

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Quang Huy

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI
GLUCOSAMIN, MỘT SỐ VITAMIN NHÓM B VÀ KHOÁNG CHẤT
TRONG DƯỢC PHẨM, THỰC PHẨM CHỨC NĂNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội – 2023

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Quang Huy

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI
GLUCOSAMIN, MỘT SỐ VITAMIN NHÓM B VÀ KHOÁNG CHẤT
TRONG DƯỢC PHẨM, THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9440112.03

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS. TS. Nguyễn Thị Ánh Hương
- PGS. TS. Nguyễn Thị Minh Thư

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Quang Huy

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành với sự hỗ trợ, giúp đỡ, động viên của các Thầy Cô, gia đình và bạn bè, đồng nghiệp.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến **PGS.TS. Nguyễn Thị Ánh Hương** và **PGS. TS. Nguyễn Thị Minh Thu** đã giao đề tài và tận tình hướng dẫn tôi trong quá trình nghiên cứu, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Hóa học đặc biệt là các thầy cô giáo tại bộ môn Hóa Phân Tích, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, Đại Học Quốc Gia Hà Nội đã truyền đạt những kiến thức, kỹ năng để tôi hoàn thành các môn học trong khóa học này cũng như áp dụng vào thực tế.

Tôi xin cảm ơn các anh chị em nghiên cứu sinh, học viên và sinh viên trong nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp điện di mao quản CE-C⁴D của Bộ môn Hóa Phân tích, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG Hà Nội đã giúp đỡ và phối hợp với tôi trong quá trình nghiên cứu để tôi có kết quả như ngày hôm nay.

Tôi xin cảm ơn công ty 3Sanalysis (<http://www.3sanalysis.vn/>) đã cung cấp thiết bị để tôi thực hiện nghiên cứu này.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè đã quan tâm, động viên giúp tôi hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Quang Huy

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	1
DANH MỤC BẢNG.....	4
DANH MỤC HÌNH.....	6
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	10
MỞ ĐẦU	12
1. Tính cấp thiết, mục tiêu và nội dung của luận án	12
2. Điểm mới, những đóng góp mới về mặt khoa học và thực tiễn của luận án.....	14
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	15
1.1. Tổng quan về glucosamin và canxi	15
1.1.1. <i>Glucosamin</i>	15
1.1.2. <i>Canxi</i>	17
1.2. Tổng quan về vitamin B ₆ và magie	18
1.2.1. <i>Vitamin B₆</i>	18
1.2.2. <i>Magie</i>	20
1.3. Tổng quan về vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉	21
1.3.1. <i>Vitamin B₁</i>	21
1.3.2. <i>Vitamin B₅</i>	23
1.3.3. <i>Vitamin B₉</i>	24
1.4. Các phương pháp phân tích	26
1.4.1. <i>Phương pháp quang phổ</i>	26
1.4.2. <i>Phương pháp phân tích điện hóa</i>	29
1.4.3. <i>Phương pháp sắc kí lỏng (LC)</i>	30
1.4.4. <i>Phương pháp điện di mao quản</i>	33
1.5. Tổng quan về phương pháp điện di mao quản.....	37

1.5.1. Giới thiệu chung về phương pháp điện di mao quản	37
1.5.2. Nguyên tắc và cấu tạo của một hệ điện di mao quản cơ bản	38
1.5.3. Cơ sở lý thuyết của điện di mao quản	39
1.5.4. Dòng điện di thẩm thấu và sự di chuyển của ion chất phân tích trong mao quản	40
1.5.5. Các detector thông dụng trong phương pháp điện di mao quản	41
1.5.6. Detector độ dẫn không tiếp xúc (C^4D)	44
CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.1. Thiết bị và hóa chất	49
2.1.1. Thiết bị, dụng cụ	49
2.1.2. Hóa chất	52
2.2. Phương pháp nghiên cứu	54
2.2.1. Phương pháp CE- C^4D	54
2.2.2. Phương pháp khảo sát xác định các điều kiện thích hợp	55
2.3. Thông tin và quy trình xử lý mẫu phân tích	57
2.3.1. Thông tin mẫu phân tích	57
2.3.2. Quy trình xử lý mẫu phân tích	57
2.4. Các thông số đánh giá độ tin cậy của phương pháp phân tích	58
2.4.1. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp	58
2.4.2. Độ đặc hiệu của phương pháp	59
2.4.3. Độ chụm (độ lặp lại) và độ đúng (độ thu hồi) của phương pháp	59
2.5. Phương pháp xử lý số liệu	61
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	62
3.1. Xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C^4D	62

3.1.1. Khảo sát tối ưu điều kiện phân tách và xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C ⁴ D	62
3.1.2. Đánh giá phương pháp phân tích	68
3.1.3. Phân tích đồng thời glucosamin và canxi trong mẫu thực phẩm chức năng.....	72
3.2. Xác định đồng thời vitamin B ₆ và magie bằng phương pháp CE-C ⁴ D	80
3.2.1. Khảo sát tối ưu điều kiện phân tách và xác định đồng thời vitamin B ₆ và magie bằng phương pháp CE-C ⁴ D	80
3.2.2 Đánh giá phương pháp phân tích	87
3.2.3. Phân tích các mẫu thực tế.....	91
3.3. Xác định đồng thời vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉ bằng phương pháp CE-C ⁴ D	97
3.3.1. Khảo sát tối ưu điều kiện phân tách và xác định đồng thời vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉ bằng phương pháp CE-C ⁴ D	97
3.3.2. Đánh giá phương pháp phân tích.....	105
3.3.3. Phân tích vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉ trong mẫu thực phẩm chức năng.....	109
KẾT LUẬN	115
CÔNG BỐ KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	117
TÀI LIỆU THAM KHẢO	119
PHỤ LỤC.....

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các dạng muối glucosamin thường gặp	16
Bảng 1.2. Tóm tắt một số nghiên cứu bằng phương pháp quang phổ	28
Bảng 1.3. Tóm tắt một số nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký lỏng	32
Bảng 1.4. Tóm tắt một số nghiên cứu bằng phương pháp điện di mao quản	35
Bảng 2.1. Thông số các hệ thiết bị phân tích đối chứng	50
Bảng 2.2. Giá trị thể tách được khảo sát	56
Bảng 2.3. Thời gian bơm mẫu được khảo sát	56
Bảng 2.4. Chiều cao bơm mẫu được khảo sát.....	57
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi.....	64
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của thể tích đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi	65
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi.....	67
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi.....	67
Bảng 3.5. Điều kiện thích hợp xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE- $C^{4}D$	68
Bảng 3.6. Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ của canxi và glucosamin .	68
Bảng 3.7. Phương trình đường chuẩn của canxi và glucosamin.....	69
Bảng 3.8. Giới hạn phát hiện glucosamin và canxi bằng phương pháp CE- $C^{4}D$.	70
Bảng 3.9. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp CE- $C^{4}D$ xác định canxi và glucosamin.....	72
Bảng 3.10. Kết quả phân tích hàm lượng glucosamin và canxi trong mẫu TPCN bằng phương pháp CE- $C^{4}D$	72
Bảng 3.11. Kết quả phân tích hàm lượng glucosamin và canxi trong một số mẫu thực phẩm chức năng bằng phương pháp CE- $C^{4}D$ và phương pháp đối chứng	77
Bảng 3.12. Điều kiện tối ưu để phân tích đồng thời magie và vitamin B ₆ bằng phương pháp CE- $C^{4}D$	86

Bảng 3.13. Diện tích pic ở các nồng độ khác nhau của Mg^{2+} và vitamin B ₆	87
Bảng 3.14. Phương trình đường chuẩn của magie và vitamin B ₆	89
Bảng 3.15. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của Mg^{2+} và vitamin B ₆	89
Bảng 3.16. Kết quả xác định độ lặp và độ thu hồi của phương pháp trong phân tích Mg^{2+} và vitamin B ₆	90
Bảng 3.17. Kết quả xác định hàm lượng magie và vitamin B ₆ trong các mẫu dược phẩm và thực phẩm chức năng.....	91
Bảng 3.18. Kết quả phân tích đối chứng hàm lượng các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉ trong các mẫu dược phẩm và thực phẩm chức năng.....	94
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly đến quá trình tách và xác định các vitamin nhóm B.....	97
Bảng 3.20: Ảnh hưởng của tỷ lệ đệm đến sự tách và xác định các vitamin nhóm B	98
Bảng 3. 21: Ảnh hưởng của pH đến quá trình tách và xác định các vitamin nhóm B.....	100
Bảng 3.22: Ảnh hưởng của nồng độ đệm đến sự tách và xác định các vitamin B	101
Bảng 3.23: Ảnh hưởng của thể đến việc xác định các vitamin nhóm B.....	103
Bảng 3.24: Ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến sự tách và xác định các vitamin nhóm B.....	104
Bảng 3.25. Điều kiện tối ưu xác định các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉ .	105
Bảng 3.26. Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉	105
Bảng 3.27. Kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số hồi qui.....	107
Bảng 3.28. Kết quả khảo sát LOD.....	107
Bảng 3.29. Độ lặp và độ thu hồi của phương pháp trong xác định hàm lượng các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉	109
Bảng 3.30. Kết quả phân tích hàm lượng vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉ trong các mẫu dược phẩm và TPCN bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	110
Bảng 3.31. Kết quả phân tích đối chứng bằng phương pháp UPLC-MS/MS.....	112

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Công thức cấu tạo của glucosamin	15
Hình 1.2. Công thức cấu tạo của vitamin B ₆	19
Hình 1.3. Công thức cấu tạo của vitamin B ₁	22
Hình 1.4. Công thức cấu tạo của vitamin B ₅	23
Hình 1.5. Công thức cấu tạo của vitamin B ₉	25
Hình 1.6. Sơ đồ cấu tạo của một hệ thiết bị CE	38
Hình 1.7. Dòng EOF và sự di chuyển của các cation và anion trong mao quản	41
Hình 1.8. Sơ đồ nguyên lý hoạt động của detector độ dẫn không tiếp xúc	44
Hình 1.9. A) Sơ đồ biểu diễn cấu trúc của detector độ dẫn không tiếp xúc B) Mạch điện tương đương	45
Hình 1.10. Biểu diễn mối liên hệ giữa tín hiệu đầu ra và độ lớn (điện thế và tần số) của nguồn kích thích xoay chiều	45
Hình 1.11. Quá trình chuyển đổi tín hiệu của C ⁴ D	47
Hình 3.1. Ảnh hưởng của dung dịch điện ly đến sự phân tích glucosamin và canxi	63
Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly đến thời gian di chuyển và sự phân tách của glucosamin và canxi	64
Hình 3.3. Ảnh hưởng của thế tách đến sự phân tách giữa glucosamin và canxi	65
Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian và chiều cao bơm mẫu đến sự phân tách của glucosamin và canxi	66
Hình 3.5. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ canxi	69
Hình 3.6. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ glucosamin	69
Hình 3.7. Ảnh hưởng của MSM và chondroitin đến sự phân tách glucosamin và canxi	71
Hình 3.8. Ảnh hưởng của cation K ⁺ , Na ⁺ , Zn ²⁺ và Mg ²⁺ đến sự phân tách glucosamin và canxi	71
Hình 3.9. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong một số mẫu TPCN.....	74
Hình 3.10. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M3	74
Hình 3.11. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M5	74
Hình 3.12. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M6	75
Hình 3.13. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M13	75
Hình 3.14. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M14	75

Hình 3.15. Đồ thị so sánh hàm lượng glucosamin trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	76
Hình 3.16. Đồ thị so sánh hàm lượng canxi trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	76
Hình 3.17. Đồ thị so sánh hàm lượng glucosamin giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng HPLC-FLD.....	78
Hình 3.18. Sự tương quan hàm lượng glucosamin giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng HPLC-FLD.....	79
Hình 3.19. Đồ thị so sánh hàm lượng canxi giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng ICP-OES.....	79
Hình 3.20. Sự tương quan hàm lượng canxi giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng ICP-OES.....	80
Hình 3.21. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của loại đệm đến sự phân tách.....	81
Hình 3.22. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần ACN đến sự phân tách của Mg ²⁺ và vitamin B ₆	82
Hình 3.23. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng pH của hệ đệm đến sự phân tách.....	82
Hình 3.24. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Arg đến sự phân tách.....	83
Hình 3.25. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến sự phân tách của Mg ²⁺ và vitamin B ₆	84
Hình 3.26. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu đến sự phân tách của Mg ²⁺ và vitamin B ₆	85
Hình 3.27. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thể tích đến sự phân tách.....	86
Hình 3.28. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ magie.....	88
Hình 3.29. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B ₆	88
Hình 3.30. Điện di đồ độ đặc hiệu của phương pháp phân tích đồng thời.....	90
Hình 3.31. Điện di đồ phân tích Mg ²⁺ và vitamin B ₆ trong các mẫu dược phẩm và mẫu dược phẩm và TPCN.....	92
Hình 3.32. Đồ thị so sánh hàm lượng Mg trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	93
Hình 3.33. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₆ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	93
Hình 3.34. Đồ thị so sánh hàm lượng Mg giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng ICP-OES.....	95

Hình 3.35. Sự tương quan giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng ICP-OES	95
Hình 3.36. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₆ giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng HPLC-PDA	96
Hình 3.37. Sự tương quan giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng HPLC-PDA.....	96
Hình 3.38. Ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly đến quá trình xác định các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉	98
Hình 3.39. Ảnh hưởng của tỷ lệ đệm đến sự tách và xác định các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉	99
Hình 3.40. Ảnh hưởng của pH đến sự tách và xác định vitamin B ₁ , vitamin B ₅ ,	100
Hình 3.41. Ảnh hưởng của nồng độ đệm đến sự tách và xác định vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉	101
Hình 3.42. Ảnh hưởng của thế điện trường đến sự phân tách các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉	102
Hình 3.43. Ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến sự tách và xác định vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉	104
Hình 3.44. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B ₁	106
Hình 3.45. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B ₅	106
Hình 3.46. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B ₉	106
Hình 3.47. Điện di đồ độ đặc hiệu của phương pháp phân tích đồng thời vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉	108
Hình 3.48. Điện di đồ phân tích các vitamin B ₁ , vitamin B ₅ , vitamin B ₉ trong các mẫu thực phẩm chức năng	110
Hình 3.49. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₁ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	111
Hình 3.50. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₅ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	111
Hình 3.51. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₉ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C ⁴ D.....	111
Hình 3.52. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₁ giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng UPLS-MS/MS	113
Hình 3.53. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₅ giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng UPLS-MS/MS	113

Hình 3.54. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B ₉ giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng UPLS-MS/MS	114
Hình 3.55. Sự tương quan giữa phương pháp CE-C ⁴ D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS	114

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<i>Ký hiệu</i>	<i>Thuật ngữ tiếng Anh</i>	<i>Thuật ngữ tiếng Việt</i>
<i>Ace</i>	<i>Acetic acid</i>	<i>Acid acetic</i>
<i>AOAC</i>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>	<i>Hiệp hội các nhà Hoá học phân tích chính thống</i>
<i>Arg</i>	<i>Arginine (2-amino-5-guanidinopentanoic acid)</i>	<i>Arginin (Acid 2-amino-5-guanidinopentanoic)</i>
<i>BCP</i>	<i>Bromocresol PurpleME</i>	<i>Bromocresol tím</i>
<i>C⁴D</i>	<i>Capacitively coupled contactless conductivity detector</i>	<i>Detector độ dẫn không tiếp xúc kết nối kiểu tụ điện</i>
<i>CE</i>	<i>Capillary Electrophoresis</i>	<i>Phương pháp điện di mao quản</i>
<i>CZE</i>	<i>Capillary zone electrophoresis</i>	<i>Phương pháp điện di mao quản vùng</i>
<i>EOF</i>	<i>Electroosmotic flow</i>	<i>Dòng điện di thẩm thấu</i>
<i>EMS</i>	<i>Electrospray mass spectrometry</i>	<i>Khối phổ phun điện tử</i>
<i>ESI</i>	<i>Electrospray ionization</i>	<i>Ion hoá phun điện tử</i>
<i>FID</i>	<i>Flame ionization detector</i>	<i>Detector ion hoá ngọn lửa</i>
<i>GC</i>	<i>Gas chromatography</i>	<i>Sắc ký khí</i>
<i>His</i>	<i>Histidine (2-Amino-3-(1H-imidazol-4-yl) propanoic acid)</i>	<i>Histidin (acid 2-Amino-3-(1H-imidazol-4-yl) propanoic)</i>
<i>HPLC</i>	<i>High-performance liquid chromatography</i>	<i>Sắc ký lỏng hiệu năng cao</i>
<i>IC</i>	<i>Ion chromatography</i>	<i>Sắc ký ion</i>
<i>ID</i>	<i>Internal diameter</i>	<i>Đường kính trong</i>
<i>ICP-OES</i>	<i>Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry</i>	<i>Quang phổ phát xạ nguyên tử plasma kết hợp cảm ứng</i>
<i>LOD</i>	<i>Limit of detection</i>	<i>Giới hạn phát hiện</i>

<i>LOQ</i>	<i>Limit of quantification</i>	<i>Giới hạn định lượng</i>
<i>MDL</i>	<i>Method detection limit</i>	<i>Giới hạn phát hiện của phương pháp</i>
<i>MQL</i>	<i>Method quantification limit</i>	<i>Giới hạn định lượng của phương pháp</i>
<i>MES</i>	<i>2-morpholin-4-ylethanesulfonic acid</i>	<i>Acid 2-morpholin-4-ylethanesulfonic</i>
<i>MECC</i>	<i>Micellar electrophoresis capillary chromatography</i>	<i>Sắc ký điện di mao quản điện động học kiểu micelle</i>
<i>MS</i>	<i>Mass spectrometer</i>	<i>Khối phổ</i>
<i>PLP</i>	<i>pyridoxal 5'-phosphate</i>	<i>pyridoxal 5'-phosphate</i>
<i>RSD</i>	<i>Relative standard deviation</i>	<i>Độ lệch chuẩn tương đối</i>
<i>SD</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Độ lệch chuẩn</i>
<i>TCVN</i>	<i>Vietnamese Standards</i>	<i>Tiêu chuẩn Việt Nam</i>
<i>TPCN</i>	<i>Functional foods</i>	<i>Thực phẩm chức năng</i>
<i>Tris</i>	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol</i>	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol</i>
<i>UV-Vis spectrometry</i>	<i>Ultraviolet – visible spectrometry</i>	<i>Phương pháp quang phổ UV-Vis</i>
<i>IUPAC</i>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	<i>Liên minh Quốc tế về Hóa học cơ bản và Hóa học ứng dụng</i>

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết, mục tiêu và nội dung của luận án

Glucosamin là một nguyên liệu tổng hợp proteoglycan, đã được Cơ quan đánh giá Dược phẩm Châu Âu xếp vào danh mục thuốc giúp cải thiện cấu trúc xương khớp đối với bệnh viêm khớp [6]. Glucosamin thường được kết hợp cùng canxi (một khoáng chất cần thiết trong sự hình thành và chuyển hóa của xương) trong các sản phẩm dược phẩm và thực phẩm chức năng (TPCN) liên quan đến các vấn đề về xương khớp. Bên cạnh đó, vitamin là những chất hữu cơ có vai trò quan trọng và đặc biệt cần thiết đối với các quá trình chuyển hóa, đảm bảo hoạt động bình thường cũng như sự sinh trưởng và phát triển của cơ thể [54, 70]. Trong đó, các vitamin nhóm B tan trong nước có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất của tế bào, hình thành các tế bào máu và thần kinh, cung cấp năng lượng hỗ trợ chuyển hoá, ngăn ngừa các dị tật bẩm sinh, giúp tim mạch khỏe mạnh và não bộ phát triển [54]. Thêm vào 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. Tuy nhiên, hầu hết các chất này cơ thể không tự tổng hợp được mà cần bổ sung từ bên ngoài vào. Việc bổ sung glucosamin và các vitamin không chỉ thông qua thực phẩm hằng ngày như rau củ, thịt, trứng... mà còn thông qua dược phẩm hay các loại TPCN [17]. Tùy vào độ tuổi, thể trạng và giới tính mà cơ thể mỗi người cần bổ sung một lượng chất khác nhau [44]. Do đó, việc xác định chính xác hàm lượng glucosamin và các vitamin có trong dược phẩm và TPCN là cần thiết và quan trọng để đảm bảo chất lượng sản phẩm dược phẩm, TPCN và sức khỏe người tiêu dùng.

Trên thế giới, các nghiên cứu xác định glucosamin và các vitamin đã được thực hiện bằng nhiều phương pháp như: phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [7, 10, 21, 35], phương pháp điện hóa [23, 40, 80, 81], phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) [51, 53, 58, 85], phương pháp điện di mao quản (CE) [4, 25, 27, 47, 48, 72]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu 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 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, các vitamin nhóm B). Hơn nữa, phương pháp CE-C⁴D còn có các ưu điểm: trang thiết bị nhỏ gọn, có thể tự động hóa, sử dụng lượng mẫu và hóa chất nhỏ, chi phí phân tích thấp. Trên cơ sở đó, đề tài “**Nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích glucosamin, một số vitamin và khoáng chất trong dược phẩm, thực phẩm chức năng**” đã được thực hiện nhằm góp phần vào việc phát triển phương pháp phân tích CE-C⁴D trong kiểm tra, đánh giá chất lượng các mẫu dược phẩm và TPCN trên thị trường bao gồm:

- Xác định glucosamin đồng thời với canxi.
- Xác định vitamin B₆ đồng thời với magie.
- Xác định đồng thời một số vitamin nhóm B (vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉).

Với các mục tiêu nêu trên, nội dung nghiên cứu của luận án bao gồm:

- Nghiên cứu, khảo sát các điều kiện tối ưu để xác định đồng thời các chất phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D:
 - Khảo sát dung dịch điện ly: thành phần, pH, nồng độ.
 - Khảo sát thế tách.
 - Khảo sát điều kiện bơm mẫu dựa trên phương pháp thủy động học kiểu xi phong: thời gian bơm mẫu và chiều cao bơm mẫu.
- Đánh giá phương pháp phân tích:
 - Xây dựng đường chuẩn.
 - Xác định giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ).
 - Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp phân tích.
 - Đánh giá độ chụm của phương pháp phân tích.
 - Đánh giá độ đúng của phương pháp phân tích.

- Áp dụng quy trình để phân tích đồng thời hàm lượng của canxi và glucosamin; hàm lượng của magie và vitamin B₆; hàm lượng của vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ có trong mẫu dược phẩm và mẫu thực phẩm chức năng.
- Phân tích đối chứng nhằm đánh giá độ tin cậy của phương pháp CE-C⁴D.

2. Điểm mới, những đóng góp mới về mặt khoa học và thực tiễn của luận án

❖ Về mặt khoa học

- Lần đầu tiên đã phát triển thành công phương pháp CE-C⁴D nhằm xác định đồng thời các chất có tính chất hoàn toàn khác nhau trong cùng một quy trình bao gồm các khoáng chất, glucosamin và các vitamin nhóm B trong mẫu dược phẩm và TPCN theo 03 quy trình phân tích bao gồm: phân tích đồng thời canxi và glucosamin, phân tích đồng thời magie và vitamin B₆; phân tích đồng thời các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉.

❖ Về mặt thực tiễn

- Phương pháp CE-C⁴D với các ưu điểm về hệ thiết bị gọn nhẹ, giá thành thấp rất phù hợp với hoàn cảnh, điều kiện kinh tế - xã hội ở Việt Nam. Các quy trình phân tích được xây dựng trong luận án đơn giản, dễ thực hiện, có độ chính xác cao, phù hợp để áp dụng phân tích các khoáng chất, glucosamin và các vitamin nhóm B trong mẫu dược phẩm và thực phẩm chức năng; có tiềm năng áp dụng trong kiểm soát chất lượng dược phẩm và thực phẩm chức năng; có ý nghĩa thực tiễn lớn đối với việc đảm bảo quyền lợi và sức khỏe tốt nhất cho người tiêu dùng.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về glucosamin và canxi

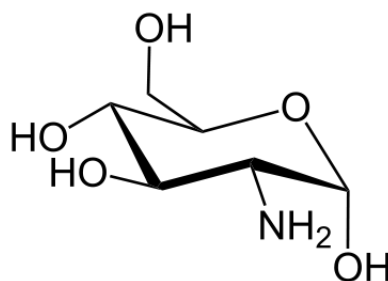
Glucosamin và canxi là hai chất quan trọng được sử dụng từ lâu cho sự phát triển của hệ xương khớp, liên kết chung của hai chất cung cấp sự toàn vẹn cho cấu trúc xương.

1.1.1. Glucosamin

Glucosamin là một amino-monosaccharide và là nguyên liệu để tổng hợp glycosaminoglycan- chất có vai trò quan trọng cấu tạo nên mô sụn và mô xương khớp và các chất khác liên quan đến tạo gân, dây chằng, lớp dịch nhầy ở khớp [6]. Khi đi vào cơ thể, glucosamin có tác dụng kích thích các tế bào ở sụn khớp tăng tổng hợp và trùng hợp tạo nên cấu trúc proteoglycan bình thường. Kết quả của quá trình trùng hợp là tạo thành muco-polysaccharide, thành phần chính cấu tạo nên sụn khớp.

Ngoài ra, glucosamin cũng đồng thời ức chế các enzym phá hủy sụn khớp như collagenase, phospholipase A2 và giảm các gốc tự do superoxide phá hủy tế bào sinh sụn, kích thích sản sinh mô liên kết của xương, giảm mất canxi ở xương. Glucosamin còn làm tăng sản xuất chất nhầy dịch khớp nên giúp giảm ma sát giữa các khớp và giảm đau. Vì vậy, glucosamin không chỉ làm giảm các triệu chứng của bệnh xương khớp (đau, cứng khớp, khó vận động) mà đồng thời ngăn ngừa bệnh tiến triển, phục hồi cấu trúc sụn, giúp điều trị tận gốc chứ không chỉ là các triệu chứng.

Công thức cấu tạo của glucosamin được thể hiện trong hình 1.1.



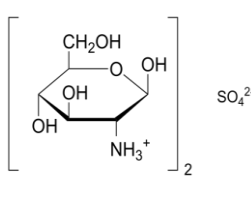
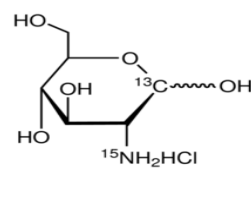
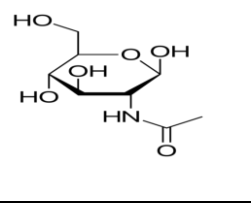
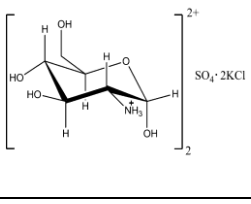
Hình 1.1. Công thức cấu tạo của glucosamin

- Tên IUPAC: (3R, 4R, 5S)-3-Amino-6-(hydroxymethyl) oxane-2,4,5-triol.
- Công thức phân tử: $C_6H_{13}NO_5$.

- $pK_a = 7,58 \pm 0,2$
- Khối lượng mol phân tử: 179,17 g/mol
- Glucosamin là chất rắn, màu trắng, không mùi, nhiệt độ nóng chảy: 88 °C.
- Tan tốt trong nước (độ tan 10^6 mg/L ở 25 °C, hơi tan trong methanol sôi, ít hòa tan trong methanol hoặc ethanol lạnh, thực tế không hòa tan trong ether hoặc chloroform.

Glucosamin trên thị trường được sử dụng trong hỗ trợ điều trị thoái hóa khớp gồm có bốn dạng chính glucosamine sulfate, glucosamine hydrochloride, N-acetyl glucosamine và glucosamine sulfate potassium chloride. Các dạng muối phổ biến này được trình bày trong bảng 1.1.

Bảng 1.1. Các dạng muối glucosamin thường gặp

Tên thông thường	Công thức phân tử	Khối lượng mol phân tử (g/mol)	Công thức cấu tạo
Glucosamine sulfate	$(C_6H_{13}NO_5)_2SO_4$	456,52	
Glucosamine hydrochloride	$C_6H_{14}ClNO_5$	215,63	
N-Acetylglucosamine	$C_8H_{15}NO_6$	221,21	
Glucosamine sulfate potassium chloride	$C_{12}H_{28}Cl_2K_2N_2O_{14}S$	605,51	

Dạng bào chế của glucosamin khá đa dạng với các hàm lượng khác nhau, có thể kể đến như: viên nén, bột hoặc dung dịch uống, dung dịch tiêm. Các chế phẩm glucosamin được cung cấp với hàm lượng rất khác nhau. Trong hầu hết các nghiên cứu, người ta sử dụng tổng liều 1200-1500 mg glucosamin/ngày. Ngoài ra, nếu kết hợp với chondroitin thì liều được khuyến dùng là 1200 mg/ngày.

1.1.2. Canxi

Canxi là một khoáng chất quan trọng và cần thiết trong quá trình hình thành, cấu tạo khung xương. Khoảng 98% lượng canxi trong cơ thể tập trung ở xương và răng và 2% phân bố trong máu để thực hiện các chức năng thần kinh cơ, đông máu. Trong máu, canxi tồn tại dưới 3 dạng là khoảng 50% dưới dạng ion Ca^{2+} , phần còn lại kết hợp với protein huyết tương (chủ yếu là albumin) và một phần nhỏ dưới dạng phức hợp với phosphat, citrat và cacbonat. Canxi được hấp thu vào cơ thể thông qua thực phẩm hằng ngày bao gồm các sản phẩm từ sữa, cải xoăn, bông cải xanh, các loại hạt, ...[14]

- *Tác dụng*

Canxi là khoáng chất giữ vai trò quan trọng trong cơ thể con người. Trong cơ thể người, canxi là thành phần cơ bản cấu tạo nên xương, răng và thường kết hợp với phospho làm cho xương, răng chắc khỏe. Ngoài ra, canxi cần cho quá trình hoạt động của thần kinh cơ, hoạt động của tim, chuyển hoá của tế bào và quá trình đông máu. Canxi đi vào cơ thể qua ăn uống được hấp thu bởi ruột non, đại tràng và đào thải qua thận [86].

Tuy nhiên, con người thường không cung cấp đủ lượng canxi cần thiết cho cơ thể gây nên sự thiếu hụt canxi. Đối với trẻ nhỏ, trẻ sẽ bị còi xương, chậm tăng chiều cao và một số trẻ thường bị giật mình, dễ nổi cáu. Đối với người lớn, người cao tuổi, việc thiếu hụt canxi gây ra tình trạng thần kinh suy nhược, tinh thần không ổn định, mất ngủ hoặc ngủ li bì và có thể dẫn tới bệnh loãng xương, xốp xương hay tăng huyết áp. Đặc biệt, lượng canxi trong máu thiếu sẽ gây hội chứng hạ canxi máu thường gặp ở mọi lứa tuổi. Các dấu hiệu biểu hiện như tê ở một số bộ phận trong cơ thể (lưỡi,

môi, các đầu ngón tay, đầu ngón chân). Trong trường hợp nặng, có hiện tượng co cơ xảy ra trên toàn bộ cơ thể (chân, tay đột nhiên bị co rút, cứng lại, khó cử động, đau đớn, co giật khu trú) và có thể bị co thắt các cơ hô hấp gây khó thở.

