

Xác định glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp CE-C⁴D

Đặng Thị Huyền My¹, Nguyễn Thị Ngọc Ly¹, Đỗ Yến Nhi¹, Vũ Tùng Lâm¹,
Đinh Thị Diệu², Kiều Thị Lan Phương^{1,3}, Hoàng Quốc Anh¹, Trần Cao Sơn³,
Nguyễn Thị Minh Thu¹, Nguyễn Quang Huy^{1,4*}, Nguyễn Thị Ánh Hoàng[†]

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

²Khoa Môi trường, 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: 04/05/2022; Ngày chấp nhận đăng: 04/06/2022)

Tóm tắt

Phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) với các ưu điểm như đơn giản, hiệu quả, chi phí thấp đã được nghiên cứu nhằm xác định glucosamine trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Điều kiện phân tích được lựa chọn bao gồm: đệm Tris/Ace 10 mM; pH 5,0; chiều cao bơm mẫu 25 cm; thời gian bơm mẫu 30 s; thế tách +20 kV. Phương pháp thu được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của glucosamine tương ứng là 8,00 ppm và 26,67 ppm. Đường chuẩn được xây dựng trong khoảng nồng độ glucosamine từ 20 đến 1000 ppm cho hệ số tương quan tuyến tính tốt ($R^2 = 0,9993$). Độ lặp được đánh giá qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thí nghiệm lặp lại ($n = 3$) nằm trong khoảng 1,28% đến 2,33%, cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt. Độ thu hồi của glucosamine trong các mẫu thêm chuẩn đạt giá trị từ 95,2% đến 102,3%. Phương pháp đã được áp dụng để xác định hàm lượng glucosamine trong 10 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe với kết quả dao động trong khoảng từ 432,1 mg/viên đến 855,3 mg/viên. So với công bố trên nhãn, hàm lượng các dạng glucosamine phân tích được có sự sai khác trong khoảng từ -14,5% đến +8,0%. Kết quả đã được phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC-FLD do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia thực hiện, cho thấy sự tương đồng giữa hai phương pháp (sai khác dưới 15%).

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Glucosamine là một amino-monosaccharide (Hình 1), là nguyên liệu tổng hợp proteoglycan- một chất có vai trò quan trọng đối với sụn và các mô xương khớp [1]. Glucosamine đồng thời ức chế enzym phá hủy sụn khớp như collagenase, phospholipase A2

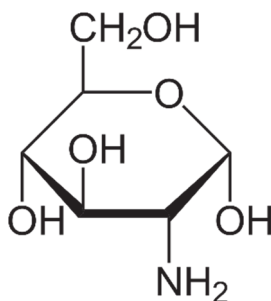
* Điện thoại: 0944100039

Email: huydhydnscs@gmail.com

† Điện thoại: 0946593969

Email: nguyenthianhhuong@hus.edu.vn

và giảm gốc tự do superoxide phá hủy tế bào sinh sụn, kích thích sản xuất mô liên kết của xương, giảm quá trình mất canxi của xương [1-2]. Glucosamine còn làm tăng sản xuất chất nhầy dịch khớp nên làm tăng khả năng bôi trơn của dịch khớp, giúp giảm ma sát giữa các khớp và giảm đau. Vì thế, glucosamine không chỉ làm giảm triệu chứng của thoái hóa khớp (đau, cứng khớp, khó vận động) mà còn ngăn bệnh tiến triển, phục hồi cấu trúc sụn khớp, không chỉ điều trị triệu chứng mà còn giúp điều trị tận gốc [3-4].



Hình 1. Công thức cấu tạo của glucosamine

Glucosamine được bổ sung chủ yếu bằng thuốc uống với liều dùng từ 1250-1500 mg/ngày [5-6]. Các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe bổ sung glucosamine trên thị trường có ba dạng chính: glucosamine sulfate, glucosamine hydrochloride và *N*-acetyl glucosamine, trong đó dạng muối sulfate được cho là dễ hấp thu, dung nạp tốt nhất và cho hiệu quả nhất trong điều trị [5]. Trên thị trường có rất nhiều sản phẩm bổ sung glucosamine được sản xuất trong nước, cũng như nhập khẩu từ nước ngoài như Nhật, Mỹ, Úc,... Để đánh giá chất lượng các sản phẩm chăm sóc sức khỏe chứa glucosamine, việc xây dựng và thẩm định các phương pháp phân tích glucosamine trong loại mẫu này là rất cần thiết.

