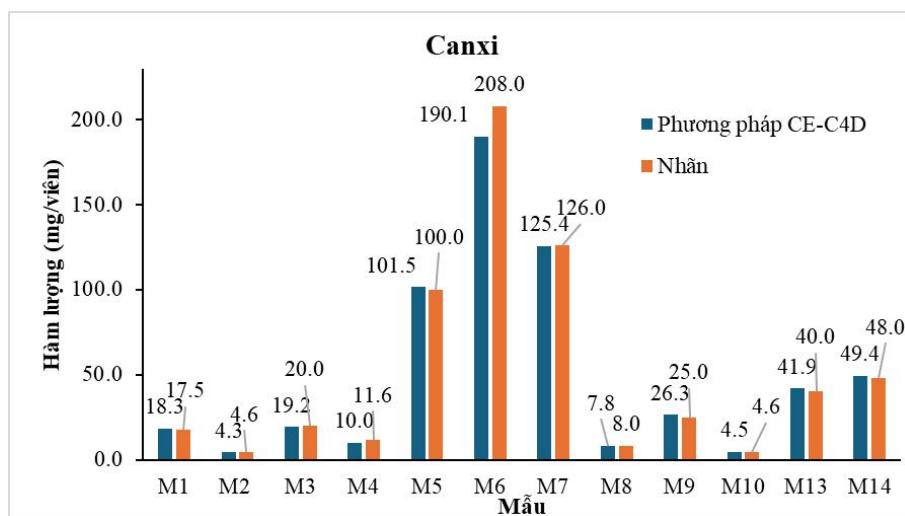
Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách pha loãng dần và đo hỗn hợp dung dịch chuẩn canxi, glucosamin cho đến khi thu được tín hiệu gấp 3 lần so với nhiễu đường nền ($S/N=3$). Giới hạn định lượng (LOQ) được tính bằng 10 S/N ($\approx 3,3$ LOD). Kết quả thu được giới hạn phát hiện đối với canxi là 0,05 ppm và glucosamin là 0,50 ppm. Từ đó, giới hạn định lượng của glucosamin và canxi tương ứng là 0,17 ppm và 1,67 ppm.

Độ chụm của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại và độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi thực hiện với mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức hàm lượng glucosamin là: 5,0 ppm, 20,0 ppm và 50,0 ppm; canxi ở 3 mức hàm lượng là: 0,5 ppm, 10,0 ppm và 50,0 ppm; mỗi mức được tiến hành lặp lại 3 lần độc lập. Kết quả cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) thu được đều nhỏ hơn 5%. Độ thu hồi của canxi nằm trong khoảng 97,2-106,0% và glucosamin trong khoảng 92,0-103,5%. Như vậy, phương pháp có độ lặp lại và độ thu hồi đáp ứng theo yêu cầu của AOAC (với nồng độ trong khoảng 0,5-100,0 mg/L, độ thu hồi và độ lệch chuẩn tương đối lần lượt nằm trong khoảng 80-110% và nhỏ hơn 7,3%) [9].

3.1.3. 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 đồng thời hàm lượng glucosamin và canxi trong 14 mẫu TPBVSK thu thập ngẫu nhiên tại các nhà thuốc trên địa bàn Hà Nội. Hàm lượng các chất xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Kết quả so sánh giữa hàm lượng các chất công bố trên nhãn của nhà sản xuất và phân tích bằng phương pháp CE- C^4 D được thể hiện trong Hình 3 và 4.

**Hình 3.** Đồ thị so sánh hàm lượng glucosamin trên nhãn và phân tích bằng CE- C^4 D



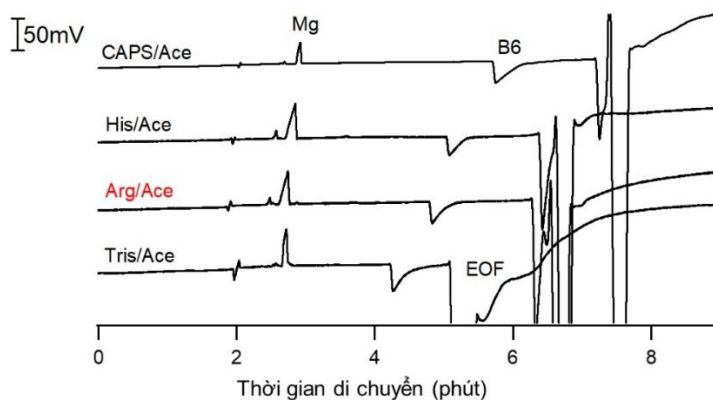
Hình 4. Đồ thị so sánh hàm lượng canxi trên nhãn và phân tích bằng CE-C⁴D

Kết quả ở Hình 3 và 4 cho thấy, hàm lượng các chất phân tích theo công bố của nhà sản xuất và kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D sai khác đều nhỏ hơn 10%. Đồng thời, kết quả này cũng được so sánh với các phương pháp đối chứng cho sự sai khác trong khoảng – 6,88% đến + 6,61%. Giá trị P_{value} khi so sánh từng cặp theo chuẩn student (chuẩn t) đều lớn hơn 0,05, cho thấy phương pháp CE-C⁴D là đáng tin cậy.