- *Hàm lượng*

Trên thực tế, nhu cầu canxi của cơ thể được xác định vào mối tương quan của canxi với photpho. Đối với mọi lứa tuổi, tỷ số Ca/P tối thiểu là $> 0,8$ và tỷ số này tốt nhất nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5, đặc biệt đối với trẻ em [49]. Lượng canxi nên tiêu thụ đối với từng độ tuổi khác nhau được thể hiện như sau:

- Trẻ từ 0 - 6 tháng: cần 300 mg/ngày.
- Trẻ từ 6 - 11 tháng : cần 400 mg/ngày.
- Trẻ từ 1 - 3 tuổi: cần 500 mg/ngày.
- Trẻ từ 4 - 6 tuổi: cần 600 mg/ngày.
- Trẻ từ 7 - 9 tuổi: cần 700 mg/ngày.
- Người từ 10 - 18 tuổi: cần khoảng 1000 mg/ngày.
- Người từ 18 - 50 tuổi: cần khoảng 1000 mg/ngày.
- Phụ nữ có thai, người cao tuổi: cần bổ sung lượng canxi nhiều hơn với khoảng từ 1200 mg/ngày - 1500 mg/ngày.

1.2. Tổng quan về vitamin B₆ và magie

Magie và vitamin B₆ hoạt động như những coenzym trong chuyển hóa protein, glucid và lipid. Sự kết hợp giữa magie và vitamin B₆ mang lại tác dụng cải thiện tâm trạng, giảm tình trạng lo lắng, cải thiện chất lượng giấc ngủ, giảm nguy cơ mắc bệnh tim, tiểu đường tuýp 2 cùng nhiều vấn đề khác...

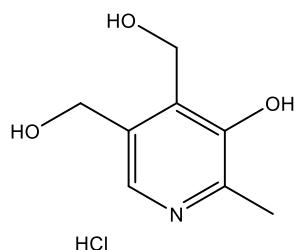
1.2.1. Vitamin B₆

Vitamin B₆ có nhiều trong các loại thực phẩm như: thịt bò, thịt heo, thịt gia cầm, cá, trứng, pho mát, ngũ cốc nguyên hạt, khoai tây, mầm đậu nành, đậu phộng, rau bina, cà rốt, súp lơ, bắp cải, dưa hấu, chuối,...[20]. Vitamin B₆ cũng được một số vi khuẩn đường ruột tổng hợp, cung cấp một phần cho cơ thể.

- *Cấu trúc*

- Công thức phân tử là C₈H₁₂ClNO₃, khối lượng mol phân tử: 205,64 g/mol.

- Công thức cấu tạo của vitamin B₆ được thể hiện trong hình 1.2.



Hình 1.2. Công thức cấu tạo của vitamin B₆

- Trong dung dịch nước, vitamin B₆ có hằng số phân li acid pK_a = 9,4.
- Độ hòa tan: trong nước (222,2 g/L); trong ancol (11,1 g/L), ít tan trong acetone; không tan trong ether, chloroform.
- Vitamin B₆ tồn tại dưới 3 dạng: pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamin. Pyridoxine hydrochloride được chuyển thành dạng hoạt động, pyridoxal 5'-phosphate (PLP) và nó khác với pyridoxin ở nhóm thay thế tại vị trí '4'. Ba dạng này có thể chuyển hóa lẫn nhau.

- *Tác dụng*

Vitamin B₆ đóng vai trò như một coenzym trong các phản ứng của cơ thể, giúp tổng hợp các chất dẫn truyền thần kinh như taurin, serotonin, dopamin, histamin,... và các acid amin cần thiết. Nó tham gia chuyển hóa các chất sinh năng lượng như đạm, đường, béo, đặc biệt, giữ vai trò quan trọng trong chuyển hóa glycogen dự trữ thành glucose do đó đảm bảo được sự ổn định của đường huyết. Vitamin B₆ giúp giảm tình trạng thiếu máu do trực tiếp tham gia vào quá trình tạo hemoglobin, giúp hạn chế khả năng hình thành sỏi thận do hỗ trợ đào thải oxalat qua đường nước tiểu. Ngoài ra, vitamin B₆ còn giúp tăng cường miễn dịch, giảm cholesterol, phát triển não bộ [54].

- *Hàm lượng*

Hàm lượng vitamin B₆ hằng ngày cần cho các đối tượng khác nhau là khác nhau, tăng theo độ tuổi [47]:

- Trẻ < 6 tháng tuổi: 0,1 mg/ngày.
- Trẻ 6 - 12 tháng tuổi: 0,3 mg/ngày.
- Trẻ từ 1 - 3 tuổi, 4 - 8 tuổi, 9 - 13 tuổi: theo thứ tự là 0,5 mg/ngày; 0,6 mg/ngày; 1 mg/ngày.

- 14 - 19 tuổi: Nam là 1,3 mg/ngày, nữ là 1,2 mg/ngày.
- 20 - 50 tuổi: 1,3 mg/ngày ở cả nam và nữ.
- > 50 tuổi: nam là 1,7 mg/ngày, nữ là 1,5 mg/ngày.
- Phụ nữ có thai hoặc cho con bú là 2,1 - 2,2 mg/ngày.

- *Dạng bào chế*

Vitamin B₆ có các dạng bào chế và hàm lượng chủ yếu như sau:

- Viên nén 10 mg/viên, 25 mg/viên, 50 mg/viên, 100 mg/viên, 250 mg/viên, 500 mg/viên.
- Viên nén tác dụng kéo dài 100 mg/viên, 200 mg/viên, 500 mg/viên.
- Viên nang tác dụng kéo dài 150 mg/viên.
- Thuốc tiêm 100 mg/ml.

1.2.2. Magie

Magie là một khoáng chất cần thiết để cơ thể có thể vận hành tốt. Magie có mặt trong thành phần của hơn 300 enzym khác nhau, có vai trò điều hoà các chức năng và nhiều quá trình chuyển hoá năng lượng. Khoảng 50 - 70% lượng magie trong cơ thể tập trung ở xương, phần còn lại phân bố ở tổ chức cơ, tổ chức mô mềm và một lượng nhỏ (khoảng 1%) trong máu. Magie có mặt trong nhiều nguồn thức ăn, thực phẩm khác nhau. Các thực phẩm chứa một lượng nhỏ magie gồm các loại rau lá xanh như rau chân vịt, ngũ cốc nguyên hạt và các loại hạt. Các loại thực phẩm có chất xơ thường cũng là nguồn cung cấp magie [34].

- *Tác dụng*

Lượng magie trong máu luôn được duy trì ở mức ổn định để đảm bảo mọi hoạt động của cơ thể diễn ra bình thường. Magie tham gia vào hàng trăm quá trình quan trọng của cơ thể, bao gồm quá trình kiểm soát cách thức hoạt động của cơ bắp và dây thần kinh. Magie đóng vai trò giúp cơ thể xây dựng các tế bào xương mới, tăng mật độ khoáng xương, làm giảm tỷ lệ gãy xương do loãng xương. Magie có thể giúp cho cơ thể con người chống viêm, bảo vệ trái tim, giảm tỷ lệ mắc tiểu đường, giảm nguy cơ đột quỵ. Ngoài ra, bổ sung magie còn giúp cải thiện tình trạng lo âu, stress.

Magie đi vào cơ thể qua ăn uống, được hấp thu bởi ruột non và đại tràng. Tuy nhiên, cơ thể có thể không hấp thu đủ lượng magie cần thiết, ngay cả khi đã ăn một chế độ ăn uống lành mạnh. Do đó, việc bổ sung những thực phẩm giàu magie là vô cùng cần thiết. Cơ thể duy trì nồng độ magie bằng cách điều hòa sự hấp thu và đào thải hoặc tái hấp thu ở thận.

Tuy nhiên, hầu hết mọi người không cung cấp đủ lượng magie cần thiết cho cơ thể mỗi ngày. Sự thiếu hụt magie trong máu có thể gặp ở tình trạng suy dinh dưỡng, kém hấp thu và với sự đào thải quá nhiều magie qua thận. Sự thiếu hụt magie nhẹ và vừa có thể không có hoặc có rất ít các triệu chứng không đặc hiệu. Sự thiếu hụt kéo dài hoặc nặng có thể gây buồn nôn, chán ăn, mệt mỏi, lú lẫn, co thắt cơ, co giật, thay đổi nhịp tim và cảm giác tê hoặc ngứa. Sự thiếu hụt magie cũng có thể ảnh hưởng đến sự trao đổi canxi và làm trầm trọng thêm sự thiếu hụt canxi.

- *Hàm lượng*

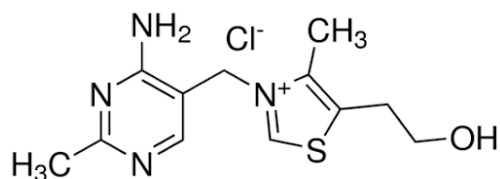
Trên thực tế, một phụ nữ trưởng thành cần khoảng 310 mg/ngày và 320 mg/ngày sau 30 tuổi, riêng phụ nữ mang thai cần 40 mg/ngày. Đàn ông trưởng thành dưới 31 tuổi cần 400 mg/ngày. Trẻ em nên được cung cấp từ 30 mg/ngày đến 410 mg/ngày, tùy thuộc vào độ tuổi và giới tính của chúng. Tuy nhiên, bổ sung quá nhiều magie sẽ dẫn đến sự dư thừa và gây ra các triệu chứng như buồn nôn, yếu cơ, mất cảm giác ngon miệng và nhịp tim không đều [34].

1.3. Tổng quan về vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉

1.3.1. Vitamin B₁

Vitamin B₁ là hợp chất phổ biến trong tự nhiên có nhiều trong các thực phẩm như: nấm men, cám gạo, mầm lúa mì, măng tây, đậu xanh, hạt vừng và có lượng nhỏ trong sữa, trứng, thịt, gan, thận. Trong đó, nấm men cung cấp một lượng vitamin B₁ rất lớn nên thường được dùng vào mục đích chữa bệnh khi cơ thể bị thiếu hụt loại vitamin này. Nhìn chung, vitamin B₁ có ở hầu hết trong động vật và thực vật, tuy nhiên hàm lượng của nó trong các loại này thấp.

- *Cấu trúc*



Hình 1.3. Công thức cấu tạo của vitamin B₁

- Công thức phân tử: C₁₂H₁₇N₄OS⁺, khối lượng phân tử: 265,355 g/mol.
- Công thức cấu tạo của vitamin B₁ được thể hiện trong hình 1.3.
- Tên gọi khác của vitamin B₁ là thiamin hay aneurine.
- Độ tan: trong nước (10⁵ mg/L), glycerol (55,6.10³ mg/L), ethanol 95% (10⁴ mg/L), tan nhiều trong metanol, không tan trong benzen, hexan, cloroform và ether.
- Hằng số phân li pKa = 10,3 (nhóm -NH₂).

- *Tác dụng*

Vitamin B₁ giúp đảm bảo quá trình trao đổi chất, ngăn ngừa tổn thương thần kinh, duy trì hệ miễn dịch khỏe mạnh [20, 54]. Nhờ vậy, có thể phòng và trị bệnh Beri-Beri, giúp tim mạch khỏe mạnh, cải thiện trí nhớ, làn da, thị lực... Tác dụng quan trọng nhất của vitamin B₁ là việc ngăn ngừa tổn thương hệ thống thần kinh.

Khi thiếu hụt vitamin B₁ sẽ gây nên 2 loại bệnh chính: bệnh Beri-Beri (phù nề khô, phù nề ướt), bệnh não Wernicke (có thể hiểu là gây rối loạn nhân cách, giảm trí nhớ, trầm cảm, rối loạn tâm thần...). Tuy nhiên, nếu sử dụng vitamin B₁ với hàm lượng cao trong thời gian dài thì có thể dẫn đến ngộ độc hoặc có thể để lại những phản ứng phụ nguy hiểm.

- *Hàm lượng*

Tùy vào các đối tượng khác nhau mà hàm lượng vitamin B₁ cần thiết là khác nhau và sẽ tăng theo độ tuổi. Ví dụ: trẻ sơ sinh từ 0 - 6 tháng cần 0,3 mg/ngày; trẻ từ 4 - 6 tuổi cần 0,9 mg/ngày; trẻ em từ 7 - 10 tuổi cần 1,0 mg/ngày; phụ nữ từ 19 tuổi trở lên cần 1,0 - 1,1 mg/ngày; đặc biệt phụ nữ có thai và cho con bú cần 1,5 - 1,6 mg/ngày [44].

- *Dạng bào chế*

Vitamin B₁ có các dạng bào chế và hàm lượng chủ yếu như sau:

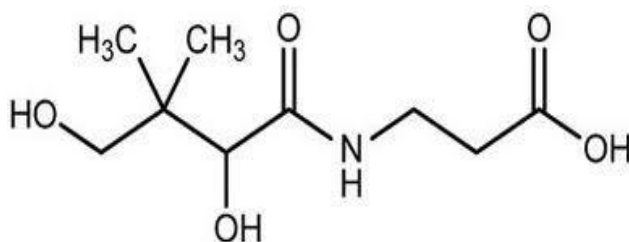
- Viên nang – đường uống: hàm lượng 50 mg/viên
- Viên nén – đường uống: hàm lượng 50 mg/viên, 100 mg/viên, 250 mg/viên
- Dung dịch – đường tiêm: hàm lượng 100 mg/ml

1.3.2. Vitamin B₅

Vitamin B₅ là một vitamin tan trong nước, được tìm thấy trong thực vật và động vật. Đây là hợp chất rất phổ biến trong các nguồn thực phẩm quen thuộc hằng ngày như: pho mát, ngô, trứng, gan, thịt, lạc, đậu Hà Lan, đậu nành, men bia rượu, mầm lúa mì, thạch hoàng gia, sữa chua, lê tàu, nấm, súp lơ và các loại hạt.

- *Cấu trúc*

- Công thức phân tử: C₉H₁₇NO₅; khối lượng phân tử: 219,235 g/mol.
- Công thức cấu tạo của vitamin B₅ được thể hiện trong hình 1.4.



Hình 1.4. Công thức cấu tạo của vitamin B₅

- Tên gọi khác của vitamin B₅: propanoic; acid pantothenic.
- Tan tốt trong nước, benzen, etyl ete, axit axetic; tan vừa phải trong ether, ancol; không tan trong benzen, cloroform.
- Hằng số phân li acid là pK_a = 4,41 (nhóm – COOH).

- *Tác dụng*

Vitamin B₅ góp phần hình thành coenzyme A, nó cần thiết cho tất cả các hoạt động chuyển hóa năng lượng của tế bào, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phát triển và độ bền của da cũng như niêm mạc. Bên cạnh đó, vitamin B₅ cũng có vai trò trong quá trình phát triển chức năng của hệ thần kinh trung ương [36]. Ngoài ra, vitamin B₅ còn tác dụng lớn trong việc làm đẹp như chống lão hóa, ngăn ngừa mụn đỏ, viêm da.

Trong thực tế, việc thiếu hụt vitamin B₅ chỉ được tìm thấy ở những người suy dinh dưỡng. Khi thiếu vitamin B₅ không gây ra những hậu quả nghiêm trọng nhưng

lâu dài sẽ dẫn đến những bệnh lý gây suy giảm sức khỏe như: tê bì tay chân, buồn nôn, hạ đường huyết, mệt mỏi, khó chịu, mất ngủ, trầm cảm, đau dạ dày [32].

- *Hàm lượng*

Hàm lượng vitamin B₅ hằng ngày cần cho các đối tượng khác nhau là khác nhau và tăng theo độ tuổi. Ví dụ: trẻ từ 0-6 tháng cần 1,7 mg, trẻ từ 14 tuổi trở lên cần 5,0 mg và phụ nữ đang mang thai hoặc cho con bú cần một lượng vitamin B₅ cao hơn và nên tham khảo ý kiến bác sĩ [44].

- *Dạng bào chế*

Vitamin B₅ có các dạng bào chế và hàm lượng chủ yếu như sau:

- Acid pantothenic

Viên nén: 50 mg; 100 mg; 200 mg; 250 mg; 500 mg.

Viên nén giải phóng chậm: 500 mg, 1 000 mg.

- Calci pantothenat

Viên nén: 10 mg; 25 mg; 50 mg; 100 mg; 218 mg; 500 mg; 545 mg.

- Dexpantenol (dẫn chất alcol của acid D-pantothenic):

Viên nén: 100 mg.

Thuốc tiêm: 250 mg/ml (ống tiêm 2 ml).

1.3.3. Vitamin B₉

Vitamin B₉ được phát hiện đầu tiên trong nấm men, sau đó được phân lập từ lá “bina” nên nó được đặt tên là acid folic hoặc folate [70]. Nó được tìm thấy trong cả thực vật và động vật. Vitamin B₉ được tìm thấy nhiều trong gan, các loại đậu và rau xanh.

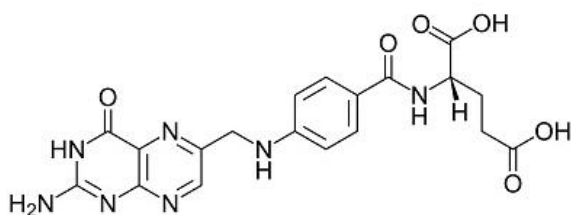
- *Cấu trúc*

- Công thức phân tử: C₁₉H₁₉N₇O₆; khối lượng phân tử: 441,3975 g/mol.

- Tên gọi khác của vitamin B₉: acid folic, folacin.

- Độ tan trong nước: 1,6 mg/L (25 °C); tan nhẹ trong metanol, ít tan trong etanol và butanol; không tan trong acetone, chloroform, ether, benzen.

- Công thức cấu tạo của vitamin B₉ được thể hiện trong hình 1.5.



Hình 1.5. Công thức cấu tạo của vitamin B₉

- Các hằng số phân li acid là $pK_{a1} = 4,65$ (nhóm $-\text{COOH}$), $pK_{a2} = 6,75$ (nhóm $-\text{COOH}$), $pK_{a3} = 9,00$ (nhóm $-\text{NH}_2$).

- *Tác dụng*

Vitamin B₉ giúp giảm khả năng bị ung thư, cải thiện sức khỏe tim mạch, ngăn ngừa đột quỵ, tái tạo tế bào máu và giúp tế bào máu phát triển,... Đặc biệt đối với phụ nữ mang thai, vitamin B₉ có tác dụng hỗ trợ thai kỳ khỏe mạnh đồng thời giảm thiểu bệnh khuyết tật ống thần kinh ở thai nhi, giúp thai nhi phát triển cột sống và não bộ [20, 42, 60].

Thiếu vitamin B₉ cũng có thể gây ra nhiều vấn đề sức khỏe không mong muốn. Các triệu chứng thường gặp khi thiếu vitamin B₉: thiếu máu macrocytic, suy nhược và lú lẫn, suy giảm trí nhớ, khó thở, bệnh thần kinh ngoại biên, đối với phụ nữ mang thai khi hàm lượng vitamin B₉ thấp sẽ làm tăng nguy cơ dị tật bẩm sinh ở thai nhi, trầm cảm. Khi thiếu vitamin B₉ trong thời gian dài, nó cũng làm phát triển tế bào ung thư do sự tổng hợp và sửa chữa ADN bị suy giảm [42].

Khi bổ sung quá nhiều vitamin B₉ sẽ không xuất hiện tác dụng phụ nghiêm trọng đối với cơ thể, tuy nhiên sử dụng liều quá cao có thể ảnh hưởng đến việc hấp thu kẽm.

- *Hàm lượng*

Hàm lượng vitamin B₉ hằng ngày cần cho các đối tượng khác nhau là khác nhau và tăng theo độ tuổi. Ví dụ: trẻ từ 0 - 6 tháng cần 0,065 mg/ngày, từ 14 tuổi trở lên cần 0,4 mg/ngày và phụ nữ mang thai cần 0,6 mg/ngày [44].

- *Dạng bào chế*

Vitamin B₉ có các dạng bào chế và hàm lượng chủ yếu như sau:

- Viên nang, viên nén 0,4 mg/viên; 0,8 mg/viên; 1 mg/viên; 5 mg/viên.

- Dung dịch, thuốc tiêm: 5 mg/ml (dưới dạng muối natri folat).
- Chế phẩm phối hợp đa vitamin khác nhau với hàm lượng khác nhau để uống, chế phẩm phối hợp với sắt.

1.4. Các phương pháp phân tích

Glucosamin, các vitamin nhóm B và khoáng chất (magie, canxi) chủ yếu được xác định riêng rẽ bằng nhiều phương pháp khác nhau như: quang phổ, điện hóa, sắc ký lỏng, điện di mao quản,...

1.4.1. Phương pháp quang phổ

1.4.1.1. Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử

Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử là phương pháp phân tích dựa trên cơ sở mật độ quang của dung dịch tỷ lệ với nồng độ của chất phân tích (chất phân tích có tính chất quang học như tính hấp thụ quang, tính phát quang...). Các phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử khá đơn giản, dễ tiến hành, được ứng dụng nhiều trong phân tích mẫu.

Priya Gaonkar và các cộng sự đã sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis xác định glucosamin sulfat trong TPCN dạng viên nén. Trong nghiên cứu này, glucosamin được phản ứng với phenylisothiocyanat trong môi trường bazơ tạo ra dẫn xuất phenylthiourea có bước sóng hấp thụ cực đại là 240nm. Khoảng nồng độ đường chuẩn là 5- 25 $\mu\text{g/mL}$ với hệ số tương quan lớn hơn 0,99 và độ lệch chuẩn tương đối RSD = 1,1%. Phương pháp có ưu điểm là đơn giản, phát hiện nhanh chóng, chính xác các sản phẩm TPCN chứa glucosamin được bán trên thị trường [65].

Yamaguchi và các cộng sự sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis xác định glucosamin dựa trên phản ứng màu với phức hợp palladium (II)-o-hydroxyhydroquinonephthalein-hexadecyltrimethylammonium cho bước sóng hấp thụ cực đại là 630 nm. Khoảng đường chuẩn được xây dựng là 0,02- 0,18 $\mu\text{g/mL}$, độ lệch chuẩn tương đối thu được là 1,08%. Phương pháp đã tiến hành áp dụng trên các mẫu TPCN dạng viên nén [73].

Nhóm các nhà khoa học tại Syria đã xây dựng phương pháp phân tích canxi trong nguyên liệu dược phẩm và TPCN dạng viên. Phương pháp dựa trên sự hình

thành phức hợp cặp ion màu vàng giữa pitavastatin canxi và bromocresol tím (BCP) trong môi trường chloroform. Các thông số khác nhau ảnh hưởng đến phản ứng như: ảnh hưởng của dung môi, độ ổn định, nồng độ thuốc thử đã được tối ưu hóa. Phức chất tạo thành được định lượng bằng quang phổ ở bước sóng 405 nm. Khoảng tuyến tính được xây dựng trong khoảng 2,20 - 35,2 $\mu\text{g/ml}$, hệ số tương quan tốt ($R^2 > 0,99$). Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,367 $\mu\text{g/ml}$ và 1,112 $\mu\text{g/ml}$. Độ thu hồi của phương pháp khoảng 101% [69].

Zeriet O Tesfaldet cùng cộng sự đã xác định được magie trong các mẫu dược phẩm bằng cách sử dụng phương pháp UV-Vis. Phương pháp này dựa trên phản ứng giữa o-cresolphthalein complexone (CPC) và Mg (II) trong môi trường kiềm, tạo ra một phức chất có màu hồng với cực đại hấp thụ ở bước sóng 570 nm. Tất cả các thông số ảnh hưởng đến phản ứng đã được đánh giá. Đường chuẩn tuyến tính trên khoảng 0-20 mg/L với giới hạn phát hiện là 0,24 mg/L. Thông lượng mẫu là 80 mẫu mỗi giờ và độ lệch chuẩn tương đối $< 2,0\%$. Kiểm định t cho thấy không có sự khác biệt đáng kể ở độ tin cậy 95%. Phương pháp đã được áp dụng thành công để xác định magie trong các mẫu dược phẩm dạng viên nén [85].

Trong một nghiên cứu khác, Mohamed Benamor cùng cộng sự đã dùng phương pháp UV-Vis để xác định đồng thời canxi và magie trong các mẫu dược phẩm. Phương pháp này dựa trên các phức màu được tạo thành bởi canxi và magie với Tween 80. Nghiên cứu sử dụng thiết bị quang phổ UV-Vis hai chùm tia Shimadzu UV-2101PC với chiều rộng khe cố định 0,5 nm. Phức Ca (II) có cực đại hấp thụ ở bước sóng 544,5 nm và phức Mg (II) hấp thụ cực đại ở bước sóng 570 nm. Độ lệch chuẩn tương đối của phương pháp dẫn xuất thứ nhất và thứ hai của Ca (II) lần lượt là 1,73% và 1,74%, và của Mg (II) lần lượt là 1,09% và 1,16% [51].

1.4.1.2. Phương pháp quang phổ nguồn plasma cảm ứng cao tần (ICP)

Phương pháp quang phổ nguồn plasma cảm ứng cao tần là phương pháp xác định hàm lượng các nguyên tố trong nhiều lĩnh vực khác nhau như nông nghiệp, thực phẩm, dược phẩm, môi trường,... Nguyên tử hay ion nhận năng lượng kích thích từ plasma chuyển từ trạng thái cơ bản lên trạng thái kích thích. Tuy nhiên, trạng thái

kích thích chỉ tồn tại trong thời gian rất ngắn (khoảng $10^{-12} - 10^{-8}$ s), sau đó nguyên tử hay ion phóng thích năng lượng hấp thu dưới dạng bức xạ λ để trở về trạng thái bền nhất- trạng thái cơ bản.

Anna Krejcova và các cộng sự đã xác định được nhiều nguyên tố gồm canxi và magie trong các mẫu TPCN bằng phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma cảm ứng. Mẫu thủy phân bằng acid nitric 65% trong lò vi sóng với chương trình công suất đạt 80 % trong 10 phút, và công suất đạt 100 % trong 10 phút. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 5,13 mg/g đối với canxi và 7,93 mg/g đối với magie. Hàm lượng nguyên tố canxi và magie trong năm mẫu TPCN dạng bột được xác định cho kết quả tương ứng so với nhãn trên bao bì [11].

Hàm lượng 26 nguyên tố bao gồm canxi và magie trong TPCN dành cho trẻ sơ sinh được xác định bằng phương pháp quang phổ phát xạ nguyên tử plasma cảm ứng bởi Abua Ikem và các cộng sự nghiên cứu ra. Các mẫu sữa lỏng và sữa bột được phân hủy bằng thiết bị vi sóng Milestone Ethos-PLUS. Hàm lượng trung bình canxi phát hiện trong 11 sản phẩm sữa nằm trong khoảng 344 – 662 $\mu\text{g/g}$ [9].

Một số nghiên cứu sử dụng phương pháp quang phổ xác định canxi, magie, glucosamin và các vitamin nhóm B trong mẫu dược phẩm và TPCN được tóm tắt trong bảng 1.2.

Bảng 1.2. Tóm tắt một số nghiên cứu bằng phương pháp quang phổ

Chất phân tích	Mẫu	Phương pháp	Thông số phương pháp	TLTK
Glucosamin sulfat	Thực phẩm chức năng	UV-Vis	- Khoảng tuyến tính: 5-25 $\mu\text{g/mL}$	[65]
Glucosamin	Thực phẩm chức năng	UV-Vis	- Khoảng tuyến tính: 0,02-0,18 $\mu\text{g/mL}$	[73]
Canxi	Dược phẩm, thực phẩm chức năng	UV-Vis	LOD: 0,367 $\mu\text{g/mL}$	[69]
Magie	Dược phẩm	UV-Vis	LOD: 0,24 mg/L	[85]

Canxi, magie	Dược phẩm	UV-Vis	LOD: Ca: 0,0575 µg/mL; Mg: 0,03 µg/mL	[51]
Vitamin B ₆	Dược phẩm	UV-Vis	LOD: 0,534 µg/mL	[58]
Vitamin B ₆	Dược phẩm	UV-Vis	LOD: 0,14 µg/mL	[53]
Canxi, magie	Thực phẩm chức năng	ICP-OES	LOD: Ca: 5,13 mg/g; Mg: 7,93 mg/g	[11]

1.4.2. Phương pháp phân tích điện hóa

Các cảm biến điện hóa được nghiên cứu và ứng dụng từ lâu và vẫn luôn thu hút được sự quan tâm của các phòng thí nghiệm cũng như các hãng sản xuất. Các cảm biến điện hóa có ưu điểm là phân tích nhanh, có độ chọn lọc, độ nhạy cao và thường có kích thước nhỏ gọn, có thể phân tích tại hiện trường.

Một quy trình tổng hợp điện cực carbon biến tính dựa trên vòng diamide xác định chọn lọc canxi đã được tác giả Mojtaba và các cộng sự nghiên cứu thành công. Điện cực carbon được biến tính bằng một ionophore là 1,4-diaza-2,3; 8,9-dibenzo-7,10-dioxacyclododecane-5,12-dione. Khoảng tuyến tính rộng từ $1,3 \cdot 10^{-6}$ M đến $3,2 \cdot 10^{-3}$ M. Giới hạn phát hiện của phương pháp là $7,9 \cdot 10^{-7}$ M. Nghiên cứu đã áp dụng thành công xác định hàm lượng canxi trong các mẫu dược phẩm [52].

Tác giả Olayemi cùng cộng sự đã phát triển phương pháp phân tích điện hóa để xác định canxi trong TPCN khi có mặt acid humic và ion Cu (II). Phương pháp von-ampe vòng sử dụng điện cực vàng. Thế bắt đầu là -1,5 V với tốc độ quét 25 mV/s và thế kết thúc là 1,5 V. Canxi có khoảng tuyến tính nằm trong khoảng 3,76-5,4 mM với hệ số tương quan cao ($R^2 > 0,999$) và giới hạn phát hiện là $6,91 \cdot 10^{-4}$ M. Phương pháp được áp dụng trong các mẫu TPCN dạng uống [60].

Canxi được xác định trên điện cực Carbon thủy tinh bằng kỹ thuật đo sóng vuông được tác giả Joseany và cộng sự tiến hành nghiên cứu thử nghiệm. Điều kiện tối ưu của nghiên cứu là dung dịch điện ly amoni 10^4 µM pH 9,4 và 400 µL EDTA

$10^4 \mu\text{M}$ với thế quét nằm trong khoảng từ $-0,6 \text{ V}$ đến $0,6 \text{ V}$. Giới hạn phát hiện của canxi là $1,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$; độ thu hồi khoảng 102% [39].

Tác giả Dilgin sử dụng điện cực than chì phân tích hàm lượng canxi dobesilate trong mẫu dược phẩm. Nghiên cứu xây dựng khoảng tuyến tính từ 0,2 đến $100 \mu\text{M}$ với hệ số tương quan cao. Giới hạn phát hiện của phương pháp là $0,065 \mu\text{M}$ và độ lệch chuẩn tương đối trong khoảng 1,1-2,0%. Ảnh hưởng của các ion cản trở khác nhau trong nền mẫu không đáng kể được tiến hành khảo sát [30].

Tác giả K. L. Westmacott cùng cộng sự đã phát triển phương pháp phân tích điện hóa để xác định đồng thời 3 vitamin B (vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆) trong mẫu TPCN và dược phẩm. Phương pháp von-ampe vòng sử dụng điện cực carbon với đệm photphat 0,1 M; pH = 11. Thế bắt đầu là $-1,0 \text{ V}$ với tốc độ quét 100 mV/s và thế kết thúc là $0,1 \text{ V}$. Vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆ có khoảng đường chuẩn lần lượt là $15\text{-}110 \mu\text{g/mL}$; $0,1\text{-}20 \mu\text{g/mL}$; $2\text{-}80 \mu\text{g/mL}$ và có giới hạn phát hiện lần lượt: $3,5 \mu\text{g/mL}$ (vitamin B₁); $0,1 \mu\text{g/mL}$ (vitamin B₂); $0,4 \mu\text{g/mL}$ (vitamin B₆). Độ thu hồi trong khoảng từ 110% đến 112% [80].