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: phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [6-8], quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) [9-10], điện di mao quản (CE) [11-12]. Trong đó, phương pháp CE được sử dụng ngày càng phổ biến, tùy thuộc vào cấu trúc phân tử, tính chất hóa lý, nồng độ, giới hạn cho phép của glucosamine mà lựa chọn detector phù hợp như detector độ dẫn, khối phổ (MS/MS), detector UV,... Hệ thiết bị CE-C⁴D có các ưu điểm như gọn nhẹ, hiệu quả tách cao, tốn ít hóa chất và mẫu phân tích, có thể tối ưu hóa để phân tích tại chỗ hoặc ra hiện trường [13]. Do đó, trong nghiên cứu này, phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) được sử dụng nhằm xác định hàm lượng glucosamine trong các 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, hàm lượng của glucosamine được xác định trong các 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 phân tích bao gồm:

- Chất chuẩn: Glucosamine hydrochloride (độ tinh khiết > 99 %) được cung cấp từ hãng Sigma- Aldrich (Mỹ). Dung dịch chuẩn gốc 1000 ppm: cân chính xác khoảng 0,025 gam chất chuẩn glucosamine hydrochloride, hòa tan bằng nước deion vào bình định mức 25 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 20-1000 ppm.

- Các hóa chất khác: Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) (Fluka, > 99%), acid 2-(N-morpholino)ethanesulfonic (Mes), acid acetic (Ace) (Merck, > 99%), L-histidine (His) (Fluka, > 99%), arginine (Arg) (Fluka, > 99%), nước deion được dùng 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, chiều dài là 60 cm (chiều dài hiệu dụng là 30 cm), đường kính trong (ID) là 50 μm, đường kính ngoài (OD) là 375 μm; 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 [14].

Ngoài thiết bị CE-C⁴D, nghiên cứu cũng sử dụng thiết bị HPLC trong phân tích đối chứng và một số thiết bị, dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm như: máy ly tâm LCEN -200, máy rung siêu âm có gia nhiệt BRANSON 521, 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. Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu

Bốn mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (M1-M4) được mua ngẫu nhiên trên thị trường. Mẫu ở hai dạng chính là viên nang cứng và viên nén chứa Glucosamine Sulfate 2NaCl. Trên cơ sở tham khảo tài liệu [6, 11-12] và khảo sát thực tế, quy trình xử lý mẫu được lựa chọn như sau:

Mẫu dạng viên nén: lấy 20 viên và cân để xác định khối lượng trung bình 1 viên, nghiền mịn, trộn đều thành dạng bột đồng nhất.

Mẫu dạng viên nang: lấy 20 viên và cân khối lượng, tách vỏ, làm sạch phần vỏ và cân khối lượng vỏ. Xác định khối lượng trung bình của ruột viên bằng cách lấy trung bình tổng khối lượng trừ đi trung bình khối lượng vỏ. Mẫu được nghiền mịn (nếu cần) và đồng nhất.

Xử lý mẫu: Cân chính xác trên cân phân tích khoảng 0,05 g mẫu dạng bột đã được đồng nhất vào ống ly tâm 15 mL. Thêm 10 mL nước deion, rung siêu âm 30 phút. Ly tâm, gạn dịch vào bình định mức 50 mL. Chiết lần 2 bằng 10 mL nước deion. Gộp dịch chiết và định mức đến vạch (50mL) bằng nước deion, lắc đều. Lọc dung dịch thu được qua màng 0,45 μm, sau đó tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

Mẫu trắng được sử dụng để đánh giá phương pháp là mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng viên nang cứng không chứa glucosamine.

Mẫu thêm chuẩn: Chất chuẩn được thêm vào sau khi mẫu đã được nghiền mịn và đồng nhất. Sau đó, mẫu được trộn đều và bảo quản trong bình hút ẩm ở điều kiện nhiệt độ phòng ít nhất trong 3 giờ rồi tiến hành xử lý, phân tích theo quy trình như trên.

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

Việc khảo sát điều kiện thích hợp phân tích glucosamine được thực hiện với dung dịch chuẩn glucosamine 100 ppm. Các điều kiện khảo sát bao gồm: dung dịch đệm điện di (thành phần dung dịch, nồng độ dung dịch, pH của dung dịch), thế tách, thời gian bơm mẫu, 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.