3.2. Xác định đồng thời magie và vitamin B6

3.2.1. Khảo sát điều kiện phân tích đồng thời magie và vitamin B6 bằng phương pháp CE-C⁴D

Công thức cấu tạo của vitamin B6 có sự xuất hiện của nhóm NH_2 ($\text{pK}_a = 9,4$) nên khi dung dịch điện ly có $\text{pH} < \text{pK}_a$, vitamin B6 tồn tại ở dạng cation (R-NH_3^+). Do đó, các dung dịch điện ly phân tích đồng thời vitamin B6 và magie cần có pH xung quanh khoảng 4,0-7,0 nhằm đảm bảo các chất phân li hoàn toàn ở dạng cation. Bốn dung dịch đệm điện ly sử dụng phổ biến trong phương pháp CE-C⁴D được lựa chọn khảo sát là: CAPS/Ace, His/Ace, Arg/Ace, Tris/Ace (10 mM) với các giá trị pH khảo sát gồm: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0. Kết quả khảo sát đại diện ở pH 5,0 của bốn hệ đệm điện ly được thể hiện trong Hình 5.



Hình 5. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly đến sự phân tách của Mg^{2+} và vitamin B6

Kết quả trong Hình 5 cho thấy, với loại đệm Tris/Ace, tín hiệu của vitamin B6 gần dòng EOF nên bị ảnh hưởng bởi dòng EOF. Đối với đệm His/Ace, pic của vitamin B6 nhỏ hơn so với ba loại đệm còn lại. Ngược lại, đệm CAPS/Ace và Tris/Ace cho tín hiệu pic Mg^{2+} nhỏ. Với đệm Arg/Ace, pic chất vitamin B6 xa dòng EOF và tín hiệu của hai chất phân tích đều tốt. Đồng thời, kết quả khảo sát pH trong khoảng 4,0 - 7,0 cho thấy pH 5,0 cho kết quả phân tách và tín hiệu các chất tốt nhất. Do đó, dung dịch đệm điện ly Arg/Ace pH 5,0 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

ACN được thêm vào dung dịch điện ly đã chọn (Arg/Ace) để làm giảm độ phân cực của dung dịch điện ly, hòa tan tốt hơn các chất phân tích. Tỷ lệ thành phần ACN trong dung dịch đệm điện ly cũng được khảo sát trong khoảng 0 - 50%. Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ ACN 20% cho thời gian phân tích phù hợp, hiệu quả tách cao và diện tích pic đủ lớn. Do đó, hệ đệm điện ly Arg/Ace + ACN 20%, pH 5,0 được lựa chọn trong nghiên cứu này.

Nồng độ của dung dịch đệm điện ly Arg/Ace cũng được khảo sát với 3 giá trị là Arg 8 mM, 10 mM và 12 mM. Kết quả cho thấy, ở nồng độ Arg 10 mM cho đường nền ổn định, thời gian xuất hiện hợp lý, khả năng tách hai chất tốt, bên cạnh đó nồng độ Arg 8 mM thu được tín hiệu pic lớn nhất nhưng khả năng tách hai chất vitamin B6 và Mg^{2+} lại kém nhất và độ phân giải chưa cao, còn ở nồng độ 12 mM cho tín hiệu pic bé nhất, thời gian phân tích lâu hơn. Do đó, nồng độ Arg là 10 mM được lựa chọn để phân tích đồng thời Mg^{2+} và vitamin B6.

Các thế tách được lựa chọn để khảo sát nhằm phân tách đồng thời Mg^{2+} và vitamin B6 gồm: +15 kV, +18 kV, +20 kV và +25 kV. Kết quả cho thấy, khi áp thế từ +15 kV đến +25 kV, thời gian di chuyển của các chất giảm dần, hiệu quả tách cũng giảm dần. Tại thế tách +25 kV, thời gian di chuyển của các chất ngắn hơn so với các thế tách còn lại nhưng hiệu quả tách kém hơn vì khi tăng thế tách, dòng điện I tăng sẽ gây ra hiệu ứng nhiệt Jun lớn làm mao quản nóng lên, giảm hiệu quả tách. Tại thế tách +15 kV và +18 kV, thời gian phân tích dài. Ở thế tách +20 kV cho độ phân giải, hiệu quả tách tốt, đường nền ổn định và thời gian phân tích phù hợp. Do đó, thế tách +20 kV được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Thời gian và chiều cao bơm mẫu trong phương pháp thủy động học kiểu xi phong đã được khảo sát với các giá trị tương ứng là 20 s, 25 s, 30 s và 15 cm, 20 cm và 25 cm. Kết quả các giá trị chiều cao và thời gian bơm mẫu tối ưu được lựa chọn nhằm thu được tín hiệu các chất đủ lớn, khả năng phân tách tốt nhất là 20 cm và 25 s.