Tác giả Kwok- Keung Shiu và Kang Shi đã nghiên cứu xác định vitamin B₂ trên điện cực than thủy tinh đã hoạt hóa. Điện cực được anot hóa ở $+2,0 \text{ V}$ trong môi trường H₂SO₄ 0,5 M trong 1,5 phút sau đó giữ ở $-1,0 \text{ V}$ trong 1 phút rồi quét thế vòng từ $-0,5 \text{ V}$ đến $+0,8 \text{ V}$ với tốc độ quét thế 100 mV/s . Khoảng đường chuẩn là $0,1\text{-}3 \mu\text{M}$ và hệ số tương quan là 0,996. Độ lặp lại RSD = 7%. Tuy nhiên, sự hấp phụ vitamin B₂ lên bề mặt điện cực bị ảnh hưởng bởi sự cạnh tranh của các ion và các chất khác trong dung dịch đồng thời điện cực có thể bị nhiễm bẩn trong quá trình làm giàu [40].

1.4.3. Phương pháp sắc kí lỏng (LC)

Sắc ký là phương pháp dùng để tách các thành phần của một hỗn hợp dựa trên sự phân chia khác nhau của các chất vào hai pha luôn tiếp xúc nhưng không hòa tan vào nhau là pha tĩnh có bề mặt tiếp xúc lớn và pha động chạy qua pha tĩnh. Pha tĩnh có thể là một chất rắn (hạt xốp hay mịn) hay một chất lỏng (được giữ trên một chất mang). Khi pha động là chất lỏng, phương pháp được gọi là phương pháp sắc kí lỏng (LC), tương tự khi pha động là chất khí, phương pháp được gọi là phương pháp sắc

kí khí (GC). So với phương pháp GC, phương pháp HPLC phân tích kháng sinh được sử dụng phổ biến hơn. Trong phương pháp HPLC, tùy thuộc vào cấu trúc phân tử, tính chất hóa lý, nồng độ của kháng sinh trong mẫu dược phẩm và mẫu sinh học, ... mà lựa chọn các detector phù hợp để phát hiện như detector UV, DAD, MS, ... Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao đã được nhiều tác giả sử dụng để xác định glucosamin [6, 12, 13, 68, 75, 78, 79, 82] và xác định các vitamin [7, 10, 21, 35, 55].

Tác giả Rada Amid và cộng sự sử dụng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) để xác định đồng thời các vitamin nhóm B gồm vitamin B₁, vitamin B₃, vitamin B₆ và vitamin B₁₂ trong mẫu thực phẩm chức năng. Việc xác định các vitamin đã được tiến hành trên cột Supelcosil ABZ⁺ (15 cm; 4,6 mm; 5 μm) với pha động là methanol/triethylamine (TEA) 0,1% (25:75 v/v); pH = 2,8. Nghiên cứu sử dụng detector UV-Vis Waters M 484 tại bước sóng 290 nm. Khoảng đường chuẩn của vitamin B₁, vitamin B₃, vitamin B₆, vitamin B₉ và vitamin B₁₂ lần lượt là 10-30 μg/mL; 20-60 μg/mL; 5-15 μg/mL; 0,4-1,2 μg/mL; 0,5-1,5 μg/mL với hệ số tương quan R² > 0,9980. Độ chính xác của phương pháp đã được kiểm tra bằng cách xác định độ thu hồi trung bình. Độ thu hồi của tất cả các vitamin nhóm B ở dạng viên có giá trị dao động trong khoảng từ 90,4% đến 108,5% (RSD từ 0,5% đến 4,1%) [10].

Cũng theo một nghiên cứu khác, phương pháp RP-HPLC đã được các tác giả R. Ekine và C. Kadakal phát triển để xác định các vitamin nhóm B trong mẫu thực phẩm chức năng của Thổ Nhĩ Kỳ. Các vitamin này được phân tích trên cột C18 (150 mm × 4,6 mm) với pha động là KH₂PO₄ 0,1 mol/L (pH = 7,0) và methanol 90:10 (v/v), tốc độ dòng là 0,7 mL/phút. Các giới hạn phát hiện nằm trong khoảng từ 0,1 mg/L đến 0,5 mg/L. Độ chính xác của phương pháp đã được kiểm tra thông qua độ thu hồi trung bình, giá trị dao động trong khoảng 96,51% đến 99,40% [21].

Trong một công trình nghiên cứu khác, các tác giả Jin Tan, Rong Li và Zi-Tao Jiang [35] đã sử dụng phương pháp sắc ký lỏng tương tác ưa nước (HILIC) để xác định vitamin B₁, nghiên cứu sử dụng cột titania với detector UV. Theo bài báo này, điều kiện tiến hành xác định vitamin B₁: pha động là đệm phosphate 2 mM với pH = 6,5 trong 60% MeCN (v/v), nhiệt độ cột ở 25 °C, thể tích bơm mẫu 20 μL, tốc độ

dòng là 1mL/phút, detector UV đo ở bước sóng 240 nm. Phương pháp có độ tuyến tính tốt ($R^2 = 0,9997$), giới hạn phát hiện của vitamin B₁ là 75 ng/mL.

Một số nghiên cứu sử dụng phương pháp sắc ký lỏng xác định glucosamin và các vitamin nhóm B trong mẫu dược phẩm và TPCN được tóm tắt trong bảng 1.3.

Bảng 1.3. Tóm tắt một số nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký lỏng

Chất phân tích	Nền mẫu	Detector	Thông số phương pháp	TLTK
Glucosamin	Thực phẩm chức năng	Detector đo chỉ số khúc xạ	- $R^2 > 0,999$ - Độ thu hồi: 98,4 %	[79]
Glucosamin	Thực phẩm chức năng	DAD	- Khoảng tuyến tính: 0,05-2,5 mg/L - LOD: 0,014 mg/L - LOQ: 0,046 mg/L	[13]
Glucosamin	Dược phẩm	UV	- Khoảng tuyến tính: 6000-9000 $\mu\text{g/mL}$ - LOD: 2,939 $\mu\text{g/mL}$ - LOQ: 9,796 $\mu\text{g/mL}$ - $R^2 > 0,999$	[68]
Glucosamin	Dược phẩm	UV	- $R^2: 0,9998$ - LOD = 0,02 $\mu\text{g/ml}$ - RSD < 1%	[12]
Glucosamin sulfate	Thực phẩm chức năng	PDA	- Khoảng tuyến tính: 600 - 1400 $\mu\text{g/mL}$ - Độ thu hồi: 98- 102% - RSD < 2%	[6]
Glucosamin	Dược phẩm, thực phẩm chức năng	UV	- LOD=0,0039 $\mu\text{g/mL}$ - RSD <2%	[75]

Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₆	Thực phẩm chức năng	MS	- Khoảng tuyến tính: 0,2-200 ng/mL - LOD: 0,027-0,038 µg/g	[7]
Vitamin B ₁ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₆ , Vitamin B ₉	Dược phẩm, Thực phẩm chức năng	UV	- LOD: 0,625-1,25 µg/mL - Khoảng tuyến tính: 10-30 µg/mL	[10]
Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₆ , Vitamin B ₉	Thực phẩm chức năng	UV	- Khoảng tuyến tính: 1-200 mg/L - LOD: 0,1-0,5 mg/L	[21]
Vitamin B ₁	Thực phẩm chức năng	UV	- LOD: 75 ng/mL - R ² : 0.9997	[35]

1.4.4. Phương pháp điện di mao quản

Hiện nay, phương pháp điện di mao quản được sử dụng rộng rãi do tính chất ưu việt về hiệu quả tách cao, thời gian tách ngắn, lượng mẫu tiêu tốn ít. Phương pháp đã được ứng dụng phân tách và xác định các khoáng chất, glucosamin và các vitamin nhóm B trong nhiều đối tượng mẫu khác nhau.

Mg²⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ trong các sản phẩm TPCN dạng tiêm được Susanne Nussbaumer và các cộng sự [59] xác định bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D). Nghiên cứu sử dụng mao quản silica (64,5 cm×50 µm ID); dung dịch điện ly là hỗn hợp Tris-acetate 100 mM (pH=4,5) và acetonitrile (80:20, v/v); thế tách +30 kV. Hiệu suất thu hồi đạt 98,6-101,8%; độ lệch chuẩn (RSD) dao động từ 0,4-1,3%. Phương pháp này đã được ứng dụng để xác định Mg²⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ trong các sản phẩm TPCN theo dạng đường tiêm.

Nhóm tác giả Patcharin Chaisuwan và cộng sự [62] đã xác định thành công được glucosamin trong dược phẩm bằng phương pháp điện di mao quản trong thời gian phân tích nhanh (dưới 3 phút). Theo nghiên cứu, chất phân tích được tối ưu hóa trong các điều kiện thí nghiệm: 20 mM đệm MES/His (pH = 6,0) với detector C⁴D; mao

quản silica có đường kính ID = 100 μm , tổng chiều dài 35cm và chiều dài hiệu dụng là 24cm; điện áp +7 kV tại nhiệt độ 25°C. Việc bơm mẫu được thực hiện theo phương pháp thủy động học (5s dưới áp suất 0,5 psi). Độ lệch chuẩn tương đối RSD < 1,91% và độ thu hồi của phương pháp nằm trong khoảng 86,5- 104,78 %. Khoảng tuyến tính được xây dựng trong khoảng 0,10 - 2,50 mg/mL với hệ số tương quan lớn.

Một nghiên cứu khác xác định glucosamin trong dược phẩm và TPCN đã sử dụng phương pháp điện di mao quản vùng kết hợp với detector độ dẫn điện không tiếp xúc. Theo đó, Pavel Jác cùng cộng sự [63] đã tối ưu được các điều kiện phân tích như: mao quản silica (chiều dài mao quản 75cm với chiều dài hiệu dụng 27cm, ID 50 μm), dung dịch điện ly là đệm acetate 30mM (pH=5,2), thế điện áp 30 kV với hệ bơm mẫu tự động. Thời gian phân tách nhanh dưới 3 phút. Khoảng tuyến tính xây dựng trong khoảng 100- 300 $\mu\text{g/mL}$ với hệ số tương quan R^2 cao 0,997. Giới hạn phát hiện là 9,3 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của phương pháp khoảng 2,35 % (n= 15) và độ thu hồi tìm được trong khoảng 94,6- 103,3 %.

Một nghiên cứu của tác giả L. Fotsing và cộng sự [25] đã xác định được 6 vitamin tan trong nước (vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₃, vitamin B₅, vitamin B₆, vitamin C) trong dược phẩm bằng phương pháp điện di mao quản vùng sử dụng detector UV. Điều kiện tối ưu được chọn để phân tích đồng thời các chất là đệm borat 50 mM; pH = 8,5; thế tách 25 kV; nhiệt độ 25 °C; detector UV bước sóng 225 nm cho vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₃ và vitamin C bước sóng 215 nm cho vitamin B₅ và vitamin B₆. Phương pháp cho kết quả tuyến tính tốt $R^2 > 0,99$.

Các tác giả Marina Franco, Renata Jasionowska và Elisa Salvatore [47] đã xác định thành công đồng thời các vitamin nhóm B (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉) trong dược phẩm và thuốc thú y bằng phương pháp điện di mao quản vùng (CZE). Theo nghiên cứu, các chất phân tích được tách ở điều kiện tối ưu là đệm tetraborat 20 mM với pH = 9,2; detector UV-DAD; mao quản silica có đường kính trong ID = 50 μm ; tổng chiều dài 59,5 cm; chiều dài hiệu dụng 49,5 cm; thế tách 20 kV và nhiệt độ 25 °C, bơm mẫu được thực hiện theo phương pháp thủy động học. Nghiên cứu sử dụng detector UV-DAD tại bước sóng 214 nm cho tín hiệu của tất cả các loại vitamin ngoại

trừ vitamin B₅ (190 nm) và vitamin B₂ (260 nm). Độ thu hồi 97,0-101,4%.

Một số nghiên cứu sử dụng phương pháp điện di mao quản xác định canxi, magie, glucosamin và các vitamin nhóm B trong mẫu dược phẩm và TPCN được tóm tắt trong bảng 1.4.

Bảng 1.4. Tóm tắt một số nghiên cứu bằng phương pháp điện di mao quản

Chất phân tích	Nền mẫu	Detector	Thông số phương pháp	TLTK
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺	Thực phẩm chức năng	C ⁴ D	- R ² > 0,999 - LOD: 0,02 mM	[59]
Glucosamin	Dược phẩm, Thực phẩm chức năng	C ⁴ D	- Khoảng tuyến tính: 0,10 - 2,50 mg/mL - R ² > 0,99	[62]
Glucosamin	Thực phẩm chức năng	UV	- Khoảng tuyến tính: 40-400 µg/mL - R ² > 0,98 - LOD: 33,3 µg/mL	[57]
Glucosamin	Dược phẩm, Thực phẩm chức năng	C ⁴ D	- Khoảng tuyến tính: 100-300 µg/mL - R ² > 0,997 - LOD: 9,2 µg/mL	[63]
Glucosamin	Thực phẩm chức năng	UV	- R ² > 0,96 - LOD: 0,1 mM	[37]
Glucosamin, Chondroitin sulphat	Thực phẩm chức năng	UV	- Khoảng tuyến tính: 10-100 mg/L (glucosamin); 20-200 mg/L (Chondroitin sulphat) - R ² > 0,999 - LOD: 0,8 mg/L (glucosamin); 3,0 mg/L (Chondroitin sulphat)	[22]
Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₆ , Vitamin C	Thực phẩm chức năng	UV	- R ² > 0,99	[25]

Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₆ , Vitamin B ₁₂	Thực phẩm chức năng	UV	- R ² > 0,99 - LOD: 0,25; 0,06; 0,07; 0,25; 0,30; 2,00 µg/mL (tương ứng vitamin B ₁ ; B ₂ ; B ₆ ; B ₃ ; B ₁₂ ; B ₅)	[48]
Vitamin B ₁ , Vitamin B ₂ , Vitamin B ₃ , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₆ , Vitamin B ₉	Dược phẩm	UV- DAD	- R ² > 0,99 - LOD: 0,9-9,0 µg/mL	[47]

Trên cơ sở các kết quả tổng quan được về các phương pháp phân tích có thể thấy nhìn chung, phương pháp quang học và phương pháp điện hóa đơn giản, dễ tiến hành, nhưng chỉ xác định được từng chất riêng rẽ và không phù hợp với các mẫu đa thành phần. Phương pháp HPLC cho kết quả tách tốt, độ chính xác, độ nhạy cao nhưng giá thành và chi phí phân tích một mẫu lớn. Phương pháp này dù xác định được đồng thời nhiều đối tượng chất, tuy nhiên không phân tích được đồng thời các chất có tính chất khác nhau như glucosamin và Ca, vitamin B₆ và Mg.... Phương pháp di mao quản (CE) có thể xác định đồng thời các nhóm chất với dung dịch điện ly khá đơn giản và LOD của phương pháp khá thấp, sẽ là bước phát triển mới nhằm khắc phục những nhược điểm của các phương pháp quang, điện và HPLC nhưng vẫn đảm bảo kết quả đáng tin cậy. Trong số các phương pháp CE, phương pháp CE với detector quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis được sử dụng rộng rãi nhất do hoạt động dựa trên nguyên tắc đo độ hấp thụ trong vùng UV-Vis, phù hợp với đa dạng các chất phân tích vô cơ và hữu cơ. Tuy nhiên detector này thường có độ nhạy kém do bề dày lớp đo quang trong mao quản có kích thước nhỏ, mao quản không có độ dẻo cao, dễ gãy và không áp dụng được với các chất không có khả năng hấp thụ quang. Bên cạnh đó, phương pháp CE-UV cũng không phân tích được đồng thời các chất có tính chất khác nhau như glucosamin và Ca, vitamin B₆ và Mg,... vì rất khó tìm được các phối tử hữu cơ có khả năng tạo phức đồng thời với cả 2 chất (rất khó tìm điều kiện để 2 chất có tính chất khác nhau cùng cho tín hiệu độ hấp thụ quang).

Phương pháp điện di mao quản với detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) có thể phân tích được đa dạng các hợp chất khác nhau, kể cả các chất không có khả năng hấp thụ quang, có độ bền và độ nhạy cao, vì vậy sẽ được lựa chọn để khảo sát xác định các nhóm chất trong luận án này. Đặc biệt, phương pháp CE-C⁴D có tiềm năng xác định đồng thời các chất có tính chất khác nhau như glucosamin và Ca, vitamin B₆ và Mg,... nhờ vào việc xuất hiện tín hiệu đồng thời ở dạng cation hoặc anion trên điện di đồ và việc đo độ dẫn không phụ thuộc vào tính chất của các chất trong điều kiện phân tách.

1.5. Tổng quan về phương pháp điện di mao quản

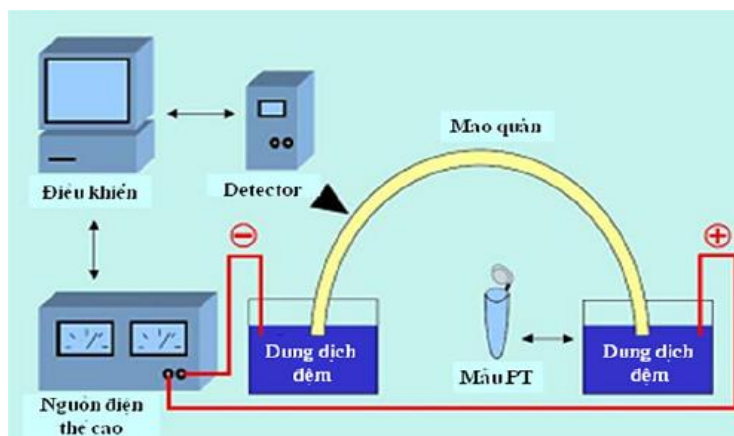
1.5.1. Giới thiệu chung về phương pháp điện di mao quản

Điện di mao quản (CE) là một kỹ thuật tách các chất dựa trên sự di chuyển khác nhau của các phân tử chất (chủ yếu là các ion mang điện tích) trong dung dịch chất điện ly có chất đệm pH dưới tác dụng một điện trường (E) nhất định được sinh ra do thế V [5]. Thuật ngữ “điện di” được Miaelis đưa ra năm 1909 khi nghiên cứu tách protein dựa trên điểm đẳng điện [41]. Tuy nhiên, nền tảng của phương pháp điện di được Tiselius đưa ra vào năm 1937, trên cơ sở nghiên cứu tách thành công hỗn hợp protein phức tạp bằng thế thấp (110-220 V) (ngày nay gọi là điện di cổ điển). Với kết quả này Tiselius đã được giải Nobel Hóa học năm 1948 và mở ra tiềm năng của phân tích điện di [5]. Tuy nhiên, trong kỹ thuật điện di cổ điển, hiệu lực tách không cao do xảy ra sự khuếch tán nhiệt và đối lưu khá lớn. Điện di mao quản thực hiện trong một ống hẹp hay một mao quản, lần đầu tiên được đề xuất bởi Hjerten năm 1967 [67], đã khắc phục những hạn chế của điện di cổ điển. Năm 1980 đánh dấu một mốc quan trọng trong CE khi Jorgenson và cộng sự đã sử dụng mao quản silica đường kính trong 75 μm để tách các hợp chất mang điện và các acid amin với detector huỳnh quang [31, 38, 76]. Hiện nay, phương pháp CE được phân loại thành các kỹ thuật điện di theo cơ chế tách như sau: Điện di mao quản vùng (Capillary zone electrophoresis- CZE), điện di mao quản điểm đẳng điện (Isoelectric focusing- IFF), điện di mao quản đẳng tốc độ (Isotachopheresis- ITP), điện di mao quản gel (Capillary gel electrophoresis- CGE), sắc ký điện di mao quản điện động học kiểu

micelle (Micellar electrophoresis capillary chromatography- MECC). Phương pháp điện di hiện đại sử dụng các mao quản có đường kính nhỏ hơn, từ 25-50 μm đã làm tăng đáng kể hiệu lực tách. Xu hướng gần đây trong nghiên cứu CE là việc thu nhỏ và tự động hóa thiết bị [19]. Ngày nay, CE đã chứng minh là một kỹ thuật tách hiệu quả, được ứng dụng rộng rãi trong khoa học, công nghệ, sinh học, lâm sàng, dược phẩm, môi trường ... [2, 18, 24, 46, 56, 61, 64, 71].

1.5.2. Nguyên tắc và cấu tạo của một hệ điện di mao quản cơ bản

Phương pháp điện di mao quản hiện đại sử dụng điện trường sinh ra bởi một nguồn thế cao (hàng chục kV) áp vào mao quản (có đường kính trong 10-150 μm) tại đầu bơm mẫu, làm cho các chất tích điện (trong nền dung dịch điện ly, có đệm pH thích hợp) di chuyển với tốc độ khác nhau và tách ra khỏi nhau [7]. Tương tự thời gian lưu trong sắc ký, trong phân tích bằng CE, thời gian di chuyển được dùng để định tính các ion, còn việc định lượng sẽ dựa trên tín hiệu điện tích pic thu được trong quá trình điện di. Trên cơ sở nguyên tắc của CE, một hệ thiết bị CE cơ bản mô tả như trong hình 1.6 [3].



Hình 1.6. Sơ đồ cấu tạo của một hệ thiết bị CE

Mẫu được bơm vào mao quản theo một trong ba phương thức: Kỹ thuật thủy động học dùng áp suất, kỹ thuật thủy động học kiểu xi phong và kỹ thuật điện động học [5]. Mao quản thường làm bằng vật liệu silic gọi là mao quản silica, phủ bên ngoài bởi một lớp polyme có độ dày từ 200-350 μm , đường kính ngoài (OD) 365 μm , đường kính trong (ID) từ 10-150 μm (phổ biến là 50 μm), chiều dài mao quản có thể từ 10-100 cm (phổ biến là 60 cm). Hai đầu mao quản được đặt trong hai bình chứa

dung dịch điện ly. Một nguồn thế cao từ 5-30 kV sẽ sinh ra điện trường (E) cho quá trình điện di xảy ra. Các kết quả thực nghiệm cho thấy với mao quản silica, bề mặt mao quản thường tích điện âm, khi đó sẽ xuất hiện một lớp điện kép làm cho thành mao quản có một điện thế nhất định (thế Zeta) [5].

1.5.3. Cơ sở lý thuyết của điện di mao quản

Sự tách các chất bằng CE dựa trên tốc độ di chuyển khác nhau của hạt tích điện dưới tác dụng của lực từ điện trường E thích hợp, tốc độ đó tỷ lệ thuận với cường độ điện trường (E).

$$v = \mu.E \quad (1.1)$$

Trong đó μ được gọi là độ linh điện di, là hằng số đặc trưng cho hạt tích điện trong một điều kiện điện di xác định. Độ điện di phụ thuộc vào lực điện di (F_e) và lực cản trở (F_f), khi tốc độ của dòng ổn định, hai lực này sẽ cân bằng ($F_e = F_f$).

Lực điện di gây ra chuyển động của hạt mang điện trong mao quản, được tính bởi công thức:

$$F_e = q.E \quad (1.2)$$

Lực cản trở sinh ra do độ nhớt của dung dịch điện ly, được thể hiện bằng định luật Stokes:

$$F_f = -6.\pi.\eta.r.v \quad (1.3)$$

Trong đó η là độ nhớt của dung dịch điện ly, r là bán kính ion.

Từ công thức (1.1), (1.2), (1.3) ta có:

$$\mu = q/(6.\pi.\eta.r.) \quad (1.4)$$

Từ công thức (1.4) có thể thấy, độ điện di tỷ lệ thuận với điện tích của phân tử mang điện và tỷ lệ nghịch với độ nhớt của dung dịch điện ly, bán kính hydrat của phân tử mang điện. Nghĩa là, trong một điện trường E nhất định, chất nào có điện tích lớn và kích thước nhỏ sẽ di chuyển nhanh; các chất mang điện cùng điện tích thì chất nào có kích thước nhỏ sẽ di chuyển nhanh hơn; các chất mang điện cùng bán kính, chất nào có điện tích lớn sẽ di chuyển nhanh hơn.

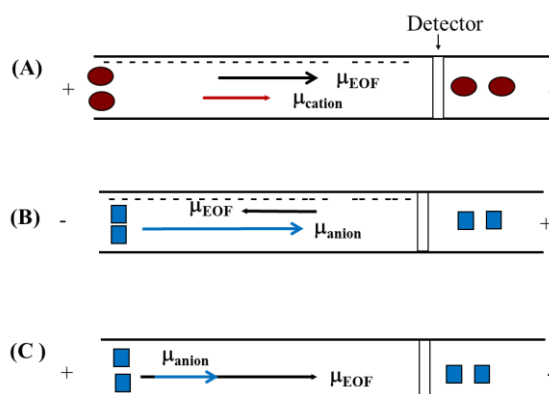
Tuy nhiên, trong thực tế, độ điện di còn phụ thuộc vào các yếu tố khác như pH, nồng độ của dung dịch điện ly, thành phần, nồng độ của chất điện ly trong pha động,

hằng số điện ly của chất phân tích, chất hoạt động bề mặt, chất phụ gia trung tính trong pha động, dung môi hữu cơ thêm vào pha động điện di hay mẫu phân tích... Và đặc biệt, độ điện di có mối quan hệ mật thiết với dòng EOF, các yếu tố trên ngoài ảnh hưởng đến độ điện di cũng ảnh hưởng đến cả dòng EOF [5]. Vì vậy, trong phương pháp điện di phải tìm các điều kiện thích hợp để có độ điện di và dòng EOF phù hợp nhất cho việc tách chất.

1.5.4. Dòng điện di thẩm thấu và sự di chuyển của ion chất phân tích trong mao quản

Cùng với lớp điện kép, trong mao quản sẽ xuất hiện một dòng chảy của khối chất lỏng được gọi là dòng điện di thẩm thấu (EOF). Dòng này có quan hệ mật thiết với lớp điện kép trên thành mao quản và được quyết định bởi thế tách V , pH của pha động điện di, chất điện ly (thành phần, nồng độ) và bị ảnh hưởng của lớp điện kép (hay thế Zeta, V_{zet}), độ nhớt của dung dịch pha động, hằng số điện môi ϵ của pha động, loại mao quản, độ xốp, cỡ hạt của chất nhồi mao quản. Tất cả các phân tử mang điện (ion dương và ion âm) và không mang điện đều bị di chuyển (điện di) trong dòng chảy EOF theo một hướng nhất định, thích hợp (hình 1.7).

Có nhiều phương pháp khác nhau để thay đổi dòng EOF như thay đổi thế tách, dung dịch điện ly (pH, lực ion hay nồng độ đệm), nhiệt độ, dùng các phụ gia, dung môi hữu cơ, các chất hoạt động bề mặt...[5]. Mỗi phương pháp đều có ưu nhược điểm nhất định, việc lựa chọn sử dụng phương pháp nào phụ thuộc vào nhiều yếu tố như đặc trưng của chất phân tích, nền mẫu, độ phân giải cần đạt được, ... Từ thực tế phân tích, việc thay đổi pH của dung dịch điện ly là phương pháp tiện lợi và thường được sử dụng để thay đổi dòng EOF. Tốc độ dòng EOF sẽ giảm ở pH thấp và tăng ở pH cao, do đó để làm giàu, các anion chất phân tích có tốc độ điện di nhỏ hơn tốc độ dòng EOF thường được phân tích bằng kỹ thuật phân cực ngược ở pH cao. Tuy nhiên, cần lưu ý là việc điều chỉnh pH của dung dịch điện ly có thể ảnh hưởng đến trạng thái tồn tại của chất phân tích và độ điện di của chúng. Quá trình phân tích chỉ hiệu quả khi chọn được pH thích hợp để đảm bảo về tốc độ dòng EOF và quá trình di chuyển của chất phân tích [5].



Hình 1.7. Dòng EOF và sự di chuyển của các cation và anion trong mao quản

1.5.5. Các detector thông dụng trong phương pháp điện di mao quản

Trong phương pháp điện di mao quản, sự phát hiện các chất trong quá trình tách có thể được thực hiện trực tiếp hay gián tiếp, tùy vào bản chất của các chất phân tích [5, 66]. Còn việc định lượng dựa trên mối quan hệ giữa tín hiệu đo của chất phân tích với nồng độ C_x của nó theo biểu thức:

$$H = k.C_x \quad (1.5a)$$

$$\text{Hoặc} \quad S = k.C_x \quad (1.5b)$$

Trong đó, H là chiều cao, còn S là diện tích pic điện di của chất phân tích. Việc phát hiện và đo định lượng này được thực hiện nhờ các loại detector tương tự như trong kỹ thuật HPLC, chỉ khác là detector ở đây được đặt gần đầu cuối của mao quản (cột tách) mà không cần một detector đo riêng như trong HPLC. Đó chính là một ưu điểm về sự đơn giản của kỹ thuật CE. Tùy thuộc vào mục đích phát hiện hay định lượng, cũng như tùy thuộc vào tính chất hóa học, hóa lý, vật lý của các chất phân tích mà sử dụng các detector tương ứng như: Detector quang học, detector khối phổ, detector điện hóa, detector độ dẫn, ... [66].

1.4.5.1. Detector quang học

Hầu hết các thiết bị CE thương phẩm hiện nay sử dụng detector quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) hoặc huỳnh quang. Mặc dù có những hạn chế nhất định về khả năng ứng dụng nhưng đây là những detector đã được khẳng định là hữu hiệu. Detector quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) là detector được dùng phổ biến nhất, đáp ứng với những chất phân tích có khả năng hấp thụ ánh sáng trong vùng UV-Vis. Đối với

những chất phân tích không hấp thụ ánh sáng UV-Vis như các ion vô cơ, các amino acid... cần có thêm thuốc thử để tạo các hợp chất màu trung gian (giữa chất phân tích với thuốc thử), tuy nhiên việc này có thể làm giảm độ nhạy và khoảng tuyến tính. Khi sử dụng detector UV-Vis, lớp polyme phủ bên ngoài mao quản phải mỏng để tạo cửa sổ quang học vì vậy mao quản không có độ dẻo cao, dễ gãy. Độ nhạy của detector này phụ thuộc vào đường đi quang học hay chính là đường kính bên trong của mao quản nên các mao quản có đường kính trong nhỏ hơn 50 μm không thích hợp cho việc sử dụng detector UV-Vis.

Detector huỳnh quang dùng để phát hiện và định lượng các chất có khả năng phát huỳnh quang và các dẫn xuất có tính phát huỳnh quang. Chất phân tích hấp thụ năng lượng ánh sáng tại một bước sóng nhất định, nhưng ngay sau đó sẽ bị suy biến (mất một phần năng lượng hấp thụ) và lập tức phát ra huỳnh quang tại một bước sóng dài hơn [31, 66]. Detector huỳnh quang cho đến nay là detector có độ nhạy cao nhất, với LOD thường thấp hơn từ 10 đến 1000 lần so với detector UV-Vis. Tuy nhiên detector này có giá thành cao, cần được kích thích bằng bức xạ laser và có thể xảy ra hiện tượng giảm tín hiệu đo của chất phân tích do cường độ ánh sáng kích thích lớn. Tương tự như detector UV-Vis, đối với chất phân tích không có tính huỳnh quang như các chất vô cơ (các ion kim loại và anion), cần tạo ra một phức chất có tính huỳnh quang bằng cách cho chất phân tích tác dụng với một thuốc thử huỳnh quang phù hợp theo một phản ứng có tính chất định lượng.