Tiến hành đánh giá phương pháp đã tối ưu thông qua các thông số cơ bản gồm: đánh giá độ đặc hiệu, xây dựng đường chuẩn, giới hạn phát hiện và định lượng, 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. Phương pháp xử lý số liệu

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

Hàm lượng glucosamine trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe được tính theo công thức (1)

$$A = B \times 0,05 \times \frac{M_A}{M_{Glu}} \times \frac{KLV}{KLC} \quad (1)$$

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

B là hàm lượng glucosamine thu được trong dung dịch mẫu (mg/L)

M_A là khối lượng mol của dạng hoạt chất chứa glucosamine (g/mol)

M_{Glu} là khối lượng mol của glucosamine (g/mol)

KLV là khối lượng của 1 viên mẫu (mg)

KLC là khối lượng cân của mẫu (mg)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

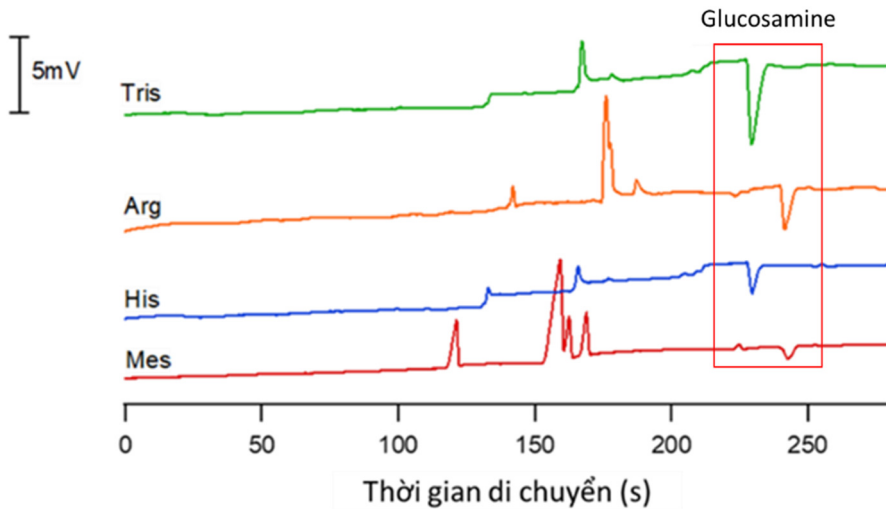
3.1 Tối ưu điều kiện phân tích glucosamine bằng CE-C⁴D

3.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

Trong phương pháp CE-C⁴D, dung dịch đệm điện di có vai trò quan trọng trong việc xác định tính chất và đặc trưng của quá trình điện di xảy ra trong mao quản, giúp duy trì, ổn định dòng điện trong mao quản và ảnh hưởng đến tốc độ điện di của chất phân tích. Trong dung dịch đệm điện di, ba yếu tố: thành phần, pH và nồng độ đóng vai trò quan trọng nhất.

a) Khảo sát thành phần dung dịch đệm

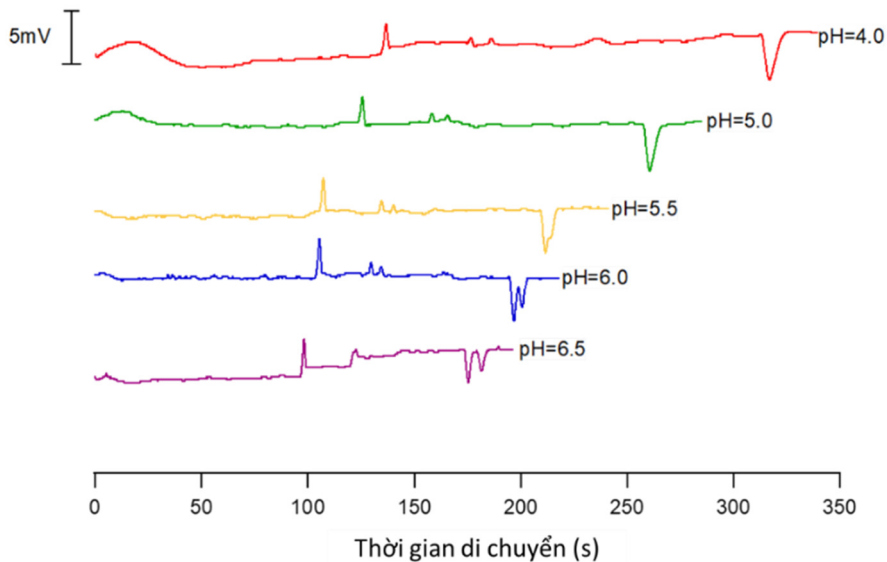
Các dung dịch đệm điện di được lựa chọn khảo sát bao gồm: Tris, Arg, His, Mes với cùng nồng độ là 10 mM và được điều chỉnh bằng acid acetic đến pH 5,0. Kết quả khảo sát các loại đệm thu được trong Hình 2 cho thấy đệm Tris/Ace (pH 5,0) cho tín hiệu glucosamine lớn và ổn định, thời gian phân tích ngắn nên được chọn cho các khảo sát tiếp theo.