3.2.2. Đánh giá phương pháp

Đường chuẩn xác định magie được xây dựng trong khoảng 0,3- 200 ppm, vitamin B6 trong khoảng 3,0-100,0 ppm. Mỗi dung dịch được phân tích lặp lại 3 lần. Giá trị trung bình của diện tích pic được sử dụng để dựng đường chuẩn. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

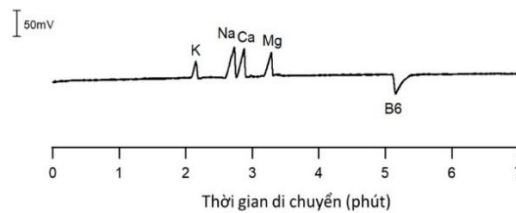
Bảng 2. Phương trình đường chuẩn của magie và vitamin B6

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R^2	P
Mg^{2+}	$Y = (0,04000 \pm 0,00058)X + (0,09472 \pm 0,05421)$	0,9992	< 0,001
Vitamin B6	$Y = (0,01271 \pm 0,00020)X + (0,04360 \pm 0,01089)$	0,9991	< 0,001

Kết quả trong Bảng 2 cho thấy, đường chuẩn xác định magie và vitamin B6 có hệ số tương quan tốt $R^2 > 0,999$ và các giá trị $P < 0,001$, chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính tốt.

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách pha loãng dần hỗn hợp dung dịch chuẩn của Mg^{2+} và vitamin B6 đến khi tín hiệu thu được gấp 3 lần so với nhiễu đường nền ($S/N = 3$). Giới hạn định lượng (LOQ) là giá trị nồng độ tại đó tín hiệu thu được gấp 10 lần so với nhiễu đường nền ($S/N = 10$). Kết quả LOD và LOQ của Mg^{2+} lần lượt là 0,10 ppm và 0,33 ppm; của vitamin B6 lần lượt là 1,00 ppm và 3,30 ppm.

Để đánh giá độ chọn lọc, sự có mặt của các cation K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} (20 ppm) cùng với các vitamin B1, B5, B6, B9 (100 ppm) đã được khảo sát. Kết quả điện di đồ thu được trong Hình 6 cho thấy, tín hiệu của các ion kim loại K^+ , Na^+ , Ca^{2+} cách xa tín hiệu của Mg^{2+} và không thấy xuất hiện các vitamin B1, B5, B9, chứng tỏ phương pháp phân tích đồng thời Mg^{2+} và vitamin B6 có độ chọn lọc tốt.

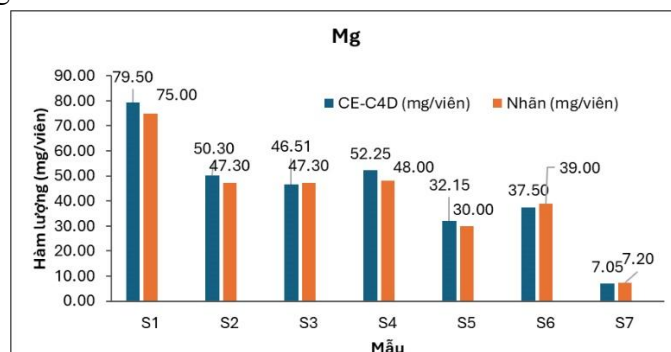


Hình 6. Điện di đồ đánh giá độ chọn lọc của phương pháp phân tích đồng thời Mg^{2+} và vitamin B6

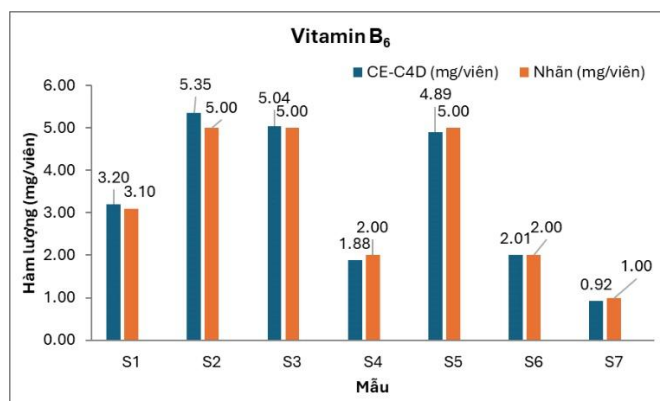
Kết quả đánh giá độ chụm ($n = 6$) và độ đúng trên nền mẫu trắng thêm chuẩn ở ba mức hàm lượng vitamin B6 là 20,0; 40,0; 60,0 ppm và magie là 50,0; 100,0; 150,0 ppm cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các chất phân tích đều nhỏ hơn 3%, độ thu hồi đạt được trong khoảng 98,75-101,00%. Như vậy, phương pháp có độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC (mức nồng độ từ trên 10 mg/L tới 200 mg/L, độ thu hồi nằm trong khoảng 80-110%) [9].