1.4.5.2. Detector khối phổ

Detector khối phổ là detector vạn năng cho phân tích định tính và định lượng các chất, có độ nhạy cao vì thế là detector ưu việt hơn so với các detector UV-Vis, huỳnh quang hay điện hóa. Trong phương pháp khối phổ, các phân tử bị ion hóa được tăng tốc trong một trường điện từ và sau đó được tách theo khối lượng của nó. Quá trình ion hóa thường cung cấp đủ năng lượng để phân tử bị phá vỡ thành các mảnh khác nhau. Ngoài định tính và định lượng, detector khối phổ còn cho biết cấu trúc của chất phân tích, do đó nó trở thành một công cụ quan trọng để phân tích đặc tính của các phân tử sinh học, đặc biệt là các peptit và các protein. Tuy nhiên detector

khối phổ có giá thành cao và cấu tạo phức tạp, cần phải có sự kết nối tinh vi với các mao mạch điện và điện cực sử dụng trong CE phải đồng bộ với cấu tạo của khối phổ. Điện di mao quản ghép nối detector khối phổ đã được sử dụng, thăm dò trong pháp y, phân tích môi trường, phân tích sinh học, phân tích dược phẩm, nghiên cứu sự chuyển hóa của các chất... [16, 50].

1.4.5.3. Detector điện hóa

Detector đo điện thế là một detector đơn giản và tiện lợi nhất trong các detector điện hóa. Trong detector đo điện thế, nồng độ chất phân tích được xác định dựa vào sự thay đổi thế điện cực của một điện cực làm việc khi nhúng vào dung dịch phân tích cùng với một điện cực so sánh. Điện cực làm việc có thể là điện cực thủy tinh, điện cực lỏng, điện cực rắn hay các điện cực chọn lọc ion (ISE). Trong đó, điện cực chọn lọc ion màng lỏng thu nhỏ được ứng dụng phổ biến trong các nghiên cứu về sinh học đã bước đầu được sử dụng như một detector trong CE [15, 74]. Detector này chỉ đáp ứng chọn lọc với một ion nhất định nên là detector có độ chọn lọc cao nhất trong các detector điện hóa. Phương trình giả Nernst được sử dụng để mô tả sự phụ thuộc của nồng độ chất phân tích vào sự thay đổi thế giữa hai điện cực.

Trong detector đo dòng, một hệ ba điện cực gồm: điện cực làm việc, điện cực so sánh và điện cực phụ trợ được sử dụng để thiết lập nên một mạch điện đặc biệt. Dòng điện sinh ra do quá trình oxi hóa hoặc quá trình khử chất phân tích hay chính là do sự chuyển electron giữa điện cực làm việc và điện cực phụ trợ, dòng điện này sẽ tỷ lệ với nồng độ chất phân tích. Tuy nhiên phương pháp này chỉ đáp ứng với các chất phân tích có tính oxi hóa hoặc khử như các catecholamine, amin thơm và phenol [29, 33].

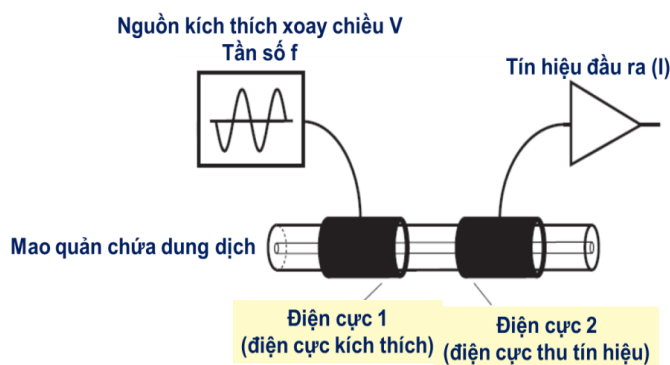
Trong các detector điện hóa thì detector độ dẫn có nhiều ưu điểm nổi bật do đáp ứng được với tất cả các chất phân tích mang điện. Chất phân tích được phát hiện bởi detector trong một nền dung dịch điện ly. Khác với detector đo điện thế và đo dòng cần có phản ứng điện hóa trên bề mặt điện cực, detector độ dẫn trực tiếp đo độ dẫn của dung dịch phân tích được đặt giữa hai điện cực. Detector độ dẫn có thể hoạt động theo kiểu tiếp xúc hoặc không tiếp xúc, vị trí đặt detector có thể tiếp xúc hoặc không

tiếp xúc điện với điện cực và dung dịch điện ly tương ứng. Về cơ bản, không có sự khác biệt khi đo độ dẫn theo hai kiểu trên, độ dẫn đều do lớp điện kép của các phần tử mang điện thiết lập qua một lớp cách điện [87]. Độ nhạy của detector phụ thuộc nhiều vào nền dẫn điện vì vậy nên chọn dung dịch điện ly phân tích phù hợp, có độ dẫn nhỏ nhất. Detector độ dẫn được sử dụng nhiều với những chất phân tích không có khả năng hấp thụ UV-Vis nhưng có khả năng dẫn điện cao như các ion vô cơ, các acid amin...[45, 74, 84].

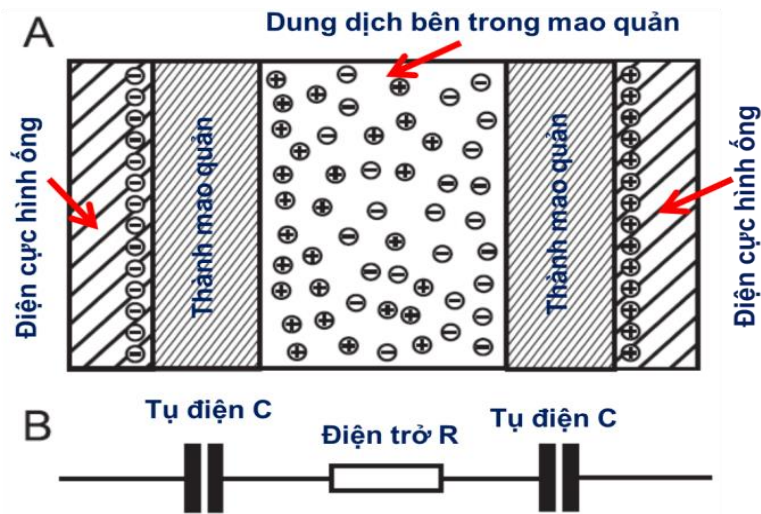
Một nhược điểm chung của các detector điện hóa khi dùng để định lượng trực tiếp là độ chọn lọc kém. Giải pháp để hạn chế nhược điểm này là kết hợp giữa phương pháp định lượng bằng detector điện hóa với một kỹ thuật tách, trong đó tách bằng điện di được coi là một kỹ thuật tách đơn giản và phù hợp nhất (phù hợp hơn các phương pháp sắc ký) do cùng là phương pháp điện hóa.

1.5.6. Detector độ dẫn không tiếp xúc (C^4D)

Detector độ dẫn không tiếp xúc (C^4D) với thiết kế hai điện cực đồng trục được giới thiệu lần đầu trên thế giới vào năm 1998 bởi Zemann cùng các cộng sự [84] và Da Silva, Do Lago [26], thiết kế này vẫn được dùng cho tới tận ngày nay. Dựa trên thiết kế này, năm 2002, nhóm nghiên cứu của GS Peter Hauser (khoa Hóa học, trường đại học Basel, Thụy Sĩ) đã phát triển thành công dòng sản phẩm C^4D với nguồn điện thể kích thích xoay chiều cao (HV- C^4D , 200V). Hãng điện tử eDAQ của Úc sau đó đã phối hợp cùng nhóm nghiên cứu của GS. Peter Hauser để phát triển nghiên cứu này thành dòng C^4D thương phẩm. Nguyên tắc hoạt động của C^4D được mô tả như hình 1.8 và hình 1.9 dưới đây:



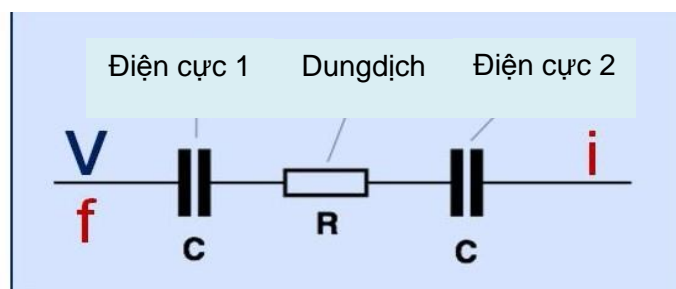
Hình 1.8. Sơ đồ nguyên lý hoạt động của detector độ dẫn không tiếp xúc



Hình 1.9. A) Sơ đồ biểu diễn cấu trúc của detector độ dẫn không tiếp xúc B) Mạch điện tương đương

Hai điện cực hình ống được đặt nối tiếp đồng trục bên ngoài mao quản có chứa dung dịch cần đo (hình 1.11). Hai điện cực hình ống tạo với dung dịch bên trong mao quản hai tụ điện C. Khoảng dung dịch nằm giữa hai điện cực đóng vai trò như một điện trở R. Mạch điện tương đương được mô tả như trong hình 1.10.

Nguồn điện xoay chiều (V) với tần số (f) được áp vào điện cực thứ nhất. Tín hiệu được đo dưới dạng cường độ dòng điện xoay chiều (I) tại điện cực thứ hai.



$$i = \frac{V}{\sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{2\pi fC}\right)^2}}$$

Hình 1.10. Biểu diễn mối liên hệ giữa tín hiệu đầu ra và độ lớn (điện thế và tần số) của nguồn kích thích xoay chiều

Theo đó, dòng điện I thu được tại điện cực thứ hai sẽ phụ thuộc vào độ lớn của điện thế V và tần số f như hình 1.12. Nguồn kích thích V có giá trị càng cao thì tín hiệu I đo được cũng càng lớn. Nếu tần số hoạt động f của nguồn kích thích cao (tối thiểu vài trăm kHz), giá trị dung kháng $Z = (1/2\pi fC)^2$ sẽ bị triệt tiêu, khi đó:

$$I = \frac{V}{R} \quad (1.6)$$

Với R là điện trở của dung dịch cần đo. Việc xác định giá trị điện trở này sẽ cho ta thông tin về độ dẫn (σ) của các ion có trong dung dịch đó theo công thức:

$$\sigma = \frac{l}{S \cdot R} \quad (1.7)$$

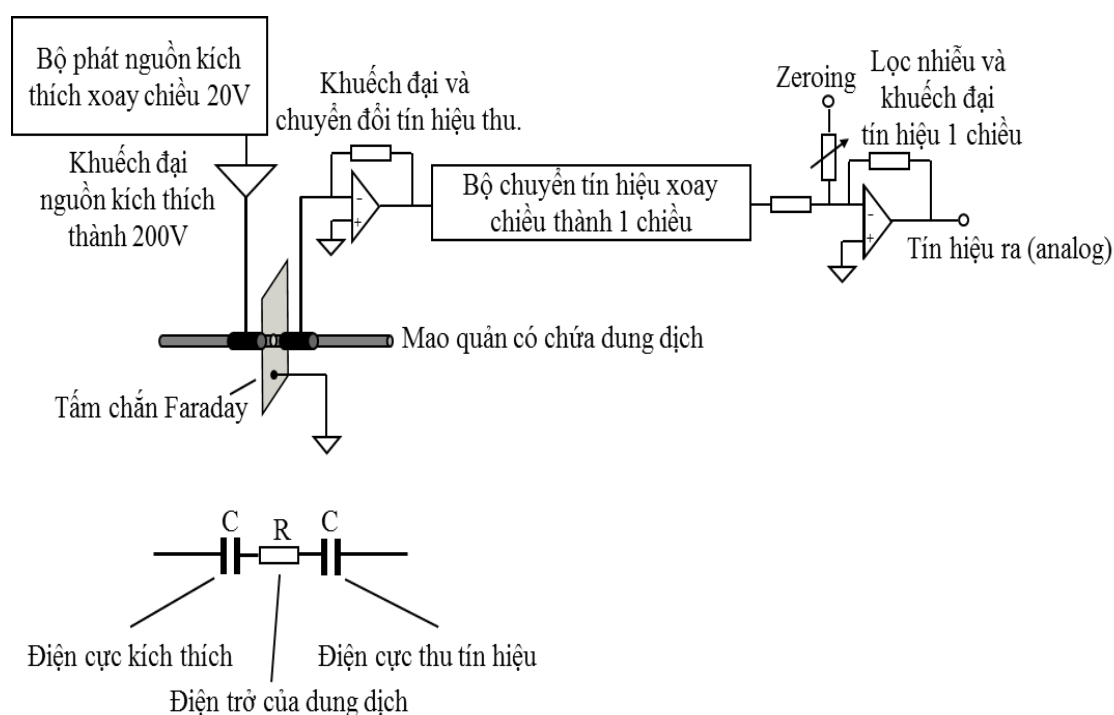
Trong đó: l là chiều dài khối vật dẫn, S là tiết diện ngang vật dẫn. Theo công thức 1.7 độ dẫn (σ) tỷ lệ nghịch với điện trở (R) mà R lại tỷ lệ nghịch với cường độ dòng điện (I) theo công thức 1.6 nên I sẽ tỷ lệ thuận với σ . Nói cách khác nếu I lớn thì σ lớn và ngược lại.

Tín hiệu đầu ra thu được ở dạng cường độ dòng điện (I), sau đó sẽ được chuyển đổi và khuếch đại thành tín hiệu dạng điện thế (xoay chiều), thông qua việc sử dụng một điện trở khuếch đại ($R_{\text{khuếch đại}}$) [87].

$$V_{\text{đo}} = I \cdot R_{\text{khuếch đại}} \quad (1.8)$$

Điện thế xoay chiều sau đó được chuyển đổi thành điện thế 1 chiều, lọc nhiễu và khuếch đại, sau cùng chuyển đổi thành tín hiệu số hóa trước khi được hiển thị và lưu trữ trên máy tính (hình 1.11).

Để tăng độ nhạy của C^4D , cần sử dụng giải pháp nâng cao nguồn điện thế kích thích xoay chiều, thay vì dùng các điện trở khuếch đại quá lớn do khi sử dụng các điện trở khuếch đại, đồng thời cả tín hiệu cần đo và nhiễu nền sẽ cùng được khuếch đại. Trong nhiều trường hợp, nhiễu nền sau khi khuếch đại sẽ gây cản trở đáng kể đến việc định tính và định lượng. Thông thường, điện trở khuếch đại ($R_{\text{khuếch đại}}$) nằm trong khoảng $330 \text{ k}\Omega - 1,5 \text{ M}\Omega$.



Hình 1.11. Quá trình chuyển đổi tín hiệu của C^4D

❖ **Một số tính năng nổi trội của C^4D**

- Điện cực không cần tiếp xúc với dung dịch đo, tránh bị ăn mòn và hỏng điện cực.
- Thể tích mẫu đo rất nhỏ (vài nL).
- Là detector vạn năng (đáp ứng với tất cả các hợp phần mang điện tích trong môi trường nước).
- Có thể đặt ở bất kỳ vị trí nào bằng cách di chuyển tùy ý dọc theo cột phân tích (khác với detector UV, vốn chỉ có thể cố định tại một điểm nơi có cửa sổ quang trên cột tách).
- Có thể dùng cho tất cả các cột tách với vật liệu chế tạo khác nhau (khác với detector UV, vốn chỉ phù hợp với những cột trong suốt).
- Với điện di mao quản, C^4D không yêu cầu tạo cửa sổ quang trên cột tách silica nóng chảy, giảm nguy cơ gãy cột như thường xảy ra với detector đo quang.
- Độ nhạy không phụ thuộc vào đường kính cột tách, sử dụng được với mao quản nhỏ hơn 25 μm (để tăng hiệu quả tách chất).
- Có khả năng thu nhỏ, vận hành được bằng ắc quy.
- Có thể tự chế tạo được với cơ sở hạ tầng của các xưởng điện tại Việt Nam.

Như vậy qua tổng quan cho thấy, phương pháp điện di mao quản (CE) sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (C^4D) được phát triển mạnh mẽ trong những năm gần đây. Phương pháp đã được ứng dụng rộng rãi để phân tích các chất hữu cơ và vô cơ trong các đối tượng mẫu khác nhau, đặc biệt hiệu quả trong tách và phân tích các loại mẫu sinh học, thực phẩm và dược phẩm. Đây là một trong số ít các phương pháp phân tích vừa có thể triển khai hiệu quả trong phòng thí nghiệm, vừa có thể phát triển thành công cụ phân tích có thể triển khai tại hiện trường, thậm chí tự động hoá quá trình phân tích khi cần thiết. Đặc biệt, phương pháp CE- C^4D có tiềm năng xác xác định đồng thời các chất có tính chất khác nhau như glucosamin và Ca, vitamin B₆ và Mg,... Do đó, phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc CE- C^4D là sự lựa chọn phù hợp cho nghiên cứu phát triển và ứng dụng phân tích một số khoáng chất, glucosamin và vitamin, từ đó sẽ góp phần đảm bảo chất lượng của dược phẩm và TPCN được đưa ra thị trường và nâng cao sức khỏe cộng đồng.

CHƯƠNG 2: THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị và hóa chất

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

2.1.1.1. Thiết bị CE-C⁴D

Thiết bị CE sử dụng trong nghiên cứu là loại bán tự động, được cung cấp bởi công ty 3sanalysis (<http://www.3sanalysis.vn/>). Thiết bị CE có nguồn thế cao lên đến 25 kV, sử dụng cảm biến đo độ dẫn không tiếp xúc (C⁴D). Đây là thiết bị điện di mao quản dạng xách tay đầu tiên trên thế giới sử dụng nguồn thế cao mini của hãng Spellman. Detector đo độ dẫn không tiếp xúc kết nối theo kiểu tụ điện (C⁴D) được thiết kế ở dạng thu nhỏ, với nguồn kích thích 200V, với hai điện cực hình ống đồng trục có chiều dài 4 mm và đường kính 400 μ m đặt cách nhau 1mm. Tấm chắn Faraday (nối đất) được sử dụng để ngăn cách hai điện cực.

Một hệ thiết bị CE bao gồm các bộ phận:

– Mao quản tách: thường làm bằng vật liệu silic gọi là mao quản silica, là loại mao quản phổ biến nhất, với đường kính ngoài (OD) 365 μ m, đường kính trong (ID) từ 10 - 150 μ m (thường là 50 μ m). Tổng chiều dài mao quản có thể từ 10-100 cm (thường là 60 cm). Chiều dài hiệu dụng (là chiều dài tính từ đầu bơm mẫu của mao quản đến vị trí đặt detector) thường dao động từ 25-50 cm đối với mao quản dài 60 cm. Trong quá trình điện di, mao quản được nạp đầy dung dịch điện ly.

– Dung dịch điện ly: dùng để tạo môi trường cho quá trình điện di xảy ra khi áp thế cao vào hai đầu mao quản. Trong quá trình điện di, hai đầu mao quản được đặt trong hai bình chứa dung dịch điện ly.

– Nguồn điện thế cao: thường dao động từ 5-30 kV nhằm sinh ra điện trường lớn cho quá trình điện di xảy ra.

– Detector độ dẫn không tiếp xúc kết nối kiểu tụ điện (C⁴D): bộ phận phát hiện và ghi nhận tín hiệu của chất phân tích sau quá trình phân tách CE, do đó thường được đặt ở phần cuối (gần cuối hoặc cuối) của mao quản tùy theo loại cảm biến.

– Bộ phận điều khiển: thường là máy tính sử dụng phần mềm chuyên dụng phù hợp, để ghi nhận, hiển thị và xử lý kết quả phân tích. Hiện nay, bộ phận này còn có thể thực hiện chức năng điều khiển tự động hoá quá trình phân tích từ khâu bơm mẫu đến khâu cho ra kết quả cuối cùng của quá trình phân tích CE.

2.1.1.2. Các thiết bị khác

Ngoài hệ thiết bị CE-C⁴D, nghiên cứu còn sử dụng một số hệ thiết bị để phân tích đối chứng bao gồm: hệ thiết bị ICP-OES phân tích Ca và Mg, hệ thiết bị HPLC-FLD phân tích glucosamin, hệ thiết bị HPLC- PDA phân tích vitamin B₆ và hệ thiết bị UPLC-MS/MS phân tích vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉. Trên cơ sở tham khảo các tài liệu [6,7,55] các thông số của thiết bị được thể hiện trong bảng 2.1.

Bảng 2.1. Thông số các hệ thiết bị phân tích đối chứng

Hệ thiết bị ICP-OES phân tích Ca và Mg	
Thiết bị	Optima 7300 DV, PerkinElmer
Thông số thiết bị	Công suất: 1,1 kW Lưu lượng khí plasma: 15,0 L/phút Lưu lượng khí phụ trợ: 0,2 L/phút Lưu lượng khí buồng phun: 0,8 L/phút Chế độ plasma: xuyên tâm Tốc độ dòng mẫu: 1,5 mL/phút Thời gian trễ: 30 giây Số lần lặp : 3
Hệ thiết bị HPLC-FLD phân tích glucosamin	
Thiết bị	Hệ Waters ACQUITY
Cột	C ₁₈ Symmertry (150 mm × 4,6 mm × 5 μm)
Thông số thiết bị	Pha động: A là H ₂ O và B là ACN Tốc độ dòng 1 mL/phút Thể tích bơm mẫu 20 μL Detector FLD ở bước sóng kích thích (λ_{ex}) 265 nm và bước sóng phát xạ (λ_{em}) 315 nm.

Hệ thiết bị HPLC-PDA phân tích vitamin B₆	
Thiết bị	LC-20A, SPD-M20A, Shimadzu
Cột	Sunfire C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 μm)
Thông số thiết bị	Nhiệt độ lò cột: 40 °C Tốc độ pha động: 1,0 mL/phút Pha động: A (phosphate 10 mM, natri heptanesulfonate 5 mM, pH= 3) và B (acetonitril) Gradient pha động (phút – %A – %B): 0,01 – 100 – 0; 1 – 95 – 5; 4,5 – 85 – 15; 7 – 80 – 20; 14 – 70 – 30; 18-23 – 100 – 0. Bước sóng: 290 nm
Hệ thiết bị UPLC- MS/MS phân tích vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉	
Thiết bị	ACQUITY UPLC H-Class; Waters
Cột	BEH C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm, 130 Å), H ₂ O
Thông số thiết bị	Pha động A : Ammonium formate/ H ₂ O Pha động B : Methanol Tốc độ dòng : 0,15 mL/phút Dung lượng mẫu : 10 μL Nhiệt độ cột: 30°C Ion hóa: Chùm ion Điện áp: 2500 V Nhiệt độ dòng khí khử: 500°C Lưu lượng dòng khí khử: 800 L/h Lưu lượng khí buồng nón: 150 L/h Lưu lượng khí va chạm: 0,15 mL/phút Buồng phun: 7 bar

Ngoài ra nghiên cứu còn sử dụng một số thiết bị gồm:

- Máy rung siêu âm, có gia nhiệt của hãng BRANSON 521 (Mỹ).
- Máy đo pH của hãng HANNA (Mỹ).

- Cân phân tích của hãng Scientech (Mỹ), độ chính xác 0,1 mg.
- Tủ lạnh Sanaky VH – 2899W dùng bảo quản mẫu (Việt Nam).
- Máy Vortex của hãng Labnet (Mỹ).

2.1.1.3. Dụng cụ

Các dụng cụ được sử dụng trong quá trình thực hiện thí nghiệm:

- Dụng cụ thủy tinh: bình định mức, pipet, cốc, ống nghiệm.
- Pipet paster các loại: 200 μ L; 100 μ L; 20 μ L.
- Ống nhỏ: 2 μ L để đựng mẫu phân tích .
- Các lọ Falcon 15 mL; 50 mL để đựng dung dịch chuẩn.
- Bộ xylanh lọc mẫu có đường kính màng lọc là 0,45 μ m.
- Mao quản sử dụng là mao quản silica, đường kính trong (ID) là 50 μ m.
- Một số dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

2.1.2. Hóa chất

Các hóa chất dùng trong nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết phân tích (PA).

2.1.2.1. Chất chuẩn

- Glucosamin hydroclorid (Sigma- Aldrich; độ tinh khiết 99,8%; số lô BCCB2605).
- Vitamin B₁ (thiamin hydrochloride) (Chất chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương; độ tinh khiết 99,8%; số lô LRAC8351).
- Vitamin B₅ (axit pantothenic) (Sigma- Aldrich; độ tinh khiết 98%; số lô LRAC6779).
- Vitamin B₆ (pyridoxin hydrochloride) (Chất chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương; độ tinh khiết 99%; số lô G1162253)
- Vitamin B₉ (axit folic) (Sigma- Aldrich; độ tinh khiết 97%; số lô LRAB7532).
- Magie nitrat (Mg(NO₃)₂.6H₂O) (Merck; độ tinh khiết 98%; số lô 2064886).
- Dung dịch chuẩn Ca²⁺ 1000 mg/L (Merck; độ tinh khiết 98%; số lô 03.S.15.02).

2.1.2.2. Hóa chất dung môi

- Arginine (Arg) (Fluka, $\geq 99,5\%$),
- Histidin (His) (Fluka, $\geq 99,0\%$),
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Fluka, $\geq 99,0\%$),
- 2-Morpholinoethanesulfonic (MES) (Fluka, $\geq 99,0\%$),
- 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) (Sigma- Aldrich, $> 99\%$)
- Acid acetic (Ace) (PA, Merck),
- Acetonitrile (ACN) (PA, Merck),
- Natri hydroxide (NaOH) (Merck, Đức),
- Acid hydrochloric (HCl) (Merck, Đức),
- Acid Boric (Merck, Đức),
- Acid phosphatase (Sigma- Aldrich, USA),
- Các dung môi khác: n-hexan, Metaphosphoric 3%, acid trichloroacetic (TCA),
- Chất chuẩn nội đánh dấu đồng vị: $^{13}\text{C}_4$ -THI, $^{13}\text{C}_4^{15}\text{N}_2$ -RIB, $^2\text{H}_4$ -NIC, $^2\text{H}_4$ -NIA, $^{13}\text{C}_4$ -PYN, $^2\text{H}_3$ -PYL và $^2\text{H}_3$ -PYM) (PA, Ambler),
- Nước deion: là nước cất hai lần được lọc qua bộ lọc siêu tinh khiết có cột trao đổi cation, anion và màng lọc $0,22\ \mu\text{m}$.

2.1.2.3. Chuẩn bị các dung dịch hóa chất

- *Pha dung dịch chuẩn*

- Dung dịch chuẩn glucosamin được pha từ chất chuẩn tương ứng (mục 2.1.2.1) trong nước deion: Cân chính xác 31,16 mg chất chuẩn (glucosamin hydroclorid độ tinh khiết 99,8%) chuyển vào bình định mức 25,00 mL. Thêm 10 mL nước deion và tiến hành rung siêu âm trong 30 phút để hòa tan hoàn toàn chất sau đó định mức tới vạch bằng nước deion thu được dung dịch glucosamin gốc có nồng độ 1000 mg/L. Dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh, tránh ánh sáng.

- Dung dịch chuẩn vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₆, vitamin B₉ được pha từ các chất chuẩn tương ứng (mục 2.1.2.1) trong nước deion: Cân chính xác lần lượt 12,53 mg vitamin B₁ (độ tinh khiết 99,8%); 12,76 mg vitamin B₅ (độ tinh khiết 98%);

12,63 mg vitamin B₆ (độ tinh khiết 99%); 12,89 mg vitamin B₉ (độ tinh khiết 97%) chuyển vào các bình định mức 25,00 mL. Thêm 10 mL nước deion và tiến hành rung siêu âm trong 30 phút để hòa tan hoàn toàn chất sau đó định mức tới vạch bằng nước deion thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi vitamin là 500,0 mg/L. Dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh, tránh ánh sáng.

- Dung dịch chuẩn Mg²⁺ được pha từ chất chuẩn Mg(NO₃)₂.6H₂O trong nước deion: Cân chính xác 131,87 mg Mg(NO₃)₂.6H₂O (độ tinh khiết 98%) chuyển vào bình định mức 25,0 mL. Thêm 10 mL nước deion và tiến hành rung siêu âm trong 30 phút để hòa tan hoàn toàn chất sau đó định mức tới vạch bằng nước deion thu được dung dịch gốc có nồng độ Mg²⁺ là 500,0 mg/L. Dung dịch được bảo quản trong tủ lạnh, tránh ánh sáng.

- *Pha dung dịch điện ly*

- Các dung dịch điện ly được cân và pha trực tiếp vào bình định mức bằng nước deion. Tất cả các dung dịch đều được rung siêu âm và chuẩn lại giá trị pH trước khi sử dụng. Dung dịch điện ly được pha mới hằng ngày.

- Các dung dịch trước khi sử dụng phải đưa về nhiệt độ phòng sau đó lắc đều. Các dung dịch chuẩn hỗn hợp được chuẩn bị từ các dung dịch chuẩn đơn của các chất tương ứng. Tất cả các dung dịch này đều rung siêu âm và điều chỉnh pH bằng máy đo pH trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp CE-C⁴D

Phương pháp CE-C⁴D được sử dụng trong luận án để khảo sát các điều kiện thích hợp, xây dựng qui trình phân tích, đánh giá phương pháp phân tích và ứng dụng phân tích đồng thời ba nhóm chất gồm:

- Nhóm glucosamin và canxi.
- Nhóm vitamin B₆ và magie.
- Nhóm vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉.

2.2.2. Phương pháp khảo sát xác định các điều kiện thích hợp

Việc khảo sát điều kiện tách đồng thời các chất phân tích được thực hiện trên thiết bị điện di CE-C⁴D với cột mao quản có chiều dài 50- 60 cm, đường kính trong 50 μ m. Trước khi sử dụng, mao quản được rửa với NaOH 1M trong 10 phút, nước deion trong 10 phút và sau đó là dung dịch điện ly tương ứng trong 10 phút. Mẫu được bơm vào mao quản theo phương pháp thủy động lực học kiểu xi phong bằng cách nâng một đầu mao quản nhúng trong dung dịch mẫu lên độ cao nhất định (10 - 20cm) để tạo áp lực cho mẫu đi vào mao quản trong một thời gian nhất định. Các điều kiện này được giữ nguyên trong tất cả các thí nghiệm. Các điều kiện cần khảo sát gồm: Dung dịch điện ly, thế điện di, chiều dài hiệu dụng, chiều cao và thời gian bơm mẫu. Việc khảo sát được thực hiện theo phương pháp đơn biến, thay đổi một thành phần trong khi cố định các thành phần còn lại để thu được thông số phù hợp, đáp ứng các yêu cầu phân tích gồm: Các chất trong nhóm được tách hoàn toàn (đánh giá thông qua độ phân giải R), tín hiệu thu được là tốt nhất, ổn định nhất (đánh giá thông qua độ lặp lại của tín hiệu chuẩn), thời gian tách hợp lý...

2.2.2.1. Khảo sát dung dịch điện ly

- Với hỗn hợp canxi và glucosamin: Dung dịch điện ly khảo sát với hỗn hợp chất chuẩn tương ứng với nồng độ của canxi 20 mg/L và glucosamin 80 mg/L. Khảo sát được thực hiện với cột mao quản có chiều dài 50 cm, chiều dài hiệu dụng 35 cm, đường kính trong 50 μ m; thế tách +15 kV, bơm mẫu ở độ cao 10 cm trong 20 s. Hệ đệm khảo sát là Arg/Ace, Tris/Ace, His/Ace, Ace.

- Với hỗn hợp magie và vitamin B₆ : Dung dịch điện ly khảo sát với hỗn hợp mẫu chuẩn có nồng độ của vitamin B₆ là 100 mg/L và Mg²⁺ là 5 mg/L. Khảo sát được thực hiện với cột mao quản có chiều dài 55 cm, đường kính trong 50 μ m; thế tách +20 kV, chiều cao bơm mẫu 20 cm trong 25 s. Hệ đệm khảo sát là CAPS/Ace, His/Ace, Arg/Ace, Tris/Ace thêm ACN ở các giá trị pH= 4,0- 7,0.