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

b) Khảo sát pH dung dịch đệm

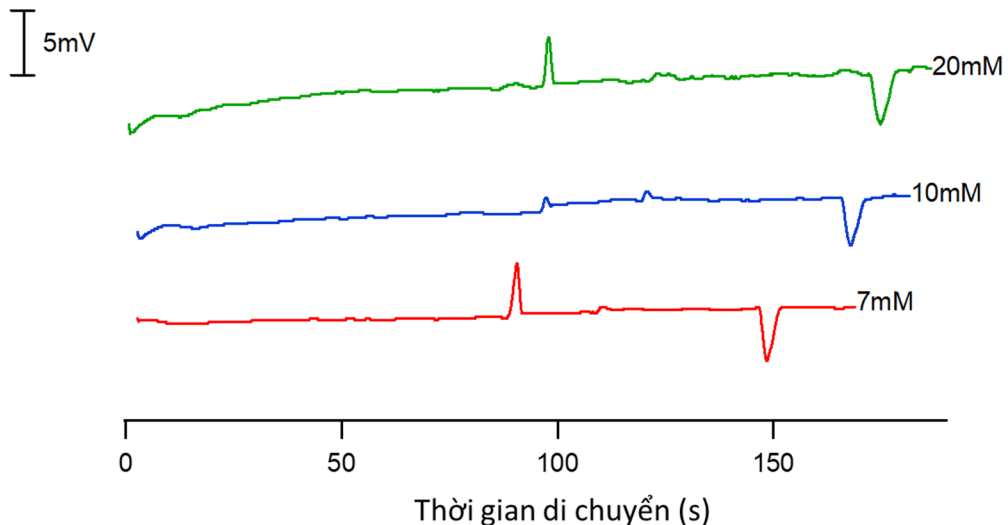
Cùng với thành phần hệ đệm thì giá trị pH của hệ đệm cũng là yếu tố quyết định trực tiếp đến quá trình phân tách điện di [13]. Với công thức cấu tạo có sự xuất hiện của nhóm NH_2 ($\text{pK}_a = 12,273$) thì khi $\text{pH} < \text{pK}_a$ glucosamine tồn tại chủ yếu ở dạng cation (R-NH_3^+). Việc khảo sát được thực hiện trong khoảng pH từ 5,0 đến 8,5 đệm Tris/Ace 10 mM. Kết quả khảo sát trong Hình 3 cho thấy, khi pH tăng, thời gian di chuyển của glucosamine giảm và xuất hiện sự chệch hoặc tách pic. Điều này có thể được giải thích là do glucosamin tồn tại ở hai dạng α và β [6], khi pH tăng hai pic này tách nhau càng rõ rệt. Tại pH 5,0 cho pic tương đối rõ nét, pic không bị chệch hoặc tách pic, tín hiệu đường nền ổn định, thời gian phân tích hợp lý, diện tích pic lớn. Do đó pH 5,0 được chọn cho các khảo sát tiếp theo.



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

c) Khảo sát nồng độ dung dịch đệm

Trong phương pháp CE, nồng độ đệm phải đủ lớn để tạo nên môi trường điện di ổn định. Nếu nồng độ nhỏ không ổn định sẽ ảnh hưởng đến quá trình di chuyển của các ion [13]. Việc khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch đệm được thực hiện với đệm Tris điều chỉnh pH 5,0 bằng acid acetic; các nồng độ được khảo sát trong khoảng 7 mM đến 20 mM thu được kết quả như trong Hình 4. Từ kết quả có thể nhận thấy đệm Tris/Ace 10 mM cho đường nền ổn định, thời gian phân tích phù hợp, pic đẹp và cân đối. Do đó đệm Tris/Ace 10 mM được lựa chọn cho khảo sát tiếp theo.