3.2.3. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Phương pháp sau khi thẩm định đã được áp dụng để phân tích bảy mẫu TPBVSK được mua ngẫu nhiên tại các nhà thuốc trên địa bàn Hà Nội. Hàm lượng của magie và vitamin B6 trong các mẫu được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Kết quả so sánh giữa hàm lượng các chất công bố trên nhãn của nhà sản xuất và phân tích bằng phương pháp CE- C^4 D được thể hiện trong Hình 7 và Hình 8.



Hình 7. Đồ thị so sánh hàm lượng magie trên nhãn và phân tích bằng CE- C^4 D



Hình 8. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B6 trên nhãn và phân tích bằng CE-C⁴D

Kết quả ở Hình 7 và 8 cho thấy, hàm lượng magie và vitamin B6 trong TPBVSK dao động trong khoảng từ 0,92 đến 79,50 mg/viên. So sánh công bố trên nhãn với hàm lượng phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D cho thấy có sự sai khác trong khoảng từ –8,00% đến +8,85%. Việc phân tích đối chứng cũng được thực hiện bằng phương pháp ICP-OES (đối với magie) và HPLC-PDA (đối với vitamin B6). Kết quả cho thấy, sai khác giữa phương pháp CE-C⁴D và các phương pháp đối chứng dao động trong khoảng –6,36% đến +6,31%, hệ số tương quan giữa các phương pháp đều lớn hơn 0,99. Kết quả so sánh từng cặp theo chuẩn t đều lớn hơn 0,05, cho thấy phương pháp CE-C⁴D đáng tin cậy.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công trong việc ứng dụng phương pháp CE-C⁴D nhằm xác định đồng thời hàm lượng glucosamin với canxi và vitamin B6 với magie trong mẫu TPBVSK. Phương pháp đã được thẩm định về độ tuyến tính trong khoảng đường chuẩn, độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu AOAC. Kết quả phân tích hàm lượng các chất trong mẫu TPBVSK đã được đối chứng với phương pháp HPLC-FLD (đối với glucosamin), HPLC-PDA (đối với vitamin B6) và ICP-OES (đối với canxi, magie), cho thấy phương pháp CE-C⁴D đáng tin cậy. Phương pháp cho thấy có tiềm năng áp dụng để xác định đồng thời các hoạt chất có tính chất khác nhau cùng phối hợp trong cùng một sản phẩm (như: glucosamin và canxi, vitamin B6 và magie), nâng cao hiệu quả phân tích khi chỉ cần sử dụng một quy trình phân tích duy nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Dickinson, J. Blatman, N. El-Dash, and J. C. Franco, “Consumer usage and reasons for using dietary supplements: report of a series of surveys,” *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 33, no. 2, pp. 176-182, 2014.
- [2]. G. B. der Voet, A. Sarafanov, T. I. Todorov, et al, “Clinical and analytical toxicology of dietary supplements: a case study and a review of the literature,” *Biological Trace Element Research*, vol. 125, no. 1, pp. 1-12, 2008.
- [3]. WHO, FAO, “Vitamin and mineral requirements in human nutrition,” *World Health Organization*, 194-216, 2004.

- [4]. H. Harmita, C.Jatmika, and M.I.Nugraha, "Determination of levels of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in mixtures in tablet and cream forms using high-performance liquid chromatography with fluorescence," *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 9, pp.144- 149, 2017.
- [5]. A. M. Farag, M. S. Rizk, H. A. El-Bassel, and M. H. Youssif, "Fast and efficient RP-HPLC method for simultaneous determination of water-soluble vitamins in some nutraceutical supplements," *Egyptian Journal of Chemistry*, vol. 62, no. 12, pp. 2195–2211, 2019.
- [6]. P. Gaonkar, V.Khanvilkar, R.Shettigar, and C.Gadgoli, "Spectrophotometric method for determination of glucosamine in tablets," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 68, no. 1, pp. 83-84, 2006.
- [7]. A. Krejčová, D. Kahoun, T. Černohorský, and M. Pouzar, "Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction," *Food Chemistry*, vol. 98, pp. 171-178, 2006.
- [8]. Thi Anh Huong Nguyen, Thi Ngoc Mai Pham, Thi Tuoi Doan, et al, "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.
- [9]. G. W. Latimer, "AOAC Official Methods of Analysis- Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements," AOAC International, 2012.