- Với hỗn hợp vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉: Dung dịch điện ly khảo sát với hỗn hợp mẫu chuẩn tương ứng với nồng độ của vitamin B₁ 100 mg/L, vitamin B₅

60 mg/L và vitamin B₉ 60 mg/L. Khảo sát được thực hiện với cột mao quản có chiều dài 50 cm, chiều dài hiệu dụng 30 cm, đường kính trong 50 µm; thế tách +17 kV, chiều cao bơm mẫu 15 cm trong 30 s. Hệ đệm khảo sát là His/Ace, Arg/Ace, Tris/Ace thêm ACN ở các giá trị pH= 4,0- 7,0.

2.2.2.2. Khảo sát thế tách

Thế tách được khảo sát bằng cách giữ nguyên dung dịch điện ly khảo sát được ở trên, các điều kiện khác gồm: nồng độ dung dịch chuẩn, chiều cao, thời gian bơm mẫu tương tự như khảo sát dung dịch điện ly. Cụ thể, bảng 2.2 thể hiện các giá trị thế tách được khảo sát cho từng nhóm chất.

Bảng 2.2. Giá trị thế tách được khảo sát

Nhóm chất phân tích	Thế tách (kV)			
	Glucosamin và canxi	+12	+15	+20
Vitamin B ₆ và magie	+15	+18	+20	+25
Vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉	+15	+17	+20	

2.2.2.3. Khảo sát thời gian bơm mẫu

Khảo sát thời gian bơm mẫu bằng cách giữ nguyên điều kiện như khảo sát thế tách với giá trị thế tách đã khảo sát được. Bảng 2.3 thể hiện các giá trị thời gian bơm mẫu được khảo sát đối với từng nhóm chất.

Bảng 2.3. Thời gian bơm mẫu được khảo sát

Nhóm chất phân tích	Thời gian bơm mẫu (s)			
	Glucosamin và canxi	10	20	30
Vitamin B ₆ và magie	20	25	30	
Vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉	20	30	50	

2.2.2.4. Khảo sát chiều cao bom mẫu

Khảo sát chiều cao bom mẫu bằng cách giữ nguyên điều kiện như khảo sát thể tách, thời gian bom mẫu với giá trị thể tách và thời gian bom mẫu đã khảo sát được. Bảng 2.4 thể hiện các giá trị chiều cao bom mẫu được khảo sát đối với từng nhóm chất.

Bảng 2.4. Chiều cao bom mẫu được khảo sát

Nhóm chất phân tích	Chiều cao bom mẫu (cm)		
Glucosamin và canxi	5	10	15
Vitamin B ₆ và magie	15	20	25
Vitamin B ₁ , vitamin B ₅ và vitamin B ₉	10	15	20

2.3. Thông tin và quy trình xử lý mẫu phân tích

2.3.1. Thông tin mẫu phân tích

Các mẫu dược phẩm và TPCN được mua ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội bao gồm dạng bột, viên nén, viên nang mềm, viên nang cứng. Thông tin của mẫu dược phẩm và TPCN được nêu trong Phụ lục 1.

2.3.2. Quy trình xử lý mẫu phân tích

Qua tham khảo Dược điển Việt Nam V [1] và các nghiên cứu [25, 47], quy trình xử lý mẫu được tiến hành như sau:

a. Quy trình xử lý mẫu TPCN để phân tích glucosamin và canxi.

Mẫu TPCN (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 0,0001g). Thêm 25 mL dung dịch acid trichloroacetic (TCA) 4% vào 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.

b. Quy trình xử lý mẫu dược phẩm và TPCN để phân tích vitamin B₆ và magie:

- Mẫu dược phẩm (dạng viên nén) được nghiền mịn và trộn đều. Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001g). Thêm 10 mL nước deion để hòa tan, tiến hành rung siêu âm trong 30 phút và ly tâm trong 15 phút. Chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 25 mL (tráng cốc ít nhất 3 lần bằng nước deion) và định mức tới vạch. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 µm và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C4D.

- Mẫu TPCN (dạng viên nang cứng, mềm) được tháo vỏ nang, lấy phần bên trong, nghiền mịn (nếu cần). Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001g). Thêm 25 mL dung dịch acid trichloroacetic (TCA) 4% vào 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.

c. Quy trình xử lý mẫu TPCN để phân tích vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉:

Mẫu TPCN (dạng viên nang) được tháo vỏ nang, lấy phần bên trong, nghiền mịn (nếu cần). Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001g). Thêm 10 mL Metaphosphoric 3% và 15 mL n-hexan, tiến hành rung siêu âm trong 30 phút cho tan hết và ly tâm trong 15 phút. Loại bỏ hết n-hexan và chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 25 mL, định mức tới vạch bằng Metaphosphoric 3%. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 µm và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

2.4. Các thông số đánh giá độ tin cậy của phương pháp phân tích

Độ tin cậy của phương pháp CE-C⁴D được đánh giá qua các thông số: giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ thu hồi [8] nêu dưới đây.

2.4.1. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

- *Giới hạn phát hiện (LOD)*

LOD là nồng độ nhỏ nhất mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa so với tín hiệu mẫu trắng hay tín hiệu nền. Giá trị LOD là nồng độ nhỏ

nhất mà cho tín hiệu/nhiều (S/N) bằng 3.

- *Giới hạn định lượng (LOQ)*

LOQ là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích định lượng với tín hiệu phân tích khác có ý nghĩa định lượng với tín hiệu mẫu trắng hay tín hiệu của nền. Thông thường, giá trị LOQ được xác định theo tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N) bằng 10.

2.4.2. Độ đặc hiệu của phương pháp

Độ đặc hiệu khi phân tích chất A đặc trưng cho mức độ ảnh hưởng của các thành phần đi cùng trong nền mẫu đến phép phân tích chất A. Do đó phải đánh giá ảnh hưởng của các chất đi cùng này tới cả mẫu trắng và mẫu thêm chuẩn. Phương pháp được kết luận có độ chọn lọc tốt nếu ảnh hưởng của chất đi kèm trong nền mẫu là không đáng kể.

2.4.3. Độ chụm (độ lặp lại) và độ đúng (độ thu hồi) của phương pháp

- *Độ chụm (độ lặp lại)*

Độ chụm là độ sai lệch giữa các giá trị riêng lẻ và giá trị trung bình trên các mẫu thử giống nhau trong các thí nghiệm giống nhau (do cùng trong một điều kiện: người phân tích, trang thiết bị, phòng thí nghiệm trong khoảng thời gian ngắn). Độ lặp lại có thể xác định qua độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Công thức tính SD và RSD như sau:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(S_i - S_{tb})^2}{n-1}} \quad (1)$$

$$RSD(\%) = \frac{SD}{S_{tb}} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

- S_i là diện tích của pic điện di thứ i .
- S_{tb} là diện tích trung bình của n lần phân tích.
- n là số lần phân tích lặp.

RSD (%) còn được gọi là hệ số biến thiên (CV%). Người ta thường sử dụng độ lệch chuẩn tương đối (RSD) hơn là độ lệch chuẩn (SD) do có thể đánh giá được độ

lệch chuẩn chiếm bao nhiêu phần trăm giá trị trung bình và có cái nhìn rõ hơn về độ lặp lại của các số liệu trong tập số liệu lặp lại.

- *Độ đúng (độ thu hồi)*

Độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình của dãy lớn các kết quả thí nghiệm và các giá trị quy chiếu được chấp nhận. Do đó, thước đo độ đúng thường đánh giá qua sai số tương đối hay bằng cách xác định độ thu hồi qua thêm chuẩn. Nếu chất chuẩn thêm vào mẫu từ trước khi xử lý mẫu ta có độ đúng của phương pháp, còn nếu chất chuẩn được thêm vào trước khi bơm vào thiết bị CE ta có độ đúng của thiết bị.

Độ thu hồi (H):

$$H = \frac{C_{tt}}{C_{lt}} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:

- H: Hiệu suất thu hồi (%).
- C_{tt} : Nồng độ thực tế của mỗi chất phân tích thu được (tính theo đường chuẩn).
- C_{lt} : Nồng độ lý thuyết của mỗi chất phân tích tính toán từ lượng chuẩn thêm vào.

Việc đánh giá độ lặp lại và hiệu suất thu hồi của nhóm glucosamin và canxi được thực hiện bằng cách thêm hỗn hợp chất chuẩn ở 3 mức nồng độ 0,5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L đối với canxi và 3 mức nồng độ 5 mg/L; 20 mg/L; 50 mg/L đối với glucosamin vào nền của mẫu TPCN không chứa glucosamin và canxi (mẫu TPCN Col-Liver). Mỗi mẫu thử đo lặp lại 6 lần và lấy giá trị trung bình.

Tiến hành tương tự với nhóm vitamin B₆ và magie: thêm chuẩn hỗn hợp chất chuẩn magie ở 3 mức nồng độ 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L và vitamin B₆ ở 3 mức nồng độ 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L vào nền của mẫu dược phẩm (mẫu vitamin B₁) và TPCN (mẫu TPCN Mama Gold) không chứa vitamin B₆ và magie. Mỗi mẫu thử đo lặp lại 6 lần và lấy giá trị trung bình.

Đối với nhóm vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong mẫu dược phẩm và thực phẩm chức năng, việc đánh giá độ lặp lại và hiệu suất thu hồi của phương pháp thực hiện bằng cách thêm hỗn hợp chất chuẩn vitamin B₁, vitamin B₅ ở 3 mức nồng độ 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L và vitamin B₉ ở 3 mức nồng độ 20 mg/L, 50 mg/L, 100

mg/L vào nền của mẫu TPCN (mẫu TPCN Mama Gold) không chứa vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉. Mỗi mẫu thử đo lặp lại 6 lần và lấy giá trị trung bình.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

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

Hàm lượng chất phân tích trong mẫu được tính toán theo công thức sau

$$A = B * 0.025 * \frac{M_A}{M_B} * \frac{KLV}{KLC} \quad (4)$$

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

KLV là khối lượng của 1 viên mẫu (mg)

KLC là khối lượng cân của mẫu (mg)

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C⁴D

3.1.1. *Khảo sát tối ưu điều kiện phân tách và xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C⁴D*

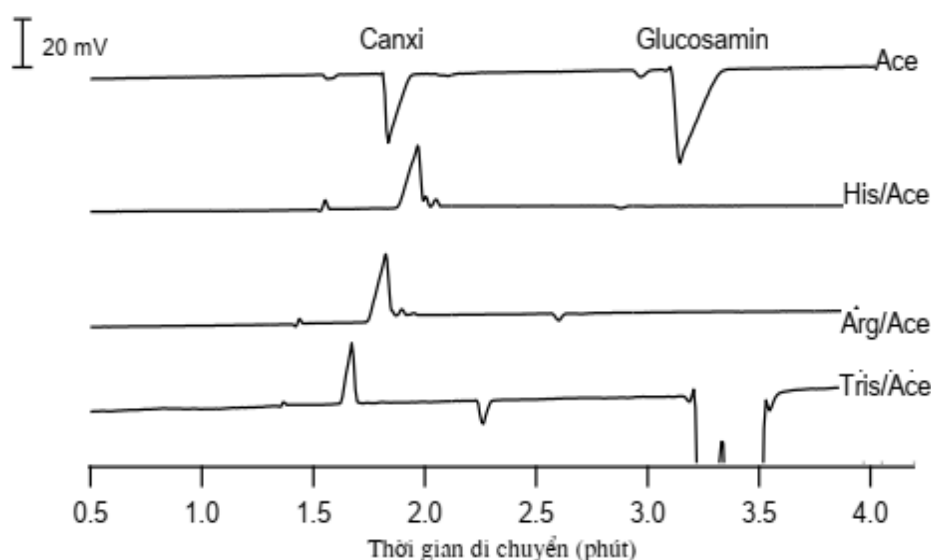
3.1.1.1. *Khảo sát ảnh hưởng của dung dịch điện ly*

Trong phương pháp CE-C⁴D, dung dịch điện ly có vai trò rất quan trọng trong việc xác định tính chất và đặc trưng của các quá trình 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 điện ly, ba yếu tố gồm: pH, thành phần và nồng độ của dung dịch điện ly đóng vai trò quan trọng nhất. Với mao quản silica, vùng giá trị pH điện di thường dùng và có thể thay đổi trong khoảng từ 2,0-10,0 tùy thuộc vào mỗi loại mẫu phân tích. Vùng pH > 10,0 hoặc pH < 2,0 thường hạn chế sử dụng do các chất phân tích trong vùng này thường kém bền, dễ bị thay đổi điện tích làm thay đổi dạng tồn tại hay có thể bị kết tủa trong mao quản. Thành phần của dung dịch điện ly gồm các ion có độ điện di nhỏ, tức là phải có điện tích nhỏ nhưng kích thước tương đối lớn, ngoài ra các chất đệm phải tan tốt trong nước, bền vững trong mao quản và trong quá trình điện di. Khi sử dụng detector độ dẫn, các chất đệm điện ly như Tris, His, Arg, Ace... được dùng phổ biến do có độ dẫn điện nhỏ, kích thước tương đối lớn dù chúng có khả năng hấp thụ quang. Các hệ đệm sinh học có thể cho giá trị pH từ 4,0-9,0 là vùng pH phù hợp cho nhiều chất phân tích trong CE. Sau pH và thành phần của hệ đệm điện di, cần lựa chọn nồng độ đệm thích hợp để có dung lượng đệm đủ lớn và không chế hệ đệm không đổi trong suốt quá trình điện di.

a) *Khảo sát ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly*

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, sẽ tiến hành phân cực dương để các chất phân tích chính là các cation sẽ di chuyển từ cực dương sang cực âm theo chiều của dòng EOF, do đó cả glucosamin và canxi sẽ xuất hiện trước EOF. Các hệ đệm điện ly được khảo

sát có hợp phần bazơ là Arg, Tris, His kết hợp với hợp phần acid là acid acetic, đồng thời đệm acid acetic cũng được tiến hành khảo sát. Các điều kiện thực nghiệm như đã ở được trình bày ở mục 2.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly được thể hiện trong hình 3.1.

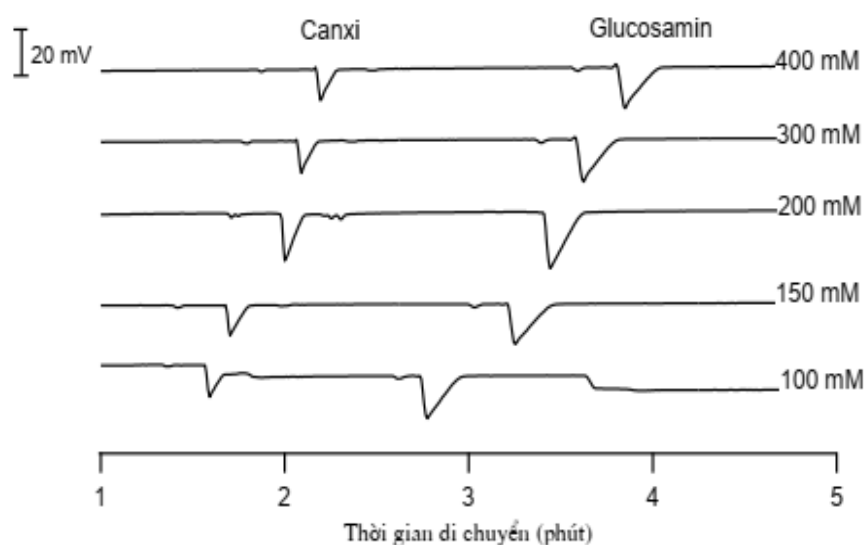


Hình 3.1. Ảnh hưởng của dung dịch điện ly đến sự phân tích glucosamin và canxi

Kết quả 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.

b) Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly

Trong phương pháp CE, nồng độ của dung dịch điện di phải đủ lớn để tạo nên môi trường điện di ổn định. Tuy nhiên khi nồng độ quá lớn sẽ làm tăng thời gian di chuyển của chất phân tích do linh độ điện di hiệu dụng của các ion tăng lên. Đồng thời, khi nồng độ các ion tăng sẽ ảnh hưởng đến tương tác tĩnh điện của lớp điện kép với thành mao quản, làm vùng mẫu di chuyển không phẳng gây nhiễu đường nền, khả năng tách chất kém và pic không cân đối. Việc khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly Ace được thực hiện với các nồng độ là 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM và 400 mM. Kết quả được thể hiện trong hình 3.2 và bảng 3.1.



Hình 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly đến thời gian di chuyển và sự phân tách của glucosamin và canxi

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi

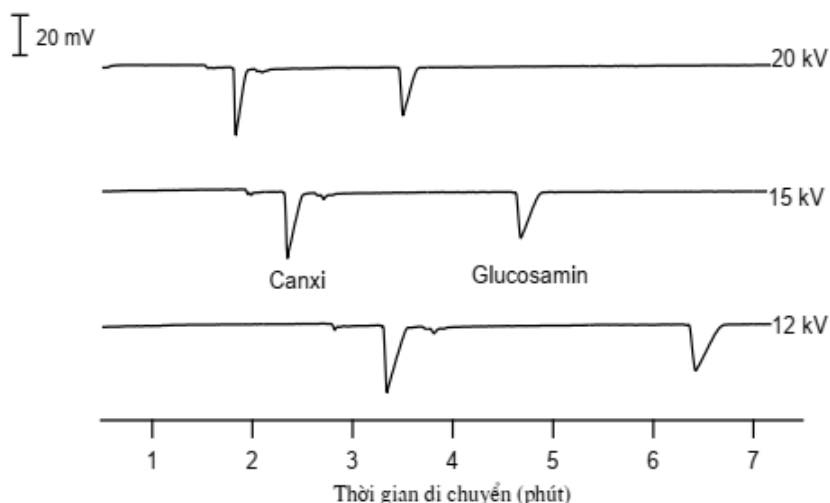
Chất phân tích	100 mM		150 mM		200 mM		300 mM		400 mM	
	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)
Glucosamin	1,70	35,23	1,78	50,90	1,92	55,67	2,11	48,11	2,18	40,90
Canxi	2,84	107,33	3,24	141,95	3,34	157,89	3,63	129,68	3,87	112,06

Từ điện di đồ và bảng kết quả có thể nhận thấy, dung dịch điện ly Ace 200mM cho đường nền ổn định và pic đẹp, cân đối hơn so với đường nền của dung dịch Ace 100 mM. Đồng thời, diện tích peak của hai chất phân tích glucosamin và canxi tại dung dịch Ace 200 mM cao nhất. Vì vậy, nồng độ dung dịch điện ly Ace 200 mM được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo.

3.1.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Quá trình điện di trong mao quản chỉ xảy ra khi có một nguồn thế tách cao. Thế này 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. Vì thế, để có một kết

quả điện di tốt và ổn định, phải chọn được giá trị thế V thích hợp nhất, không chế và giữ cho giá trị thế V này không đổi trong suốt quá trình điện di [5]. Việc khảo sát thế tách đồng thời glucosamin và canxi được thực hiện ở +12 kV, +15 kV và +20kV với các điều kiện phân tích như đã nêu ở mục 2.2. Kết quả khảo sát được thể hiện trong hình 3.3 và bảng 3.2.



Hình 3.3. Ảnh hưởng của thế tách đến sự phân tách giữa glucosamin và canxi

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của thế tách đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi

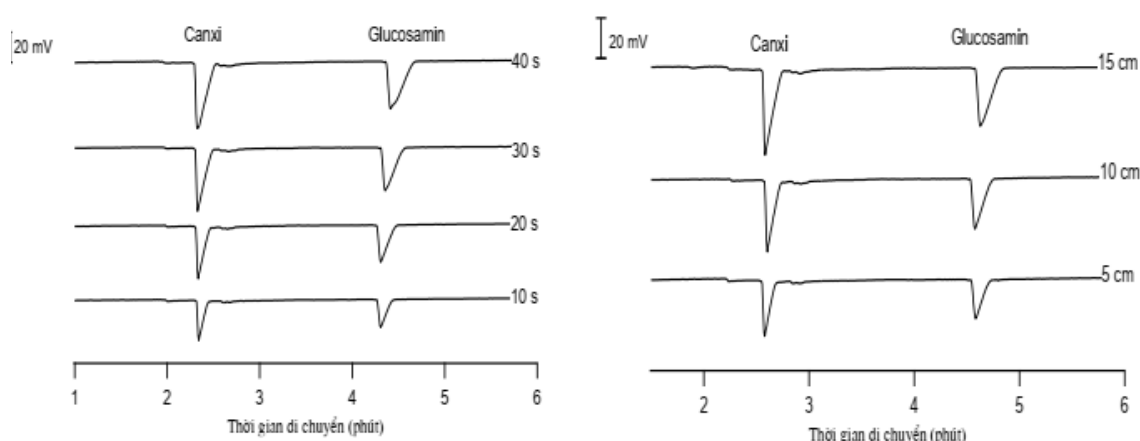
Chất phân tích	Thế tách (kV)					
	+ 12		+ 15		+ 20	
	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)
Glucosamin	3,43	120,58	2,34	101,01	1,85	77,20
Canxi	6,37	116,04	4,87	96,28	3,49	74,07

Khi áp thế từ +12 kV đến +20 kV, các chất phân tích có thời gian di chuyển nhanh hơn. Điều này hoàn toàn phù hợp với lý thuyết, khi thế tách (V) tăng, lực điện trường (E) cũng tăng ($E = V/L$ với L là chiều dài của ống mao quản), làm cho tốc độ di chuyển (v_i) của các chất phân tích tăng lên theo công thức 1.1. 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, chân pic của glucosamin không được cân đối, doãng

chân và thời gian phân tích các chất bị kéo dài không cần thiết. Do đó, thế tách +15 kV được lựa chọn là phù hợp cho phép phân tích.

3.1.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu và thời gian bơm mẫu

Trong phương pháp bơm mẫu thủy động học kiểu xi phong, lượng mẫu bơm vào tỷ lệ thuận với chiều cao bơm mẫu và thời gian bơm mẫu [5]. Trong quá trình nạp mẫu vào mao quản, lượng mẫu bơm vào phải đủ lớn để đảm bảo độ nhạy và khả năng tách tốt. Chiều cao bơm mẫu càng cao thì sự chênh lệch về chiều cao của hai ống đầu mao quản càng lớn dẫn tới lượng mẫu bơm vào mao quản càng nhiều. Tương tự chiều cao bơm mẫu, nếu thời gian bơm mẫu càng lớn thì lượng mẫu bơm vào mao quản càng lớn. Tuy nhiên nếu lượng mẫu được bơm vào mao quản quá lớn thì sự phân tán mẫu sẽ lớn, khi đó khả năng tách chất bị giảm. Do đó cần khảo sát nhằm chọn ra chiều cao và thời gian bơm mẫu thích hợp để đảm bảo thu được tín hiệu lớn nhất mà chân pic không bị dẫn rộng. 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; với các điều kiện khảo sát như đã nêu ở mục 2.2.2.3 và 2.2.2.4. Kết quả thu được thể hiện ở hình 3.4 và bảng 3.3, 3.4.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của thời gian và chiều cao bơm mẫu đến sự phân tách của glucosamin và canxi

a) Thời gian bơm mẫu

b) Chiều cao bơm mẫu

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi

Chất phân tích	Thời gian bơm mẫu (s)							
	10		20		30		40	
	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)
Glucosamin	2,20	53,22	2,17	88,12	2,14	118,08	2,12	168,20
Canxi	4,35	51,89	4,30	84,59	4,40	113,14	4,45	165,91

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu đến diện tích pic (S_{pic}) và thời gian di chuyển (t_{dc}) của glucosamin và canxi

Chất phân tích	Chiều cao bơm mẫu (cm)					
	5		10		15	
	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)	t_{dc} (min)	S_{pic} (mV.s)
Glucosamin	2,41	57,89	2,37	88,12	2,31	124,34
Canxi	4,49	54,31	4,47	84,59	4,45	126,03

Các kết quả ở hình 3.4 và bảng 3.3, 3.4 cho thấy, nhìn chung khi chiều cao bơm mẫu càng tăng và thời gian bơm mẫu càng dài, diện tích pic thu được tăng lên đáng kể trong khi thời gian di chuyển của các chất không thay đổi nhiều. Điều này hoàn toàn hợp lý vì khi lượng mẫu bơm vào mao quản tăng, tín hiệu thu được sẽ lớn hơn, tuy nhiên nếu lượng mẫu bơm vào mao quản quá lớn, pic sẽ doãng rộng và làm giảm độ phân giải giữa các pic liền kề. Tại thời điểm bơm mẫu 20 s và chiều cao bơm mẫu 10 cm cho kết quả phù hợp do tín hiệu đo ổn định hơn, nhiễu nền ít hơn, đồng thời đảm bảo được độ nhạy cao mà vẫn có sự tách tốt giữa các chất phân tích. Vì vậy, chiều cao bơm mẫu 10 cm và thời gian 20 s được lựa chọn là điều kiện thích hợp.

Từ các kết quả khảo sát thu được ở trên, các điều kiện thích hợp nhằm xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C⁴D được tổng hợp ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Điều kiện thích hợp xác định đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C⁴D

Các yếu tố	Điều kiện
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 50 cm, chiều dài hiệu dụng là 35 cm, đường kính trong là 50 µm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phong: 10 cm
Thời gian bơm mẫu	20 s
Dung dịch điện ly	Ace 200 mM
Thế tách	+15 kV

3.1.2. Đánh giá phương pháp phân tích

3.1.2.1. Xây dựng đường chuẩn

Các dung dịch có nồng độ biến thiên trong khoảng 0,5- 100,0 mg/L đối với canxi và 2,0- 100,0 mg/L đối với glucosamin dùng để dựng đường chuẩn được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc. Mỗi dung dịch được đo trên hệ điện di 3 lần và tiến hành theo các điều kiện đã tối ưu ở bảng 3.5. Giá trị pic 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 3.6.

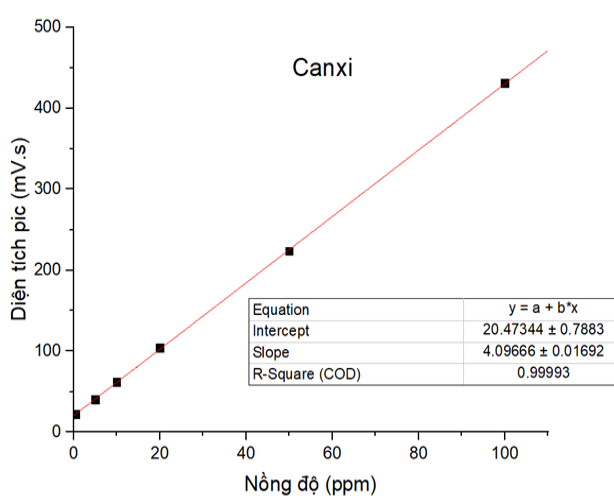
Bảng 3.6. Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ của canxi và glucosamin

STT	Canxi		Glucosamin	
	Nồng độ (mg/L)	Diện tích pic (mV.s)	Nồng độ (mg/L)	Diện tích pic (mV.s)
1	0,5	22,50	2,0	2,58
2	5,0	40,13	5,0	6,49
3	10,0	61,70	10,0	12,23
4	20,0	104,31	20,0	24,84
5	50,0	223,40	50,0	63,18
6	100,0	430,73	100,0	123,05

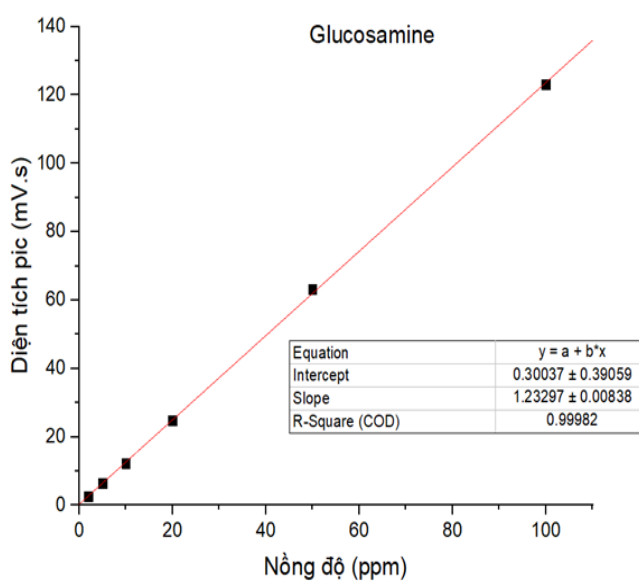
Kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy tương ứng được trình bày ở bảng 3.7 và hình 3.5, 3.6.

Bảng 3.7. 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



Hình 3.5. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ canxi



Hình 3.6. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ glucosamin

Kết quả thu được cho thấy, các hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của điện tích píc vào nồng độ chất phân tích là 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. Tính theo thống kê, các giá trị P_{value} của glucosamin và canxi lần lượt là 0,085 và 0,485 đều lớn hơn 0,05 nên phương pháp không mắc sai số hệ thống (tham khảo phụ lục PL6).

3.1.2.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Nguyên tắc xác định (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) glucosamin và canxi của phương pháp như mục 2.4.1. Kết quả thu được thể hiện trong bảng 3.8.

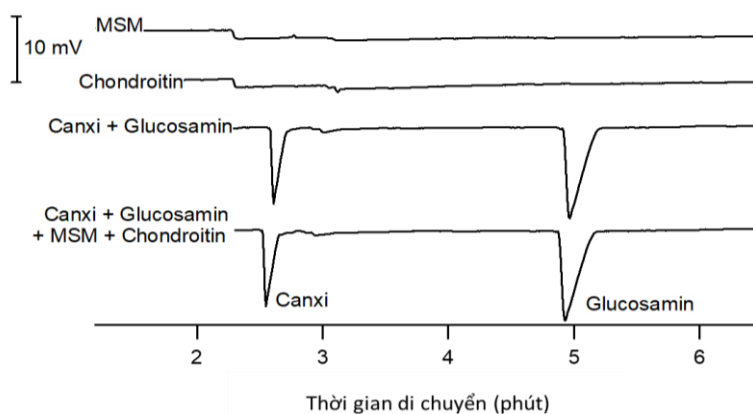
Bảng 3.8. Giới hạn phát hiện glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C⁴D

Chất	Chiều cao píc (S) (mV)	Tín hiệu nhiễu đường nền (N) (mV)	S/N	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Canxi	0,84	0,25	3,36	0,05	0,17
Glucosamin	0,27	0,09	3,00	0,50	1,67

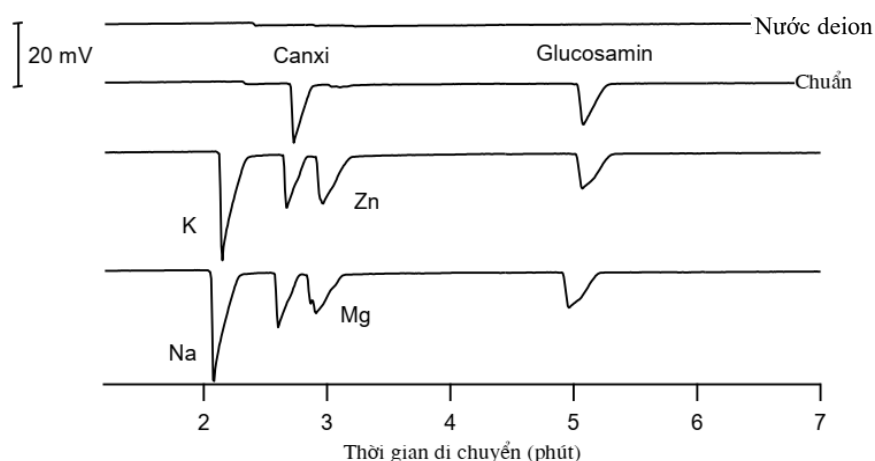
Như vậy, giới hạn phát hiện đối với canxi là 0,05 mg/L và glucosamin là 0,50 mg/L. Từ đó, giới hạn định lượng của glucosamin và canxi tương ứng là 0,17 và 1,67 mg/L.