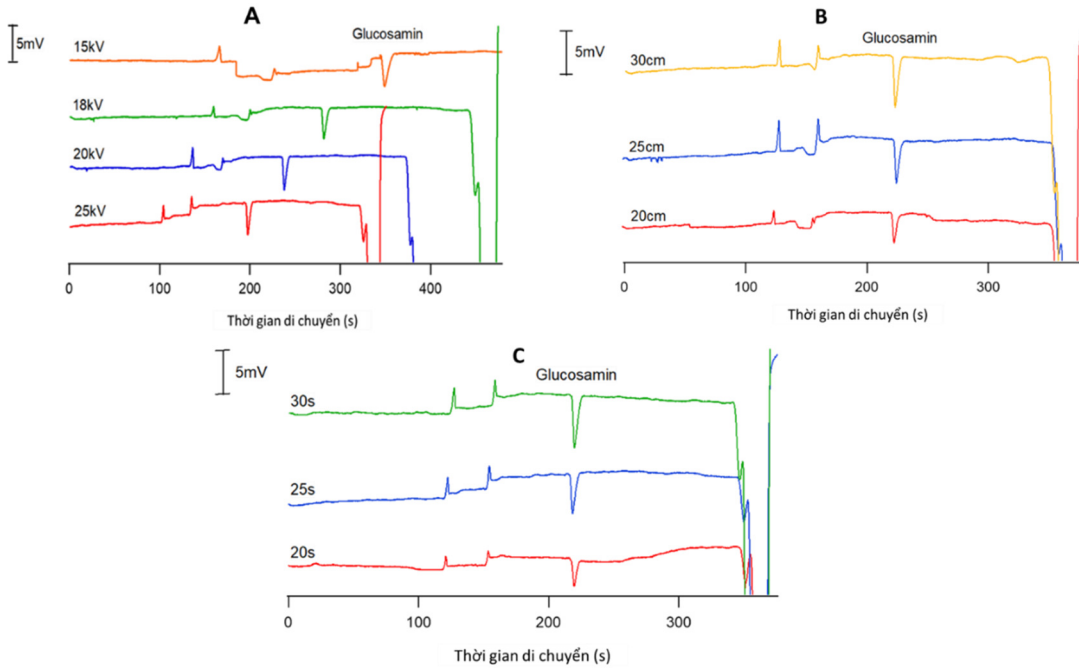


Hình 4. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đệm

3.1.2. Khảo sát các điều kiện khác

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. Để có kết quả tốt và ổn định thì cần phải chọn thế thích hợp nhất và giữ cho thế này luôn ổn định trong suốt quá trình phân tích. Trên cơ sở trang thiết bị sẵn có và tham khảo tài liệu [13, 14], các thế tách được chọn khảo sát là: +15 kV, +18 kV, +20 kV và +25 kV. Kết quả thu được trong Hình 5A cho thấy khi áp thế từ +15 kV đến +25 kV, thời gian di chuyển của các chất nhanh dần nhưng diện tích pic giảm dần vì khi tăng thế E dòng điện I lớn sẽ gây ra hiệu ứng nhiệt Jun lớn làm tỏa nhiệt Q ra bên ngoài khi đó làm mao quản nóng lên, giảm hiệu quả tách chất. Thế tách +20 kV thời gian phân tích phù hợp và diện tích pic đủ lớn, vì vậy được lựa chọn trong nghiên cứu này.

Việc bơm mẫu được thực hiện trên cơ sở phương pháp thủy động học kiểu xi phong. Trong đó, độ cao và thời gian bơm mẫu đã được khảo sát với các giá trị tương ứng là 20 cm, 25 cm, 30 cm và 20 s, 25 s, 30 s. Kết quả thu được trong Hình 5B và 5C cho thấy, các giá trị độ cao và thời gian bơm mẫu tối ưu được lựa chọn cho kết quả tín hiệu đủ lớn, ổn định và phù hợp với nghiên cứu này là 20 cm và 30 s.

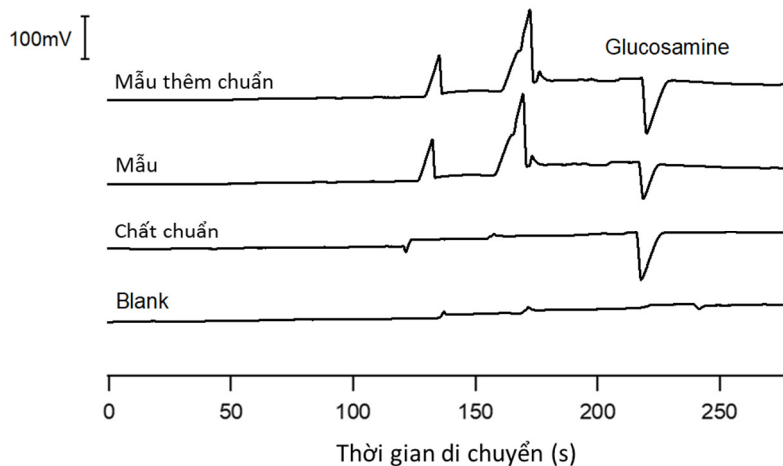


Hình 5. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của A) thế tách; B) chiều cao bom mẫu; C) thời gian bom mẫu

3.1 Đánh giá phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu của phương pháp

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá bằng cách tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thực tế (mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe) và mẫu thêm chuẩn (Hình 6). Kết quả không phát hiện glucosamine trong mẫu trắng trong khi độ lệch về thời gian di chuyển của pic glucosamine trong mẫu chuẩn, mẫu thật và mẫu thật thêm chuẩn là nhỏ hơn 2%. Do đó phương pháp cho thấy độ đặc hiệu tốt.



Hình 6. Điện di đồ đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp CE-C⁴D xác định glucosamine

3.2.2. Xây dựng đường chuẩn

Các dung dịch dùng để dựng đường chuẩn được pha loãng từ các dung dịch chuẩn gốc. Mỗi dung dịch được phân tích 3 lần, diện tích pic trung bình thu được sẽ là số liệu để dựng đường chuẩn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ. Từ đó, đường chuẩn 5 điểm xác định glucosamine được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 20 ppm đến 1000 ppm (bao gồm: 20 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, 1000 ppm) cho phương trình hồi quy là $y = 0,0008x + 0,0048$ với hệ số tương quan R^2 là 0,9993. Kết quả cho thấy diện tích pic và nồng độ glucosamine có mối tương quan tuyến tính tốt.

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

Để xác định giá trị LOD, tiến hành pha loãng dần dung dịch chuẩn glucosamine cho đến khi thu được tín hiệu gấp 3 lần so với nhiễu nền ($S/N = 3$), giới hạn định lượng (LOQ) ứng với $S/N = 10$. Từ đó, giá trị LOD thu được là 8,00 ppm và giá trị LOQ thu được là 26,67 ppm. LOD thu được trong nghiên cứu này thấp hơn so với LOD thu được trong nghiên cứu tương tự với cùng phương pháp CE-C⁴D của Patcharin Chaisuwan và cộng sự (2011) (30 ppm) [15]. Từ đó cho thấy nghiên cứu thu được có độ nhạy tốt, thích hợp trong phân tích các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.2.4. Độ chụm và độ đúng

Để đánh giá độ chụm của phương pháp, tiến hành khảo sát độ lặp lại của glucosamine ở 3 mức nồng độ 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm thêm vào mẫu trắng, mỗi mức nồng độ được tiến hành với 3 lần độc lập. Từ kết quả thu được ở Bảng 1 cho thấy, cả 3 mức nồng độ đều có độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic và thời gian di chuyển nhỏ hơn 3,7%. Như vậy phương pháp có độ lặp lại đáp ứng yêu cầu theo AOAC [16].

Bảng 1. Độ lặp lại của phương pháp CE-C⁴D xác định glucosamine

Lần bơm mẫu	Diện tích pic ở các mức nồng độ (mV.s)			Thời gian di chuyển ở các mức nồng độ (s)		
	50 ppm	100 ppm	150 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm
	1	7,304	16,360	24,396	224,90	225,30
2	7,602	16,659	23,421	227,50	230,50	226,10
3	7,302	16,769	23,864	228,10	228,20	235,50
S _{tb}	7,403	16,596	23,894	226,83	228,00	230,73
SD	0,173	0,212	0,488	0,97	1,35	2,38
RSD (%)	2,33	1,28	2,04	0,43	0,59	1,03

Độ đúng của phương pháp phân tích được đánh giá qua hiệu suất thu hồi của phương pháp phân tích, bao gồm cả xử lý và đo mẫu phân tích. Hiệu suất thu hồi cho biết lượng chất bị mất đi trong quá trình xử lý mẫu. Đánh giá hiệu suất thu hồi là đánh giá độ tin cậy của

phương pháp xử lý mẫu đã lựa chọn. Việc đánh giá độ thu hồi được thực hiện với mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 50 ppm, 100 ppm và 200 ppm và xử lý mẫu như quy trình đã đưa ra trong mục 2.4.1. Kết quả thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Độ thu hồi phương pháp CE-C⁴D xác định glucosamine

	Mức 1	Mức 2	Mức 3
Nồng độ chuẩn thêm vào (ppm)	50	100	200
Nồng độ thu hồi được (ppm)	51,15	95,22	194,22
Hiệu suất thu hồi (%)	102,3	95,2	97,1
Hiệu suất thu hồi trung bình (%)		98,2	

Từ kết quả ở Bảng 2 cho thấy, độ thu hồi của glucosamine dao động từ 95,2% đến 102,3%, đáp ứng yêu cầu khoảng cho phép của AOAC ở các mức nồng độ từ 10 ppm (80-110%) đến 1000 ppm (95-105%) [16].