3.1.2.3. Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

Sự có mặt của bốn cation là K^+ , Na^+ , Zn^{2+} và Mg^{2+} và các chất có tác dụng điều trị bệnh xương khớp bao gồm methylsulfonmethane (MSM) và chondroitin trong mẫu thực sẽ ảnh hưởng đến kết quả của quá trình phân tích đồng thời hai chất glucosamin và canxi. Ảnh hưởng của các cation và các chất có tác dụng điều trị bệnh xương khớp được tiến hành khảo sát bằng cách thêm chuẩn của từng cation với nồng độ thích hợp vào hỗn hợp chất chuẩn glucosamin (80 ppm) và canxi (20 ppm) với các điều kiện tối ưu đã trình bày ở bảng 3.5. Kết quả khảo sát được thể hiện trong hình 3.7 và hình 3.8.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của MSM và chondroitin đến sự phân tách glucosamin và canxi



Hình 3.8. Ảnh hưởng của cation K^+ , Na^+ , Zn^{2+} và Mg^{2+} đến sự phân tách glucosamin và canxi

Kết quả cho thấy, trong điều kiện phân tích tối ưu MSM và chondroitin; ion K^+ và ion Na^+ không ảnh hưởng đến pic canxi. Đồng thời, ion Zn^{2+} và Mg^{2+} gây ảnh hưởng đến pic canxi khi nồng độ lớn hơn 50 ppm đối với Zn^{2+} và 20 ppm đối với Mg^{2+} . Do đó, trong trường hợp các mẫu phân tích có hàm lượng các chất ảnh hưởng lớn thì cần pha loãng để đảm bảo quá trình phân tích chính xác. Tuy nhiên, khi khảo sát thực tế đối với các nền mẫu lựa chọn cho thấy chỉ có ion Zn^{2+} và Mg^{2+} thường có nồng độ nhỏ hơn ngưỡng ảnh hưởng.

3.1.2.4. Đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Tiến hành khảo sát độ lặp lại của phương pháp với glucosamin và canxi như mục 2.4.2. Kết quả thu được trình bày trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp CE-C⁴D

Chất phân tích	Mức	Nồng độ thêm chuẩn (mg/L)	Nồng độ thu hồi trung bình (mg/L)	Độ thu hồi (%)	RSD (%) (n = 6)	Độ thu hồi trung bình (%)
Canxi	1	0,5	0,53	106,0	2,18	101,9
	2	10,0	9,72	97,2	1,85	
	3	50,0	51,3	102,6	1,81	
Glucosamin	1	5,0	4,60	92,0	3,00	98,0
	2	20,0	20,7	103,5	3,29	
	3	50,0	49,2	98,4	1,50	

Kết quả trong bảng 3.9 cho thấy, phương pháp phân tích đều đáp ứng được các yêu cầu về độ đúng và độ chụm. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) 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 %) [77].

3.1.3. Phân tích đồng thời glucosamin và canxi trong mẫu thực phẩm chức năng

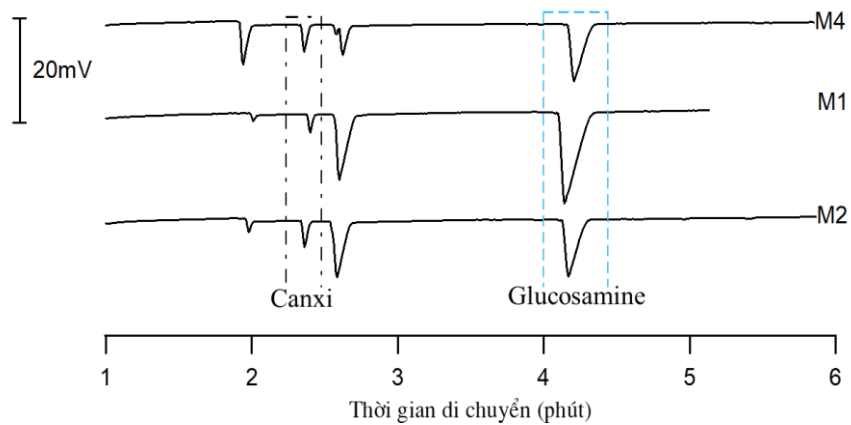
3.1.3.1. Kết quả phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN bằng phương pháp CE-C⁴D

Áp dụng quy trình thu được ở trên để phân tích glucosamin và canxi trong 14 mẫu TPCN được mua ngẫu nhiên tại các nhà thuốc trên địa bàn Hà Nội. Mẫu được xử lý theo mục 2.3.2. Các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 3.10, các hình 3.9-3.14 và các đồ thị 3.15-3.16.

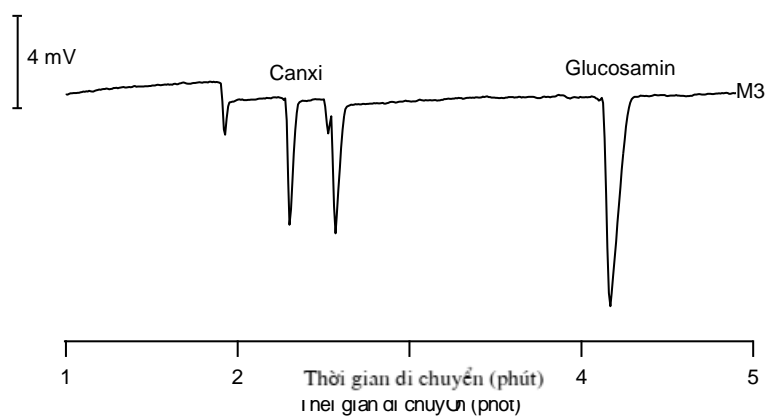
Bảng 3.10. Kết quả phân tích hàm lượng glucosamin và canxi trong mẫu TPCN bằng phương pháp CE-C⁴D

STT	Kí hiệu mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng (mg/viên)		Sai khác so với nhãn (%)
			Phương pháp CE-C ⁴ D	Nhãn	
1	M1	Canxi	18,3	17,5	+4,57
		Glucosamin	308,0	312,5	- 1,44

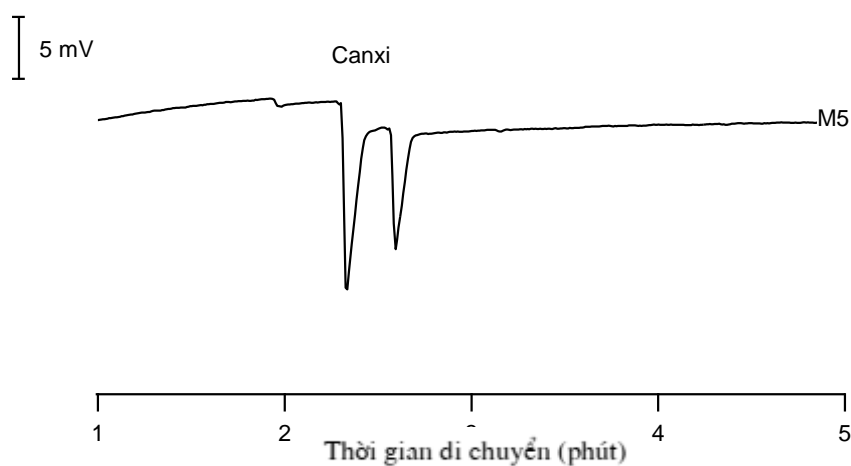
2	M2	Canxi	4,3	4,6	- 6,52
		Glucosamin	270,0	265,7	+ 1,61
3	M3	Canxi	19,2	20,0	- 4,00
		Glucosamin	258,0	284,6	- 9,34
4	M4	Canxi	10,0	11,6	- 4,00
		Glucosamin	338,0	323,7	- 5,83
5	M5	Canxi	101,5	100,0	+ 1,5
6	M6	Canxi	190,1	208,0	- 8,60
7	M7	Canxi	125,4	126,0	- 0,47
8	M8	Canxi	7,8	8,0	- 2,50
		Glucosamin	324,0	342,0	- 5,26
9	M9	Canxi	26,3	25,0	+5,20
		Glucosamin	479,0	488,0	- 1,84
10	M10	Canxi	4,5	4,6	- 2,17
		Glucosamin	504,0	506,0	- 0,39
11	M11	Glucosamin	516,0	519	- 0,57
12	M12	Glucosamin	324,0	344,0	- 5,81
13	M13	Canxi	41,9	40,0	+ 4,75
		Glucosamin	494,0	457,0	+ 8,09
14	M14	Canxi	49,4	48,0	+ 2,91
		Glucosamin	111,0	107,0	+ 3,74



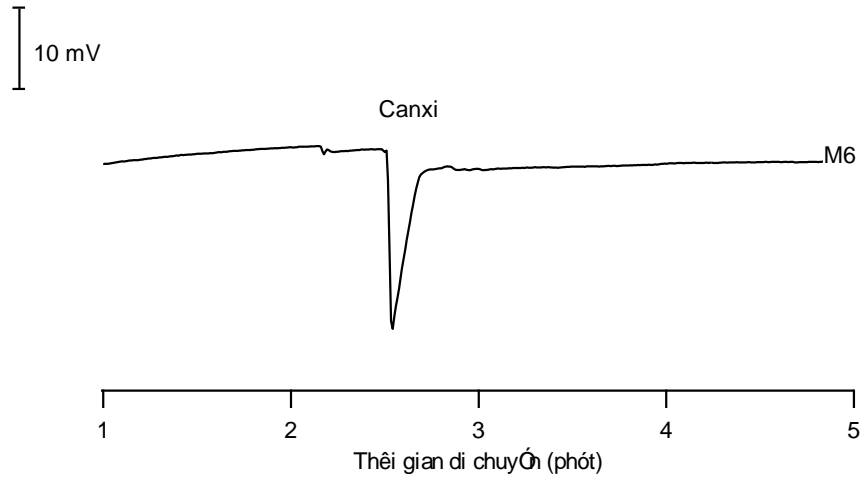
Hình 3.9. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong một số mẫu TPCN



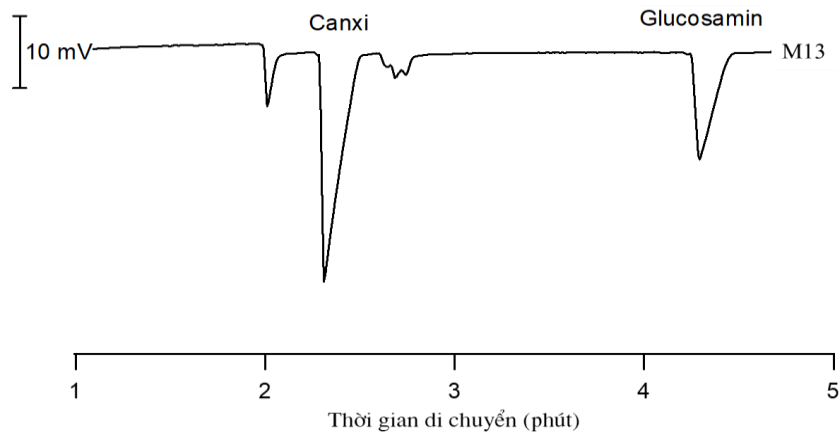
Hình 3.10. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M3



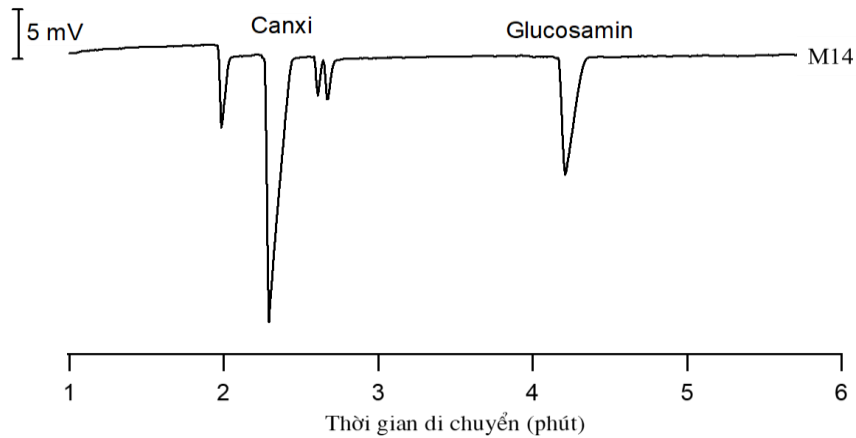
Hình 3.11. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M5



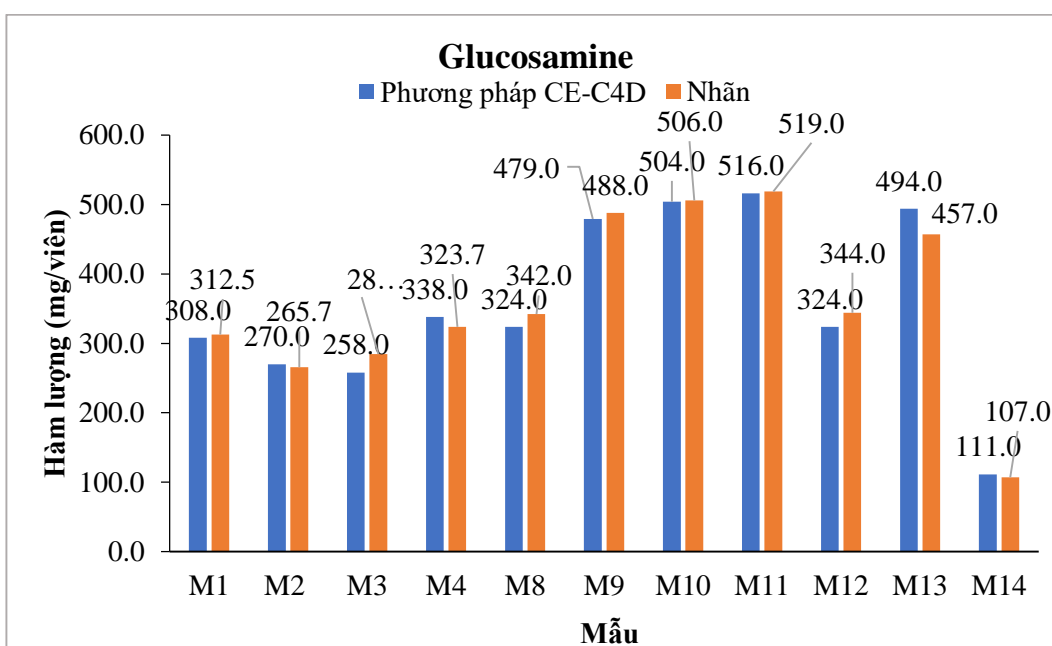
Hình 3.12. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M6



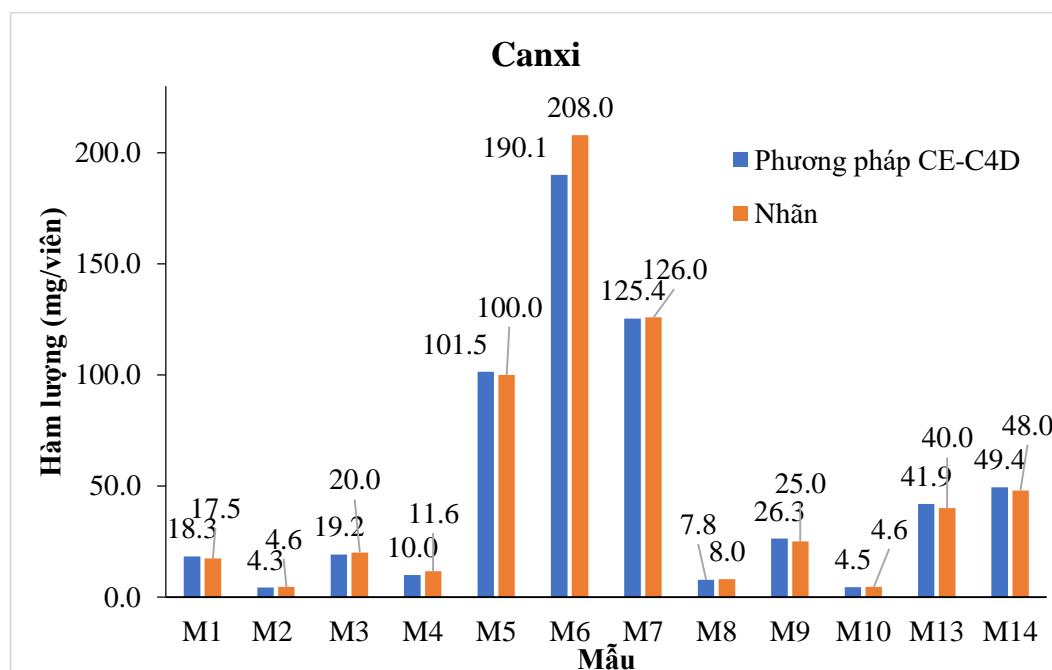
Hình 3.13. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M13



Hình 3.14. Điện di đồ phân tích glucosamin và canxi trong mẫu TPCN M14



Hình 3.15. Đồ thị so sánh hàm lượng glucosamin trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D



Hình 3.16. Đồ thị so sánh hàm lượng canxi trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D

Kết quả phân tích được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn cho thấy hàm lượng các chất phân tích trong các mẫu có sự sai khác so với nhãn nhỏ hơn 10 %. Như vậy, quy trình phân tích tối ưu hỗn hợp glucosamin và canxi bằng phương pháp

CE-C⁴D khả thi để phân tích hàm lượng hoạt chất glucosamin và canxi trong các mẫu TPCN đang lưu hành trên thị trường.

3.1.3.2. Kết quả phân tích đối chứng canxi bằng phương pháp ICP-OES và glucosamin bằng phương pháp HPLC- FLD trong mẫu thực phẩm chức năng

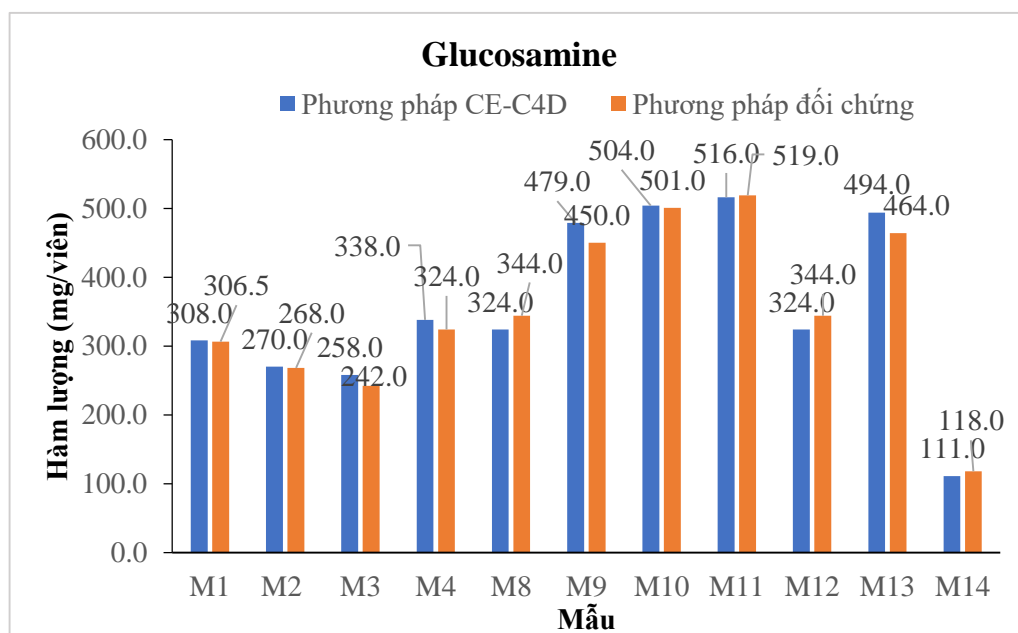
Để kiểm chứng các kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D, 14 mẫu TPCN đã được phân tích đối chứng bằng phương pháp tiêu chuẩn: phương pháp HPLC-FLD đối với glucosamin và phương pháp ICP-OES đối với canxi (các điều kiện phân tích của các phương pháp đối chứng được nêu tại mục 2.1.1.2 và phụ lục). Kết quả phân tích đối chứng được thể hiện trong bảng 3.11.

Bảng 3.11. Kết quả phân tích hàm lượng glucosamin và canxi trong một số mẫu thực phẩm chức năng bằng phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng

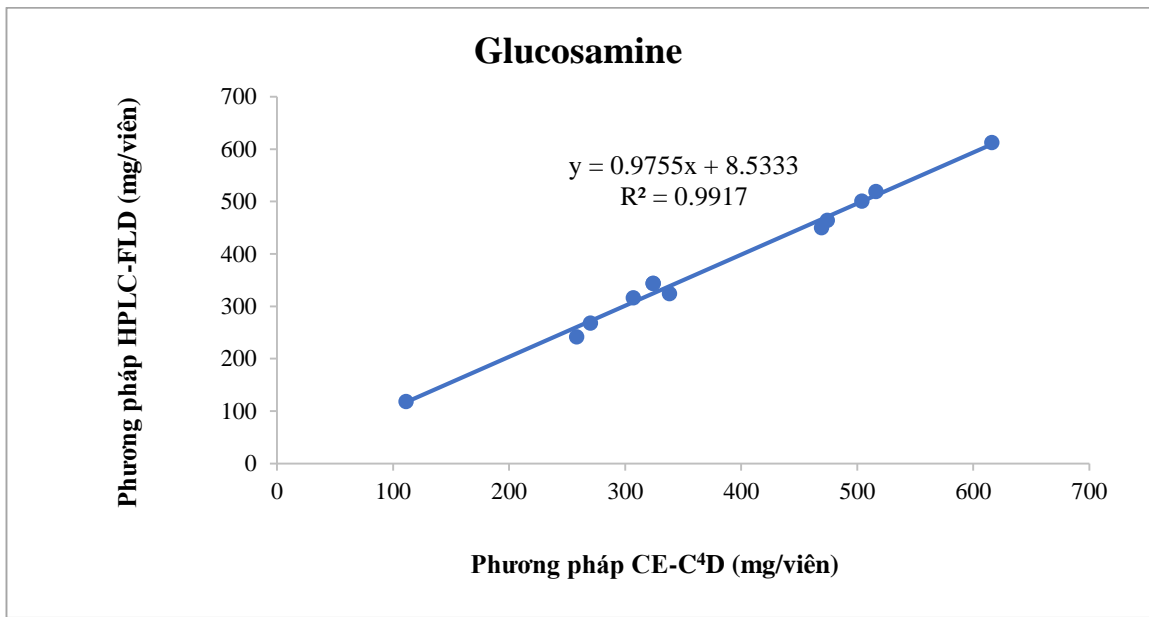
STT	Kí hiệu mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng (mg/viên)		Sai khác giữa hai phương pháp (%)
			Phương pháp CE-C ⁴ D	Phương pháp đối chứng	
1	M1	Canxi	18,3	18,5	- 0,81
		Glucosamin	308,0	306,5	+ 0,49
2	M2	Glucosamin	270,0	268,0	+ 0,75
3	M3	Glucosamin	258,0	242,0	+ 6,61
4	M4	Glucosamin	338,0	324,0	+ 4,32
5	M5	Canxi	101,5	109,0	- 6,88
6	M6	Canxi	190,1	190,0	+ 0,05
7	M7	Canxi	125,4	128,0	- 2,03
8	M8	Canxi	7,8	7,8	0,00
		Glucosamin	324,0	344,0	- 5,81

9	M9	Canxi	26,3	24,9	+ 5,62
		Glucosamin	479,0	450,0	+ 6,44
10	M10	Canxi	4,5	4,4	+ 2,27
		Glucosamin	504,0	501,0	+ 0,60
11	M11	Glucosamin	516,0	519,0	- 0,58
13	M12	Glucosamin	324,0	344,0	- 5,81
12	M13	Canxi	41,9	44,8	- 6,47
13		Glucosamin	494,0	464,0	+ 6,47
14	M14	Canxi	49,4	47,7	+ 3,56
		Glucosamin	111,0	118,0	- 5,93

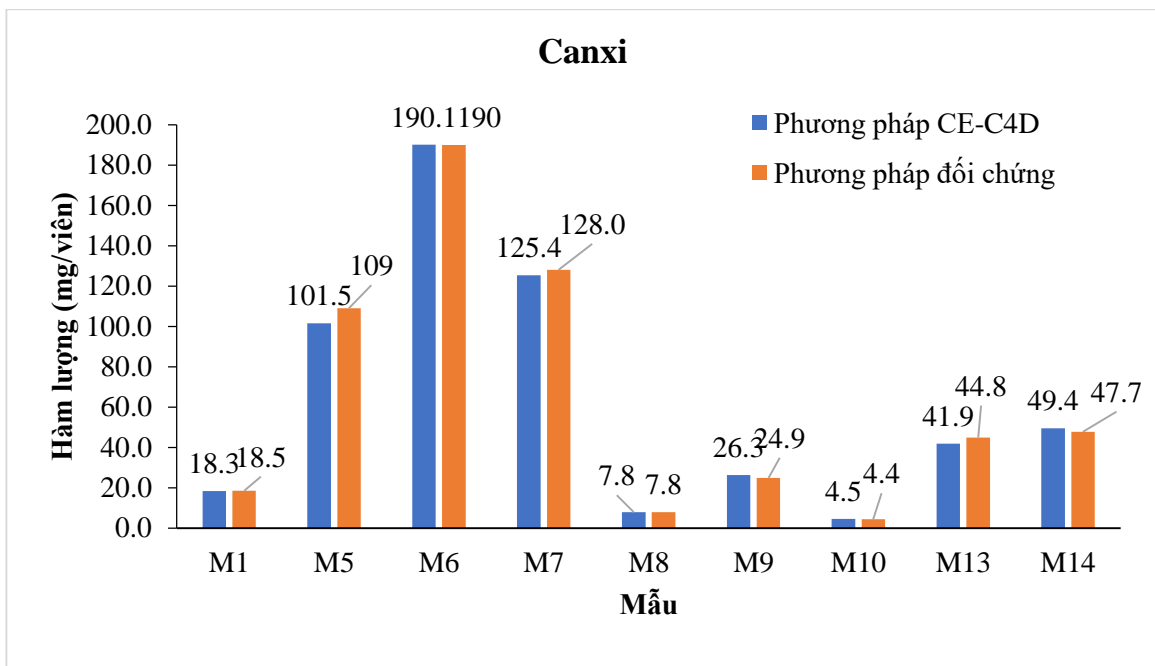
Từ kết quả bảng 3.11 cho thấy, hàm lượng của glucosamin và canxi thu được từ phương pháp CE-C⁴D so với phương pháp đối chứng cho sự sai khác trong khoảng - 6,88% đến + 6,61 %. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa hai phương pháp được thể hiện trong hình 3.17- 3.20.



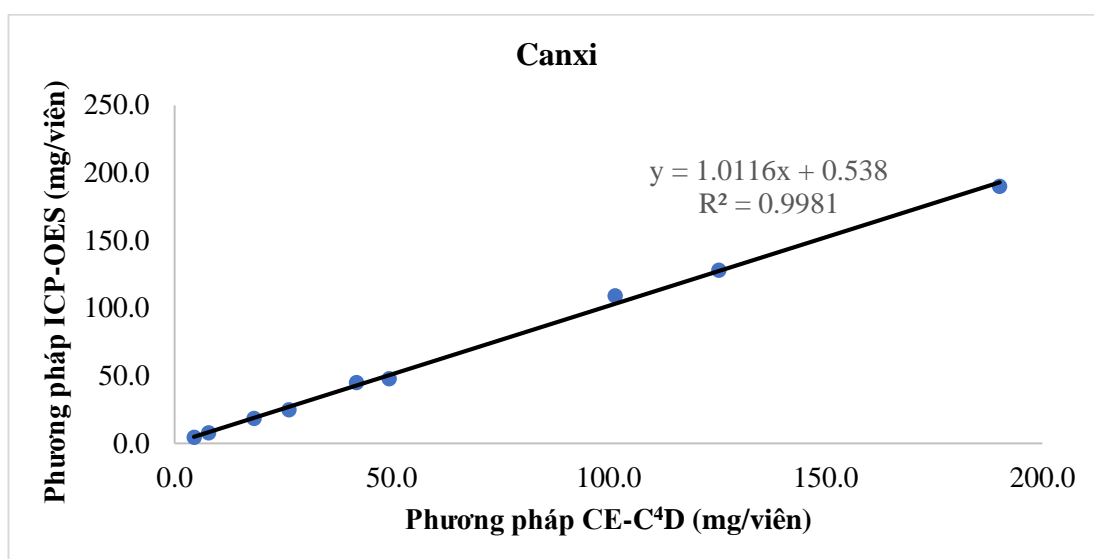
Hình 3.17. Đồ thị so sánh hàm lượng glucosamin giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng HPLC-FLD



Hình 3.18. Sự tương quan hàm lượng glucosamin giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng HPLC-FLD



Hình 3.19. Đồ thị so sánh hàm lượng canxi giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng ICP-OES



Hình 3.20. Sự tương quan hàm lượng canxi giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng ICP-OES

Từ đồ thị cho thấy, hệ số tương quan xác định $R^2 > 0,99$ chứng tỏ kết quả phân tích hàm lượng các chất phân tích trong các mẫu bằng hai phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng có độ tương quan cao, giá trị P_{value} khi so sánh từng cặp chuẩn theo chuẩn t đều lớn hơn 0,05 (tham khảo phụ lục PL7); cho thấy phương pháp CE-C⁴D là đáng tin cậy. Do vậy, phương pháp CE-C⁴D phù hợp và có tiềm năng để phân tích hàm lượng glucosamin và canxi trong mẫu thực phẩm chức năng.