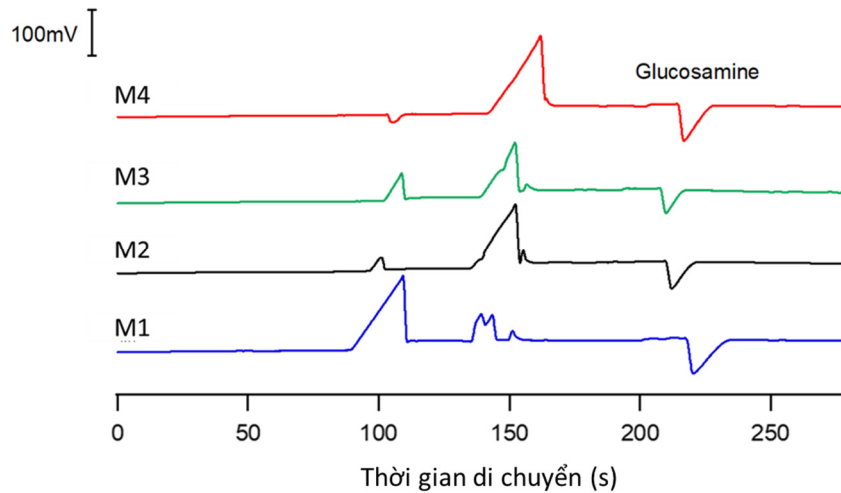
3.1. Phân tích mẫu thực tế

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

Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 4 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội. Các mẫu sau khi xử lý như ở mục 2.4.1 được tiến hành phân tích xác định hàm lượng glucosamine bằng phương pháp thêm chuẩn. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 và Hình 7.

Bảng 3. Kết quả phân tích hàm lượng glucosamine trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp CE-C⁴D

STT	Kí hiệu mẫu	Dạng viên	Dạng hoạt chất ghi trên nhãn	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D (mg/viên)	Hàm lượng công bố trên nhãn (mg/viên)	Sai khác (%)
1	M1	Viên nén	Glu Sul 2NaCl	855,3	1000	- 14,5
2	M2	Viên nén	Glu Sul 2NaCl	514,0	500	+ 2,8
3	M3	Viên nén	Glu Sul 2NaCl	432,1	400	+ 8,0
4	M4	Viên nang cứng	Glu Sul 2NaCl	670,8	750	- 10,6



Hình 7. Điện di đồ phân tích glucosamine trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe

Kết quả cho thấy, hàm lượng glucosamine trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe phân tích được dao động trong khoảng từ 432,1 mg/viên đến 855,3 mg/viên. So với công bố trên nhãn, hàm lượng này có sự sai khác trong khoảng từ -14,5% đến +8,0%.

3.3.2. Kết quả phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC-FLD

Để kiểm chứng kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D, bốn mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe đã được gửi phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC-FLD [6] do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia thực hiện. Kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC-FLD

STT	Kí hiệu mẫu	Dạng hoạt chất ghi trên nhãn	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D (mg/viên)	Hàm lượng phân tích bằng HPLC-FLD (mg/viên)	Sai khác (%)
1	M1	Glu Sul 2NaCl	855,3	972,0	- 12,0
2	M2	Glu Sul 2NaCl	514,0	500,5	+ 2,7
3	M3	Glu Sul 2NaCl	432,1	448,0	- 3,5
4	M4	Glu Sul 2NaCl	670,8	755,0	-11,1

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, hàm lượng glucosamine trong bốn mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe phân tích bằng hai phương pháp cho kết quả sai khác trong khoảng từ - 12,0% đến + 2,7%, đồng thời hệ số tương quan giữa hai phương pháp là 0,99, cho thấy phương pháp CE-C⁴D là đáng tin cậy.