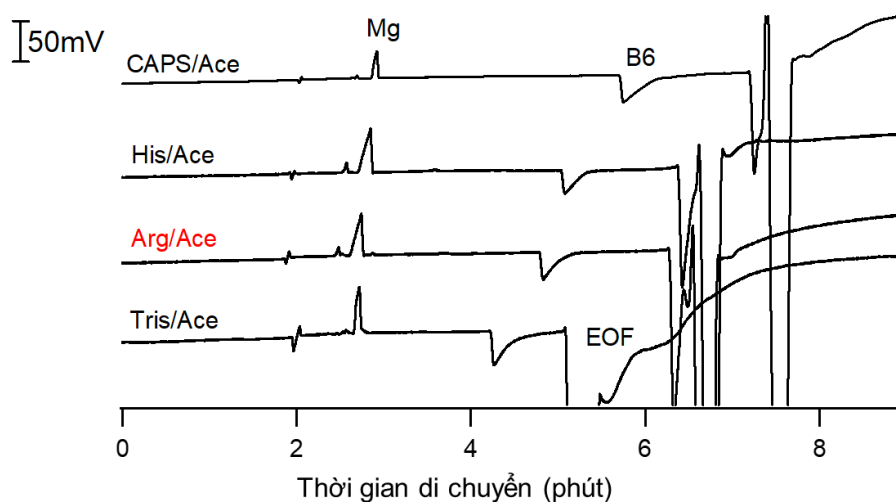
3.2. Xác định đồng thời vitamin B₆ và magie bằng phương pháp CE-C⁴D

3.2.1. Khảo sát tối ưu điều kiện phân tách và xác định đồng thời vitamin B₆ và magie bằng phương pháp CE-C⁴D

3.2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần và pH dung dịch điện ly

Thực hiện quá trình khảo sát phân tích điện di với các điều kiện thế điện di +20 kV, chiều cao bom mẫu 20 cm, thời gian bom mẫu 25 s với các loại đệm khảo sát: CAPS/Ace, His/Ace, Arg/Ace, Tris/Ace (10 mM) và các giá trị pH khảo sát gồm: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0. Công thức cấu tạo của vitamin B₆ có sự xuất hiện của nhóm NH₂ ($pK_a = 9,4$) nên khi dung dịch điện ly có $pH < pK_a$, vitamin B₆ tồn tại ở dạng cation (R-NH₃⁺). Do đó, các dung dịch điện ly phân tích đồng thời vitamin B₆ và magie cần

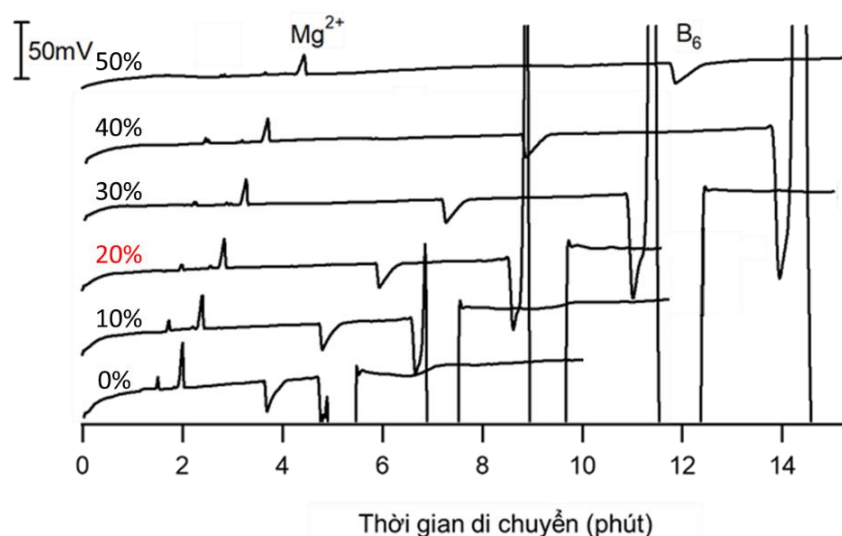
có pH xung quanh khoảng 4,0-7,0 nhằm đảm bảo các chất phân li hoàn toàn ở dạng cation. Khi đó, sẽ tiến hành phân cực dương để các chất phân tích chính là các cation sẽ di chuyển từ cực dương sang cực âm theo chiều của dòng EOF, do đó cả vitamin B₆ và magie sẽ xuất hiện trước EOF.



Hình 3.21. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của loại đệm đến sự phân tách của Mg^{2+} và vitamin B₆

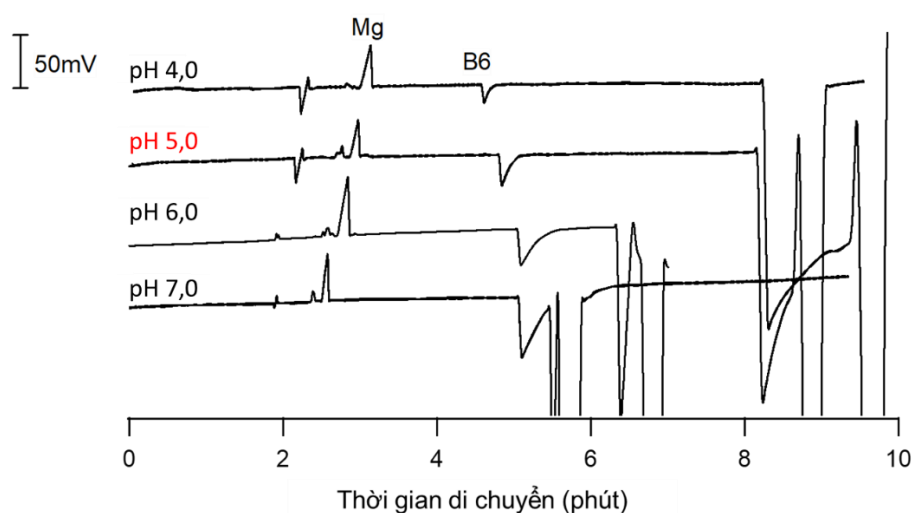
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly được thể hiện trong hình 3.21 cho thấy với loại đệm Tris, tín hiệu pic của Mg^{2+} hẹp còn pic của vitamin B₆ gần dòng EOF nên tín hiệu pic vitamin B₆ sẽ bị ảnh hưởng bởi dòng EOF. Đối với đệm His, pic chất vitamin B₆ nhỏ hơn so với ba loại đệm còn lại. Ngược lại, đệm CAPS và Tris cho pic Mg nhỏ. Với đệm Arg, pic chất vitamin B₆ xa dòng EOF và độ phân giải giữa các pic tốt. Vì vậy, đệm Arg được lựa chọn để khảo sát các điều kiện 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. Thực hiện quá trình khảo sát tỷ lệ thành phần ACN trong dung dịch điện ly từ 0-50%. Kết quả thu được như điện di đồ hình 3.22.



Hình 3.22. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần ACN đến sự phân tách của Mg^{2+} và vitamin B_6

Từ điện di đồ thu được ở hình 3.22, ở trường hợp ACN 0%, dòng EOF khá gần pic chất. Từ ACN 30% đến 50%, thời gian phân tích lâu hơn. So với ACN 10% thì ACN 20% cho thấy hiệu quả phân tách cao hơn và tín hiệu pic tốt hơn. Tại ACN 20%, thời gian phân tích phù hợp, hiệu quả tách cao và diện tích pic đủ lớn. Do đó, hệ đệm Arg/Ace + ACN 20% được tiến hành khảo sát pH từ 4,0-7,0.



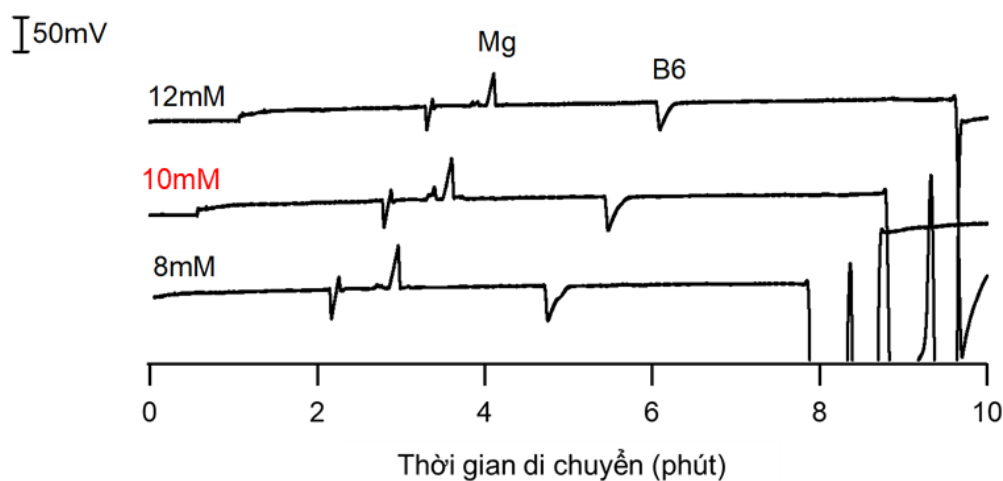
Hình 3.23. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng pH của hệ đệm đến sự phân tách của Mg^{2+} và vitamin B_6

Kết quả thu được tại hình 3.23 cho thấy tại pH=6,0 và pH=7,0 dòng EOF sát ngay pic chất vitamin B₆ dẫn đến tín hiệu pic bị ảnh hưởng. Tại pH=4,0 hiệu quả tách chưa cao và độ phân giải của các pic thấp hơn. Do đó, pH=5,0 phù hợp để khảo sát các điều kiện tiếp theo.

Từ tất cả các kết quả trên thấy rằng, hệ đệm Arg/Ace + ACN 20%; pH = 5,0 có diện tích pic đủ lớn, độ phân giải tốt rất phù hợp cho việc xác định Mg²⁺ và vitamin B₆. Vì vậy, dung dịch điện ly Arg/Ace + ACN 20%; pH=5,0 được lựa chọn là điều kiện tối ưu để khảo sát các điều kiện tiếp theo.

3.2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch điện ly

Nồng độ của dung dịch điện ly được khảo sát với 3 giá trị là 8 mM, 10 mM và 12 mM và được thực hiện với các điều kiện sau: hệ đệm Arg/Ace + ACN 20%; pH=5,0; thế điện di 20 kV; chiều cao bơm mẫu 20 cm; thời gian bơm mẫu 25 s. Kết quả khảo sát được trình bày trong hình 3.24.



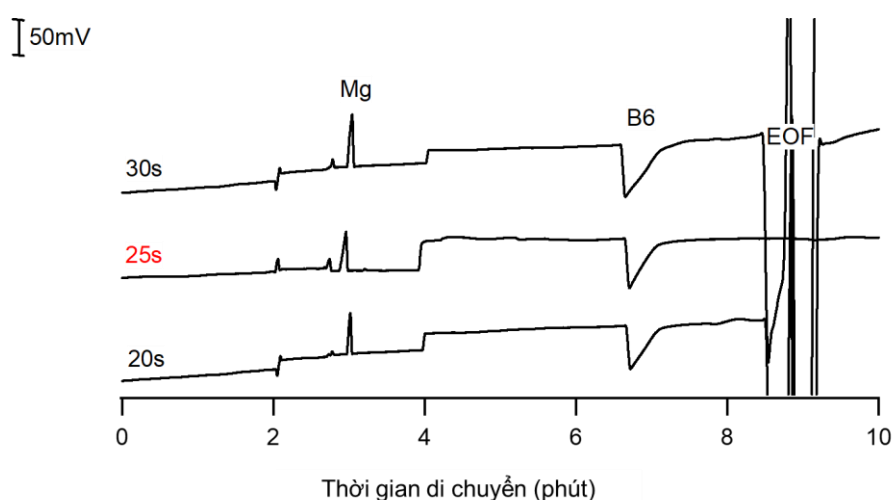
Hình 3.24. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Arg đến sự phân tách của Mg²⁺ và vitamin B₆

Kết quả cho thấy, khi tăng nồng độ dung dịch điện ly thì thời gian di chuyển của các chất phân tích tăng nhưng tín hiệu (diện tích) pic lại giảm. Điều này được giải thích là do khi tăng nồng độ dung dịch điện ly thì độ điện di hiệu dụng của các ion dương và âm tăng, do đó làm tăng thời gian di chuyển của chất tan. Khi tăng nồng độ

dung dịch điện ly cũng làm tăng độ dẫn của dung dịch điện ly làm giảm tín hiệu của chất phân tích. Có thể 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 Mg²⁺ 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 là được chọn là nồng độ tối ưu của hệ đệm điện di.

3.2.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu

Việc khảo sát thời gian bơm mẫu được thực hiện theo phương pháp thủy động học kiểu xi phong với 3 giá trị thời gian bơm mẫu khác nhau là 20 s, 25 s, 30 s. Khảo sát được thực hiện trong điều kiện hệ đệm Arg 10 mM/Ace + ACN 20%; pH=5,0; thế điện di 20 kV; chiều cao bơm mẫu 20 cm. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu được trình bày trong hình 3.25.



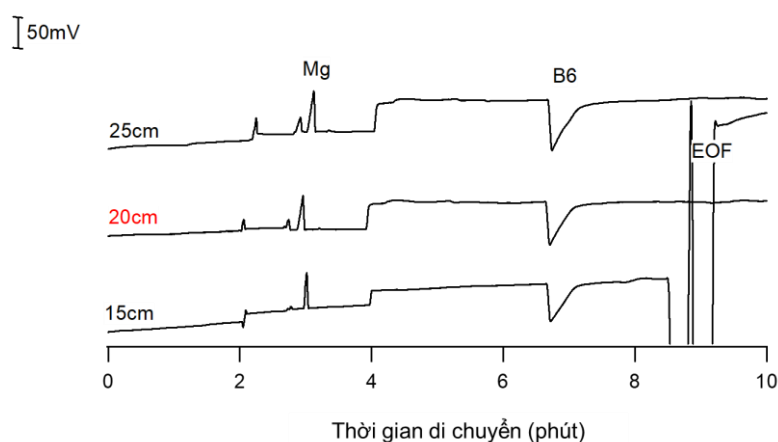
Hình 3.25. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến sự phân tách của Mg²⁺ và vitamin B₆

Kết quả cho thấy khi tăng thời gian bơm mẫu, thời gian di chuyển của các chất hầu như không thay đổi hoặc thay đổi rất ít nhưng diện tích pic tăng tương ứng khi tăng thời gian bơm mẫu từ 20 s đến 30 s. Điều này được giải thích vì khi tăng thời gian bơm mẫu sẽ làm tăng lượng mẫu được bơm vào mao quản, tạo tín hiệu lớn hơn.

Tuy nhiên, khi thời gian bơm mẫu dài tạo tín hiệu lớn hơn sẽ làm dịch chuyển đôi chút về thời gian di chuyển của các chất cũng như làm giảm độ phân giải giữa các pic. Ngoài ra, còn có các cation gây ảnh hưởng đến độ phân giải của pic và diện tích pic, nếu thời gian bơm mẫu dài sẽ tạo các tín hiệu lớn của các cation. Nhận thấy thời gian bơm mẫu 25 s là phù hợp để lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo vì chiều cao và diện tích pic đủ lớn. Thời gian 20 s pic bé, còn thời gian 30 s pic lớn song độ phân giải pic không tốt, vùng mẫu bị giãn rộng. Vì vậy, thời gian tối ưu cho các khảo sát tiếp theo là 25 s.

3.2.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu

Việc khảo sát chiều cao bơm mẫu được thực hiện với các giá trị 15 cm, 20 cm và 25 cm. Điều kiện để thực hiện phân tích hệ đệm Arg 10 mM/Ace + ACN 20%; pH=5,0; thế điện di 20 kV; thời gian bơm mẫu 25 s. Kết quả thu được ở hình 3.26. Kết quả cho thấy trường hợp chiều cao bơm mẫu 15 cm, tín hiệu pic bé, ở trường hợp 25 cm thì độ phân giải pic không tốt. Trong khi đó, chiều cao bơm mẫu là 20 cm cho kết quả diện tích pic đủ lớn, cân đối, nền ổn định. Vì vậy chiều cao bơm mẫu là 20 cm được lựa chọn là điều kiện tối ưu để khảo sát các điều kiện tiếp theo.

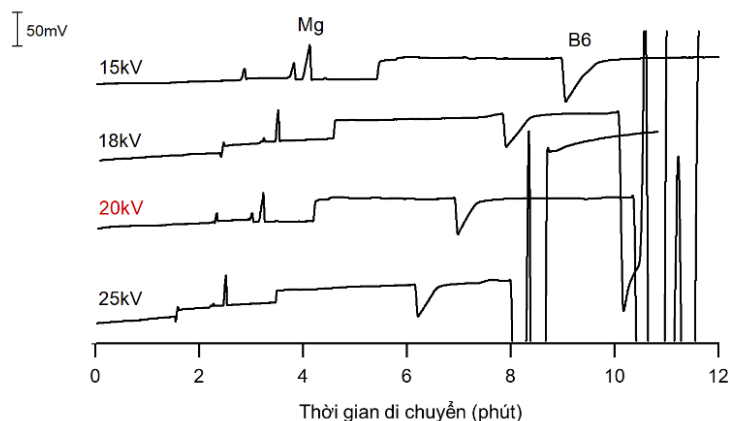


Hình 3.26. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu đến sự phân tách của Mg^{2+} và vitamin B_6

3.2.1.5. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Thế tách được lựa chọn để nghiên cứu bao gồm +15 kV, +18 kV, +20 kV và +25 kV. Các điều kiện khác áp dụng các kết quả tối ưu đã thu được bao gồm hệ đệm

Arg 10 mM/ Ace + ACN 20%; pH=5,0; thời gian bơm mẫu 25 s; chiều cao bơm mẫu 20 cm. Kết quả được thể hiện trong hình 3.27.



Hình 3.27. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thế tách đến sự phân tách của Mg^{2+} và vitamin B_6

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 +25 kV thời gian di chuyển của các chất ngắn hơn tại các thế còn lại nhưng hiệu quả tách kém hơn 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, làm giảm hiệu quả tách. Tại thế +15 kV và +18 kV thì thời gian phân tích lớn. Thế 20 kV có độ phân giải tốt, hiệu quả tách tốt, đường nền ổn định và thời gian phân tích nhanh. Do đó, thế +20 kV được lựa chọn làm thế tách tối ưu.

Tất cả các điều kiện đã tối ưu được tổng hợp trong bảng 3.12.

Bảng 3.12. Điều kiện tối ưu để phân tích đồng thời magie và vitamin B_6 bằng phương pháp CE- C^4D

Yếu tố ảnh hưởng	Điều kiện tối ưu hóa
Detector	C^4D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 55 cm, chiều dài hiệu dụng 40 cm, đường kính trong ID=50 μm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phong

Chiều cao bơm mẫu	20 cm
Thời gian bơm mẫu	25 s
Dung dịch điện ly	Arg 10 mM/ Ace + ACN 20%; pH=5,0
Thế tách	+20 kV

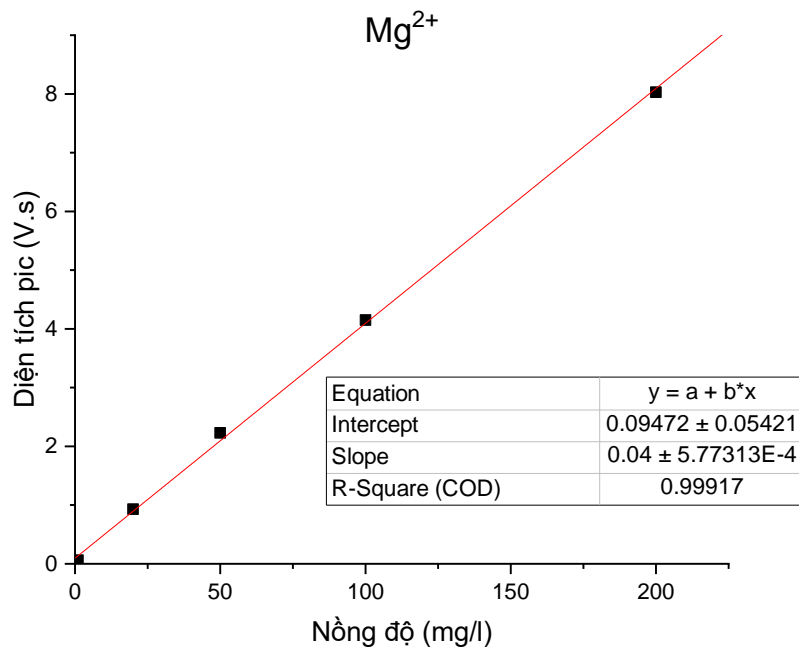
3.2.2 Đánh giá phương pháp phân tích

3.2.2.1. Xây dựng đường chuẩn

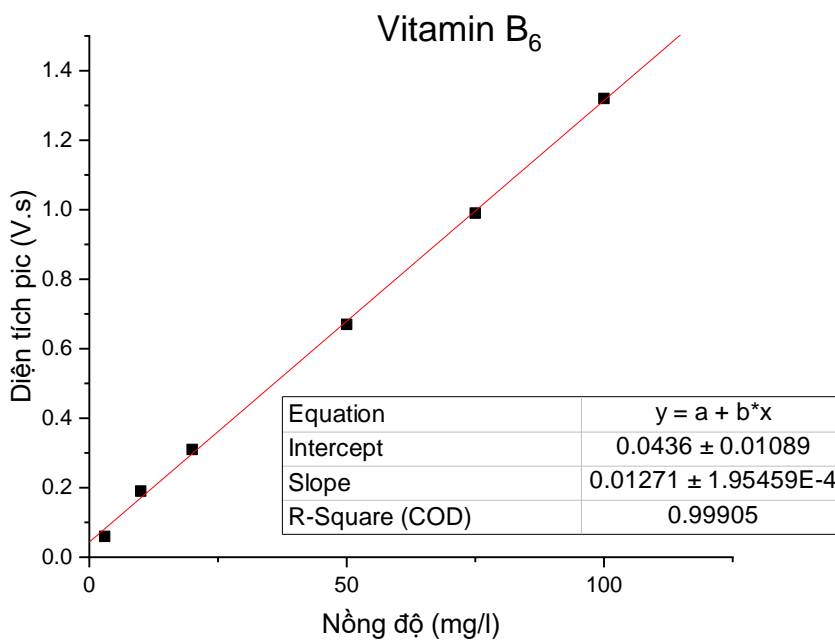
Các dung dịch dùng để dựng đường chuẩn được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc. Nồng độ của các dung dịch chuẩn magie được thay đổi từ 0,3 mg/L đến 200 mg/L, còn đối với vitamin B₆ là từ 3 mg/L đến 100 mg/L. Mỗi dung dịch được bơm 3 lần trên hệ điện di. Quá trình điện di được thực hiện trong điều kiện tối ưu. Giá trị trung bình của diện tích pic được sử dụng để dựng đường chuẩn. Các kết quả được thể hiện ở bảng 3.13, hình 3.28 và hình 3.29.

Bảng 3.13. Diện tích pic ở các nồng độ khác nhau của Mg²⁺ và vitamin B₆

STT	Mg ²⁺		Vitamin B ₆	
	Nồng độ (mg/L)	Diện tích pic (V.s)	Nồng độ (mg/L)	Diện tích pic (V.s)
1	0,30	0,02	3,00	0,06
2	1,00	0,06	10,00	0,19
3	20,00	0,93	20,00	0,31
4	50,00	2,23	50,00	0,67
5	100,00	4,15	75,00	0,99
6	200,00	8,03	100,00	1,32



Hình 3.28. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ magie



Hình 3.29. Đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B₆

Các phương trình đường chuẩn, hệ số tương quan được thể hiện trong bảng 3.14.

Bảng 3.14. 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 ± 0,00058)X + (0,09472 ± 0,05421)	0,9992	< 0,001
Vitamin B ₆	Y = (0,01271 ± 0,00020)X + (0,04360 ± 0,01089)	0,9991	< 0,001

Như có thể thấy trong bảng trên, đường chuẩn của magie và vitamin B₆ có hệ số tương quan tốt R² > 0,999 và P < 0,001 chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính tốt. Tính theo thống kê, giá trị P_{value} của vitamin B₆ và magie lần lượt là 0,061 và 0,155 (tham khảo phụ lục PL6) đều lớn hơn 0,05 nên phép phân tích không mắc sai số hệ thống.

3.2.2.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp phân tích

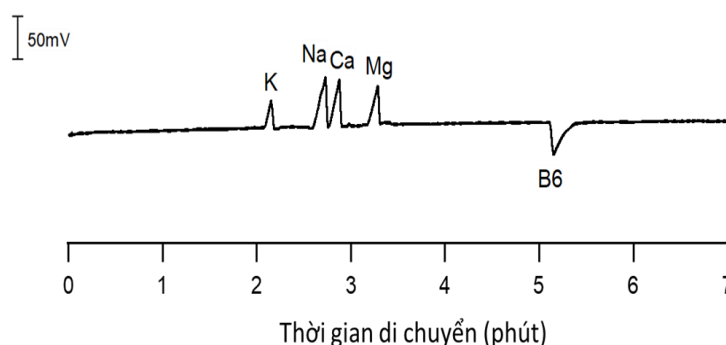
Xác định giới hạn phát hiện (LOD) bằng cách pha loãng dần hỗn hợp dung dịch chuẩn của Mg²⁺ và vitamin B₆ đến khi đạt được tín hiệu nhỏ nhất sao cho tín hiệu thu được gấp 3 lần so với nhiễu đường nền (S/N = 3). Giới hạn định lượng (LOQ) là giá trị nồng độ tại đó tín hiệu thu được gấp 10 lần so với nhiễu đường nền (S/N = 10). Bảng 3.15 thể hiện các kết quả thu được. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của Mg²⁺ lần lượt là 0,10 mg/L và 0,33 mg/L; LOD và LOQ của vitamin B₆ lần lượt là 1,00 mg/L và 3,30 mg/L.

Bảng 3.15. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của Mg²⁺ và vitamin B₆

Tên chất	C (mg/L)	Chiều cao (mV)	Tín hiệu nhiễu nền (mV)	S/N	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Mg	0,10	4,51	1,49	3,03	0,10	0,33
B ₆	1,00	1,01	0,32	3,16	1,00	3,30

3.2.2.3. Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

Sự có mặt của các cation K, Na, Ca, Mg (20 ppm) cùng với các vitamin B₁, B₅, B₆, B₉ (100 ppm) được khảo sát. Kết quả thu được như điện di đồ hình 3.30 cho thấy sự xuất hiện của các kim loại K, Na, Ca đã tách xa Mg và không thấy xuất hiện các vitamin B₁, B₅, B₉ cho thấy phương pháp phân tích đồng thời Mg và vitamin B₆ có độ đặc hiệu tốt.



Hình 3.30. Điện di đồ độ đặc hiệu của phương pháp phân tích đồng thời Mg^{2+} và vitamin B₆

3.2.2.4. Đánh giá độ chụm (độ lặp) và độ đúng (độ thu hồi) của phương pháp

Độ lặp và độ thu hồi của phương pháp được tiến hành như trong mục 2.4.2. Kết quả đánh giá được thể hiện trong bảng 3.16.

Bảng 3.16. Kết quả xác định độ lặp và độ thu hồi của phương pháp trong phân tích Mg^{2+} và vitamin B₆

Chất phân tích	Nồng độ thêm chuẩn (mg/L)	Nồng độ thu hồi (mg/L)	RSD (%) (n=6)	Độ thu hồi (%)	Độ thu hồi trung bình (%)
Mg^{2+}	50,00	50,50	1,65	101,00	100,42
	100,00	100,40	1,21	100,40	
	150,00	149,80	0,97	99,87	
Vitamin B ₆	20,00	20,20	0,93	101,00	99,81
	40,00	39,50	1,51	98,75	
	60,00	59,80	2,65	99,67	

Từ các kết quả, phương pháp phân tích đã đáp ứng được các yêu cầu về độ chụm và độ đúng. Độ lệch chuẩn tương đối của các chất phân tích $RSD < 3\%$, độ thu hồi 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%) [77].

3.2.3. Phân tích các mẫu thực tế

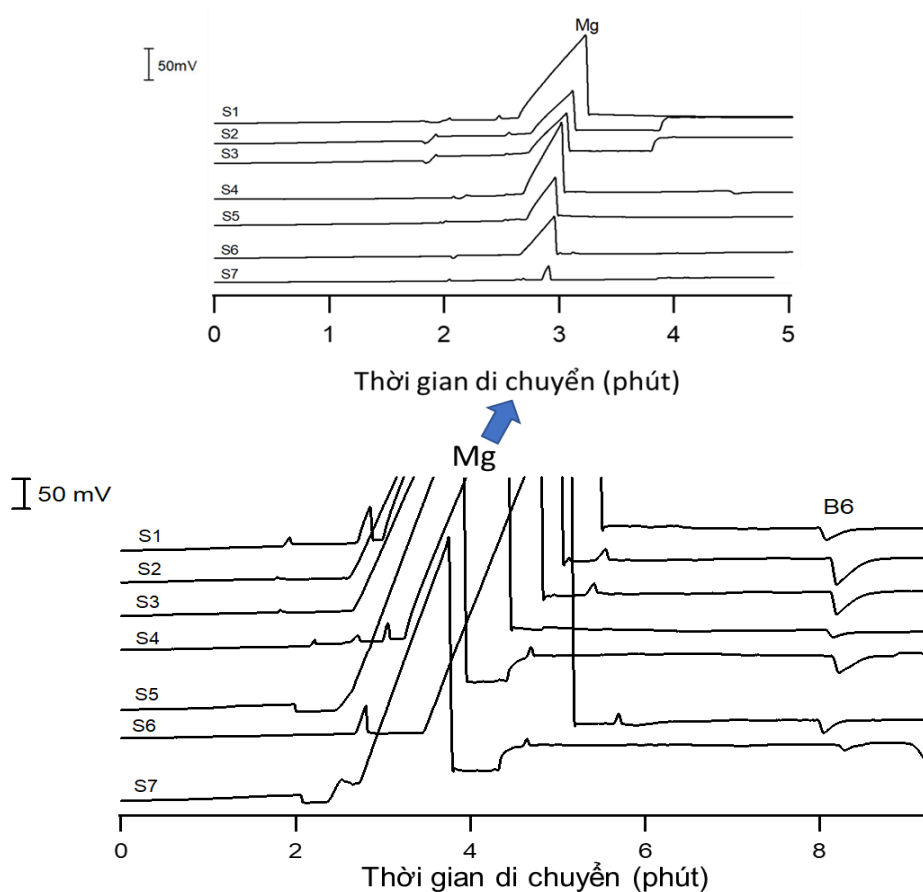
3.2.3.1. Kết quả phân tích magie và vitamin B₆ trong mẫu dược phẩm và TPCN bằng phương pháp CE-C⁴D

Tiến hành phân tích bảy mẫu dược phẩm và TPCN được mua ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Mẫu được chuẩn bị theo quy trình ở mục 2.3.1. Việc xác định sự có mặt của magie và vitamin B₆ có trong các mẫu được thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn. Đối với các mẫu có nồng độ lớn cần pha loãng đến nồng độ thích hợp trước khi tiến hành bơm mẫu vào thiết bị CE-C⁴D. Kết quả thu được như bảng 3.17 và các hình 3.31-3.33.