4. KẾT LUẬN

Như vậy, nghiên cứu đã thành công trong việc ứng dụng phương pháp CE-C⁴D nhằm xác định hàm lượng glucosamine 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 hàm lượng glucosamine trong 4 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe cho sai khác với nhãn công bố trong khoảng - 14,5% đến + 8,0%. Kết quả này cũng đã được đối chứng với phương pháp HPLC-FLD cho sắc khác giữa hai phương pháp nhỏ hơn 15%, cho thấy phương pháp CE-C⁴D đáng tin cậy, 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]. Jean-Yves Reginster, Audrey Neuprez, Marie-Paule Lecart, Nathalie Sarlet, Olivier Bruyere, "Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis," *Rheumatology International*, vol. 32, pp. 2959-2967, 2012.
- [3]. 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.
- [4]. Helmick CG, Pollard RA, "Evidence for under-reading of radiographic osteoarthritis of the hips and knees in the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I)," *Arthritis Rheum*, vol. 37 (Suppl.), no. S301, 1994.
- [5]. Houpt JB, McMillan R, Wein C, Paget-Dellio SD, "Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee," *The Journal of Rheumatology*, vol. 26, no. 11, pp. 2423-2430, 1999.
- [6]. P. T. M. Huong, T. T. M. Hanh, D. T. H. My, V. T. Trang, C. C. Khanh, H. Q. Anh, M. T. N. Anh, N. T. M. Thu, N. Q. Huy, N. T. A. Huong, "Determination of glucosamine in functional food samples by high performance liquid chromatography (HPLC-FLD)," *Vietnam Journal of Food Control*, volume 5, no. 1, p. 11-24, 2022.
- [7]. T. Sriveena, A. Srividya, A. Ajitha and V. Uma Maheswara Rao, "RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Diacerein and

- Glucosamine in bulk and Pharmaceutical dosage form,” *World Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 4, iss. 8, pp. 2349-2360, 2015.
- [8]. S. Pullareddy and C. Rambabu, “Simultaneous determination of Glucosamine and Diacerein in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC,” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, vol. 2, no. 2, pp. 139-151, 2015.
- [9]. Kesharwani Saurabh, Kohali Dharamveer, “Development and validation of analytical methods for simultaneous estimation of diacerein and aceclofenac in bulk and tablets using UV Visible spectroscopy,” *International Journal of Chem Tech Research*, vol. 2, no. 3, pp. 1816-1822, 2010.
- [10]. Václavíková E., Kvasnička F, “Isotachophoretic determination of glucosamine and chondroitin sulphate in dietary supplements,” *Czech Journal of Food Science*, vol. 31, pp. 55-65, 2013.
- [11]. Nicola Volpi, “Capillary electrophoresis determination of glucosamine in nutraceutical formulation after labeling with anthranilic acid and UV detection,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 49, pp. 868- 871, 2009.
- [12]. 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.
- [13]. Le Thi Hong Hao, Pham Thi Ngoc Mai, Nguyen Thi Anh Huong, Nguyen Van Anh, Pham Tien Duc, Vu Thi Trang, Application of electrophoresis in food analysis, Science and Technics Publishing House, 2016.
- [14]. Thi Anh Huong Nguyen 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.
- [15]. Patcharin Chaisuwan, Thitiya Kongprasertsak, Areeporn Sangcakul, Norman W Smith, Duangjai Nachapricha, Prapin Wilairat, Kanchana Uraisin, “Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamine determination by CE-C(4)D method,” *Journal of Chromatography B*, vol. 879, pp. 2185-2188, 2011.
- [16]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, 2012.

Determination of glucosamine in dietary supplement samples by capillary electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detector (CE-C⁴D)

Dang Thi Huyen My¹, Nguyen Thi Ngoc Ly¹, Do Yen Nhi¹, Vu Tung Lam¹, Dinh Thi Diu², Kieu Thi Lan Phuong^{1,3}, Hoang Quoc Anh¹, Tran Cao Son³, Nguyen Thi Minh Thu¹, Nguyen Quang Huy^{1,4}, Nguyen Thi Anh Huong¹

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

²Faculty of Environmental Science, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

³National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

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

Abstract

The quantification of glucosamine in dietary supplements was investigated by using capillary with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D). Optimal conditions included electrophoresis buffer solution 10 mM Tris/Ace; pH 5.0; sample injection height 25 cm; sample injection time 30 s; separation voltage 20 kV. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of glucosamine were 8.00 ppm and 26.67 ppm, respectively. Calibration curve was constructed over the range from 20 to 1000 ppm giving a good linear correlation coefficient ($R^2 = 0.9993$). The relative standard deviation (RSD) ranged from 1.28% to 2.33% ($n = 3$) and the recovery efficiency ranged from 95.2 to 102.3% which indicated good precision and trueness of our method. The method was applied to determine glucosamine in 4 dietary supplement samples randomly collected at the local markets. The CE-C⁴D results were compared with those obtained by reference HPLC-FLD method, showing good agreement between the two methods (relative error < 15%).

Keywords: Glucosamine, CE-C⁴D, dietary supplements.