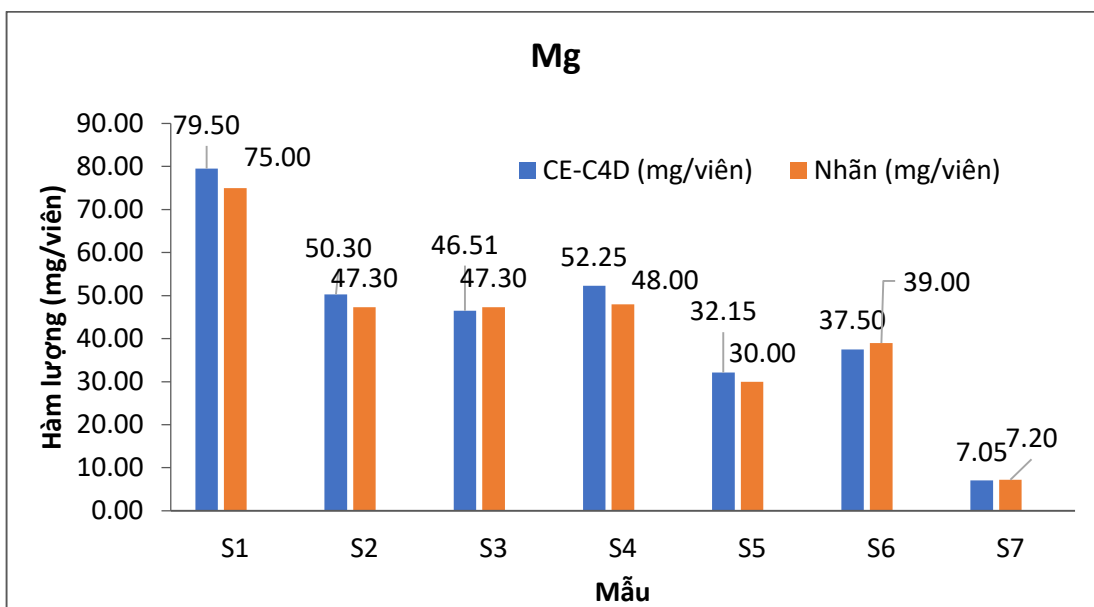
Bảng 3.17. Kết quả xác định hàm lượng vitamin B₆ và magie trong các mẫu dược phẩm và TPCN

STT	Kí hiệu mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D (mg/viên)	Hàm lượng công bố trên nhãn (mg/viên)	Sai khác (%)
1	S1	Mg	79,50	75,00	+6,00
		Vitamin B ₆	3,20	3,10	+3,23
2	S2	Mg	50,30	47,30	+6,34
		Vitamin B ₆	5,35	5,00	+7,00
3	S3	Mg	46,51	47,30	-1,67
		Vitamin B ₆	5,04	5,00	+0,80

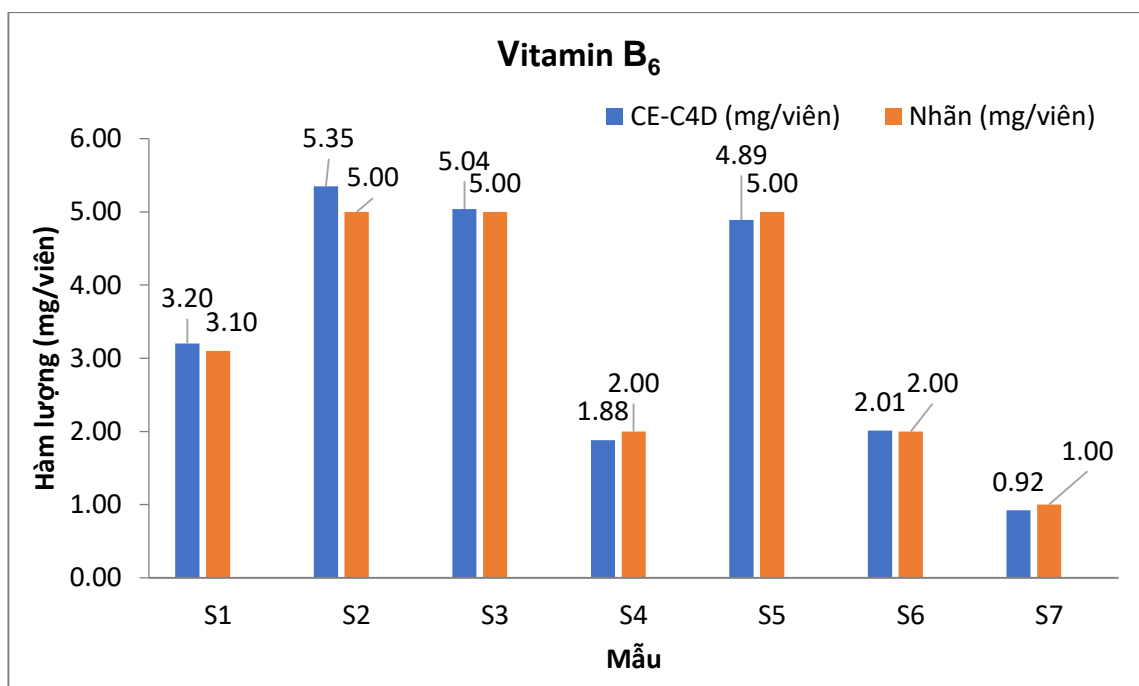
4	S4	Mg	52,25	48,00	+8,85
		Vitamin B ₆	1,88	2,00	-6,00
5	S5	Mg	32,15	30,00	+7,17
		Vitamin B ₆	4,89	5,00	-2,20
6	S6	Mg	37,50	39,00	-3,85
		Vitamin B ₆	2,01	2,00	+0,50
7	S7	Mg	7,05	7,20	-2,08
		Vitamin B ₆	0,92	1,00	-8,00



Hình 3.31. Điện di đồ phân tích Mg²⁺ và vitamin B₆ trong các mẫu dược phẩm và TPCN



Hình 3.32. Đồ thị so sánh hàm lượng Mg trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D



Hình 3.33. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₆ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D

Kết quả cho thấy, hàm lượng magie và vitamin B₆ trong dược phẩm và TPCN phân tích được dao động trong khoảng từ 0,92 mg/viên đến 79,50 mg/viên. So với công bố trên nhãn, hàm lượng này có sự sai khác trong khoảng từ -8,00% đến +8,85%.

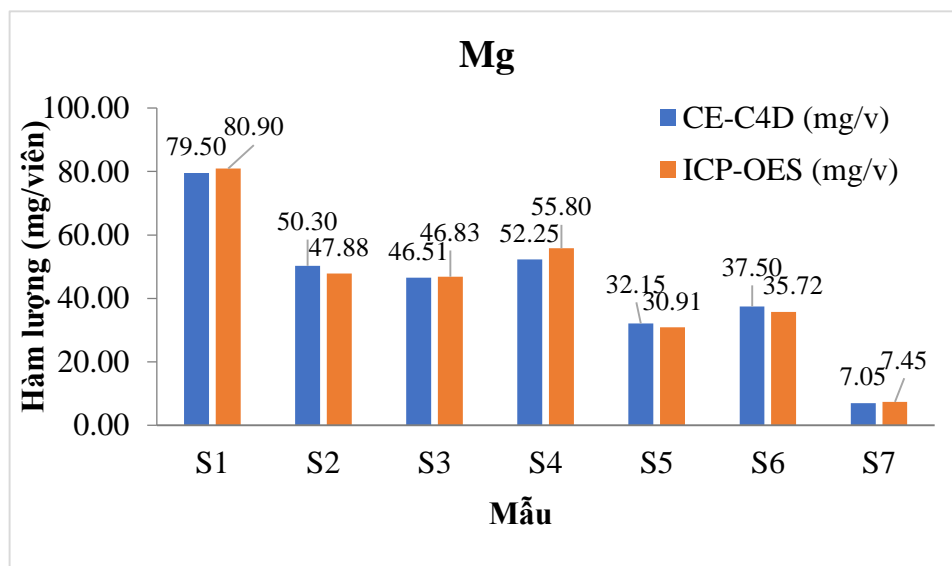
3.2.3.2. Kết quả phân tích đối chứng magie bằng phương pháp ICP-OES và vitamin B₆ bằng phương pháp HPLC-PDA

Việc phân tích đối chứng hàm lượng magie và vitamin B₆ trong các mẫu TPCN và mẫu dược phẩm được thực hiện bằng phương pháp ICP-OES (magie) và phương pháp HPLC-PDA (vitamin B₆). Các điều kiện phân tích của các phương pháp đối chứng được nêu trong mục 2.1.1.2 và phụ lục. Kết quả thu được như trong bảng 3.18.

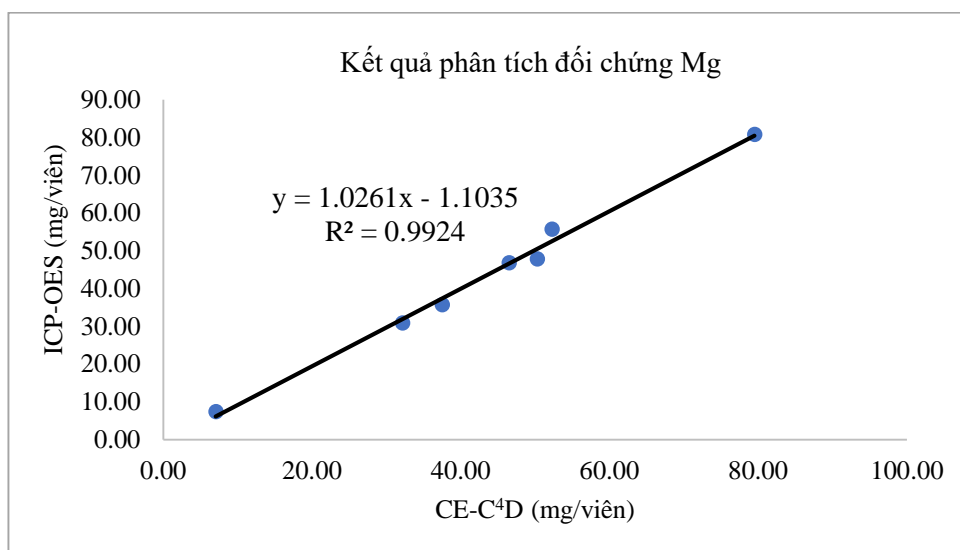
Bảng 3.18. Kết quả phân tích đối chứng hàm lượng các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong các mẫu dược phẩm và thực phẩm chức năng

STT	Kí hiệu mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D (mg/viên)	Hàm lượng phân tích bằng phương pháp đối chứng (mg/viên)	Sai khác (%)
1	S1	Mg	79,50	80,90	-1,73
		B6	3,20	3,01	+6,31
2	S2	Mg	50,30	47,88	+5,05
		B6	5,35	5,12	+4,49
3	S3	Mg	46,51	46,83	-0,68
		B6	5,04	5,18	-2,70
4	S4	Mg	52,25	55,80	-6,36
		B6	1,88	1,95	-3,59
5	S5	Mg	32,15	30,91	+4,01
		B6	4,89	4,74	+3,16
6	S6	Mg	37,50	35,72	+4,98
		B6	2,01	1,97	+2,03
7	S7	Mg	7,05	7,45	-5,37
		B6	0,92	0,98	-6,12

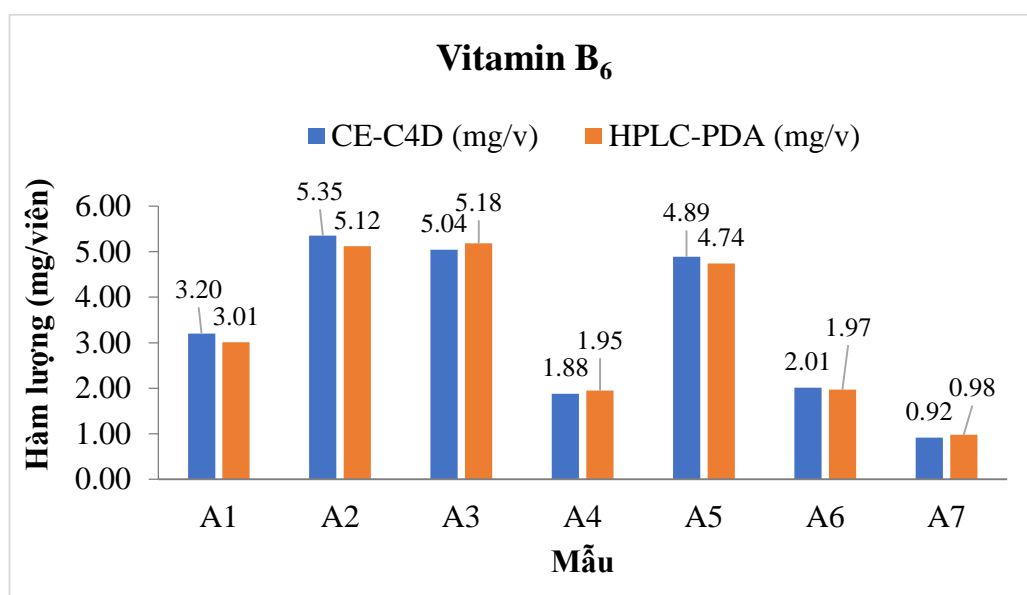
Từ kết quả bảng 3.18 cho thấy, sai khác giữa hai phương pháp dao động trong khoảng -6,36% đến + 6,31%. Tiến hành thiết lập đồ thị tương quan giữa hai phương pháp cho kết quả như trong các hình 3.34- 3.37.



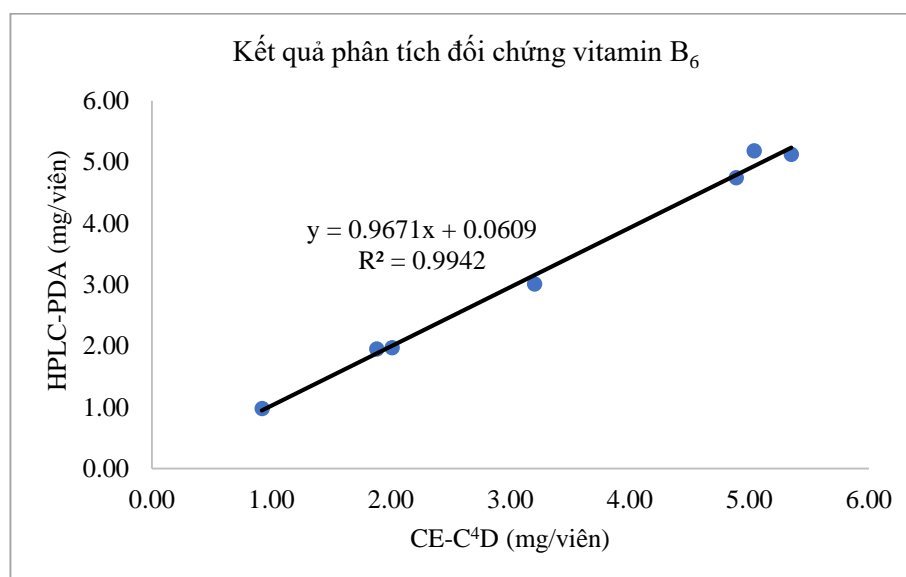
Hình 3.34. Đồ thị so sánh hàm lượng Mg giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng ICP-OES



Hình 3.35. Sự tương quan giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng ICP-OES



Hình 3.36. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₆ giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng HPLC-PDA



Hình 3.37. Sự tương quan giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng HPLC-PDA

Đồ thị hình 3.35 và hình 3.37 cho các hệ số tương quan $R^2 > 0,99$; giá trị P_{value} khi so sánh từng cặp chuẩn theo chuẩn t đều lớn hơn 0,05 (tham khảo phụ lục PL7) cho thấy kết quả phân tích hàm lượng magie và vitamin B₆ bằng phương pháp CE-C⁴D và các phương pháp đối chứng có độ tương quan cao, từ đó cho thấy phương pháp CE-C⁴D đáng tin cậy.

3.3. Xác định đồng thời vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ bằng phương pháp CE-C⁴D

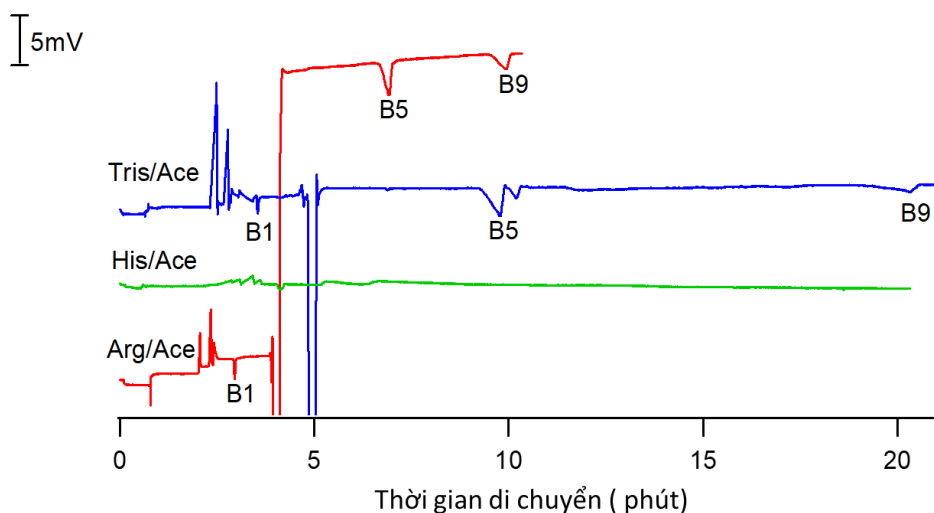
3.3.1. Khảo sát tối ưu điều kiện phân tách và xác định đồng thời vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ bằng phương pháp CE-C⁴D

3.3.1.1. Khảo sát thành phần của dung dịch hệ đệm điện di

Việc khảo sát dung dịch điện ly được thực hiện trên cơ sở sử dụng một hợp phần bazơ thường dùng trong phương pháp CE-C⁴D như Arginine (Arg), Histidine (His), Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) có cùng nồng độ 10 mM và thêm Acetonitrile (ACN) 10% sau đó điều chỉnh đến pH=7,5 bằng acid acetic (Ace). Thực hiện quá trình khảo sát thành phần đệm cùng các điều kiện cố định được nêu ở trên. Công thức cấu tạo của vitamin B₁ có nhóm NH₂ (pK_a = 10,31); vitamin B₅ có nhóm COOH (pK_a= 4,41) và vitamin B₉ có nhóm COOH (pK_a= 4,65) nên khi dung dịch điện ly có pH= 7,5 thì vitamin B₁ tồn tại ở dạng cation (R-NH₃⁺) (do pH < pK_a); vitamin B₅ và vitamin B₉ tồn tại ở dạng anion (R-COO⁻) (do pH > pK_a). Khi đó, nếu tiến hành phân cực dương vitamin B₁ tồn tại ở dạng cation sẽ di chuyển từ cực dương sang cực âm theo chiều của dòng EOF còn vitamin B₅ và vitamin B₉ tồn tại ở dạng anion sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương ngược chiều EOF và được dòng EOF kéo theo. Do đó, vitamin B₁ sẽ xuất hiện trước EOF còn vitamin B₅ và vitamin B₉ sẽ xuất hiện sau EOF. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần đệm đến diện tích pic và thời gian di chuyển được thể hiện trong bảng 3.19 và hình 3.38.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly đến quá trình tách và xác định các vitamin nhóm B

Chất phân tích	Nồng độ (mg/L)	Diện tích pic (m.V.s)		
		His/Ace	Arg/Ace/ACN	Tris/Ace
Vitamin B ₁	100	-	3,46	4,07
Vitamin B ₅	60	-	33,00	57,02
Vitamin B ₉	60	-	24,20	28,04



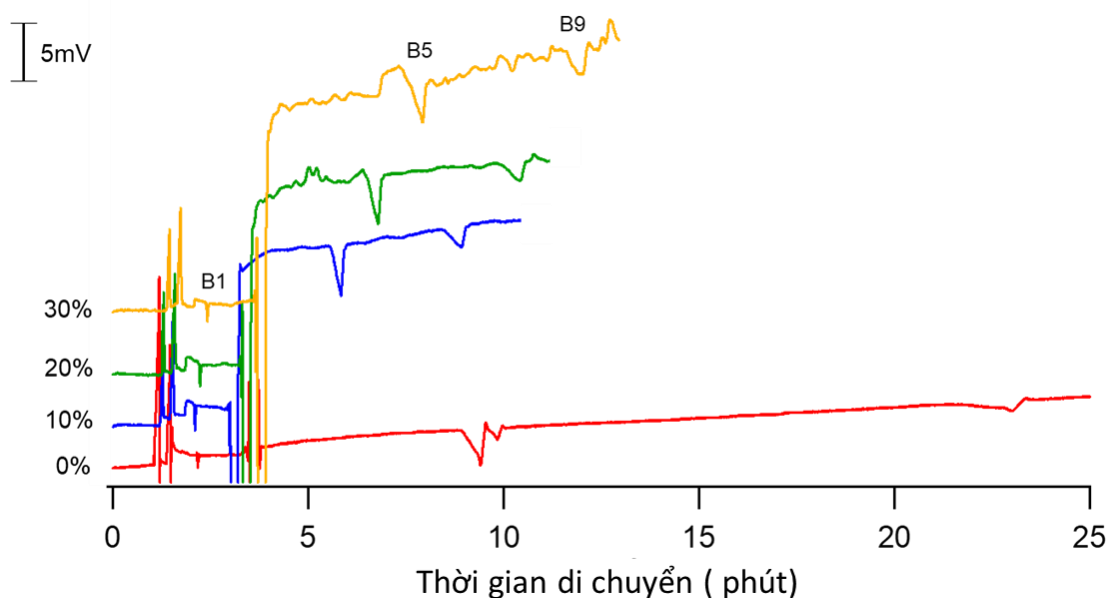
Hình 3.38. Ảnh hưởng của thành phần dung dịch điện ly đến quá trình xác định các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Kết quả cho thấy, không xuất hiện tín hiệu chất phân tích khi đo trên đệm His/Ace. Đối với đệm Tris/Ace, diện tích pic lớn hơn tuy nhiên thời gian phân tích dài và chân pic bị giãn. Có thể thấy rằng, ở hệ đệm Arg/Ace cho hình dáng pic cân đối, tín hiệu tách tương đối tốt, thời gian phân tích hợp lí. Vì vậy, đệm Arg/Ace được chọn làm thành phần đệm tối ưu cho hệ điện di.

Bên cạnh đó, ACN được thêm vào dung dịch điện ly đã lựa chọn (Arg/Ace) để làm giảm độ phân cực của dung dịch điện ly, hòa tan tốt hơn các chất phân tích. Thực hiện quá trình khảo sát tỷ lệ thành phần ACN trong dung dịch điện ly với hệ đệm Arg/Ace 10 mM; pH = 7,5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần đệm đến diện tích pic và thời gian di chuyển được thể hiện trong bảng 3.20 và hình 3.39.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của tỷ lệ đệm đến sự tách và xác định các vitamin nhóm B

Chất phân tích	Nồng độ (mg/L)	Diện tích pic (m.V.s)			
		Acetonitrile 0%	Acetonitrile 10%	Acetonitrile 20%	Acetonitrile 30%
Vitamin B ₁	100	1,61	3,55	3,25	2,99
Vitamin B ₅	60	46,99	33,1	40,79	46,93
Vitamin B ₉	60	34	24,5	26,15	44,6



Hình 3.39. Ảnh hưởng của tỷ lệ đệm đến sự tách và xác định các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

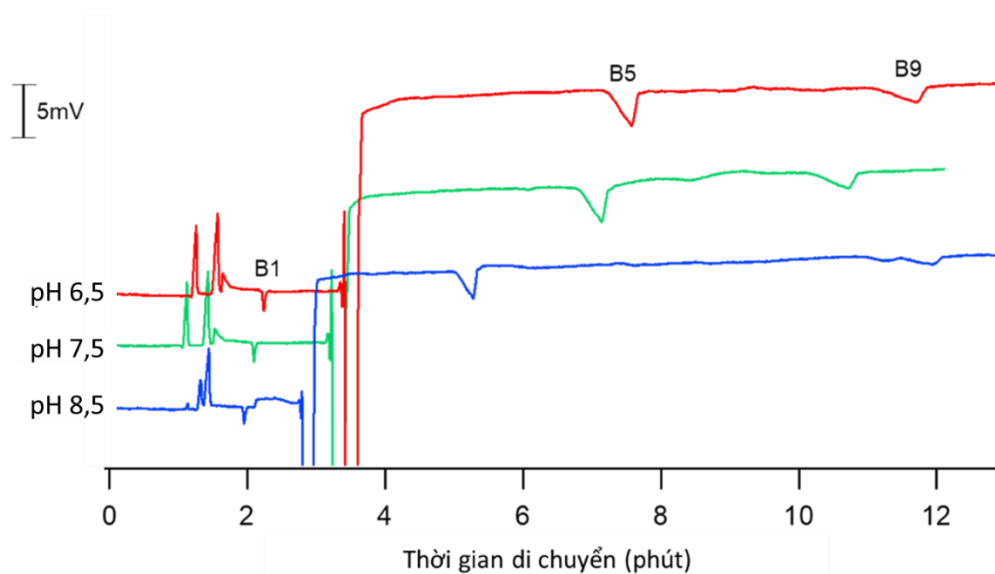
Từ kết quả thu được dễ dàng thấy, khi không thêm ACN thì diện tích pic nhỏ và pic vitamin B₉ không rõ nét. Nên việc thêm ACN là cần thiết để tín hiệu pic ổn định và cân đối hơn. Từ kết quả khảo sát cho thấy hệ đệm Arg/Ace được thêm ACN 10% cho đường nền ổn định và diện tích pic lặp lại qua nhiều lần đo so với đường nền và diện tích pic của hệ đệm Arg/Ace được thêm ACN 20% và thêm ACN 30%. Vì vậy, hệ đệm Arg/Ace được thêm ACN 10% được chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.1.2. Khảo sát pH của dung dịch điện ly

Giá trị pH là yếu tố quyết định trực tiếp đến quá trình phân tách chất. Khi giá trị pH thay đổi, độ điện di của các chất và tốc độ di chuyển của dòng EOF cũng thay đổi. Vì thế, mỗi chất sẽ có một khoảng pH mà tại đó hiệu quả tách sẽ tốt nhất. Việc khảo sát pH được thực hiện trong khoảng pH từ 6,5 đến 8,5. Các giá trị pH khảo sát là pH = 6,5; pH = 7,5; pH = 8,5 với thời gian bơm mẫu là 30 s cùng các điều kiện cố định như đã nêu ở trên. Giá trị pH được chỉnh bằng máy đo pH và thêm từ từ dung dịch acid acetic đến giá trị mong muốn. Các kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH đến diện tích pic và thời gian di chuyển được thể hiện trong bảng 3.21 và hình 3.40.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của pH đến quá trình tách và xác định các vitamin nhóm B

Chất phân tích	Nồng độ (mg/L)	pH = 6,5		pH = 7,5		pH = 8,5	
		S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)
Vitamin B ₁	100	3,22	2,4	3,5	2,28	2,95	2,05
Vitamin B ₅	60	35,78	7,6	32,9	6,2	25,05	5,5
Vitamin B ₉	60	30,4	11,1	24,57	10,6	20,69	12,2



Hình 3.40. Ảnh hưởng của pH đến sự tách và xác định vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Kết quả khảo sát cho thấy, khi phân cực theo chiều dương (áp thế dương ở đầu bơm mẫu) thì vitamin B₁ di chuyển ra trước dòng EOF, còn vitamin B₅ và vitamin B₉ di chuyển ra sau EOF (về nguyên tắc khi phân cực dương các ion âm không phân tích được, tuy nhiên chất phân tích có độ linh động thấp, ở gần EOF nên được nó kéo theo). Khi quá trình điện di được thực hiện, ở pH lớn hơn pK_a chất phân tích sẽ tồn tại ở dạng ion âm, ngược lại nếu quá trình điện di thực hiện ở pH thấp hơn giá trị pK_a chất sẽ tồn tại ở dạng ion dương nên vitamin B₁ có pK_a = 10,3 (nhóm –NH₂) mang điện tích dương, vitamin B₅ có pK_a = 4,41 (nhóm –COOH), vitamin B₉ có pK_{a1} = 4,65 (nhóm –COOH) mang điện tích âm. Từ kết quả khảo sát cho thấy, giá trị pH

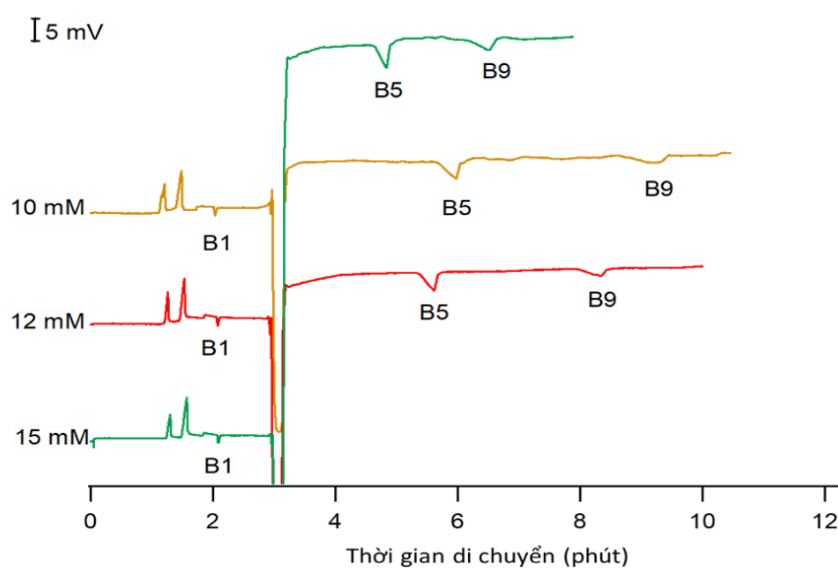
tăng thì thời gian phân tích giảm đồng thời diện tích pic cũng giảm. Tại pH = 8,5 tín hiệu chất không ổn định. So sánh kết quả khảo sát thu được với các giá trị trên tại pH = 7,5 cho tín hiệu pic tương đối tốt, tín hiệu nền ổn định, thời gian phân tích hợp lý, diện tích pic lớn. Do vậy, pH = 7,5 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.1.3. Khảo sát nồng độ dung dịch điện ly

Ngoài pH, nồng độ đệm cũng ảnh hưởng lớn đến kết quả phân tích điện di. Trong phương pháp CE-C⁴D, nồng độ đệm cần đủ lớn để tạo môi trường điện di ổn định nhưng nếu lớn quá sẽ tạo độ dẫn lớn làm ảnh hưởng độ nhạy của detector C⁴D. Các kết quả khảo sát được thể hiện trong bảng 3.22 và hình 3.41.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ đệm đến sự tách và xác định các vitamin B

Chất phân tích	Nồng độ (mg/L)	10 mM Arg/Ace/ACN		12 mM Arg/Ace/ACN		15 mM Arg/Ace/ACN	
		S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)
Vitamin B ₁	100	3,28	2,23	3,4	2,25	3,2	2,1
Vitamin B ₅	60	34,56	6,65	32,3	6,05	36,09	4,8
Vitamin B ₉	60	38,58	9,9	24,5	8,9	33,83	6,8

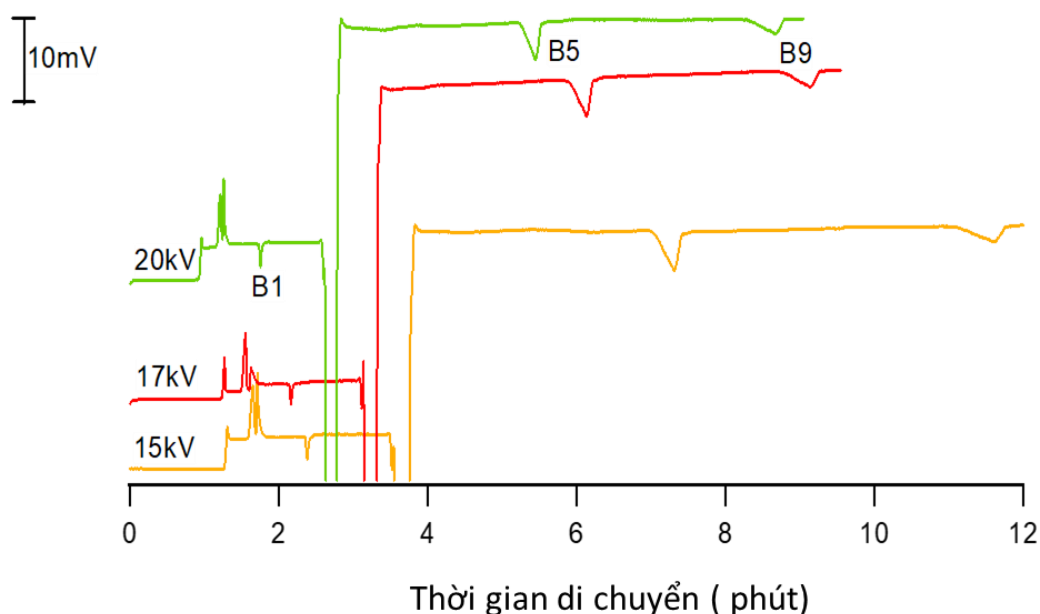


Hình 3.41. Ảnh hưởng của nồng độ đệm đến sự tách và xác định vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Trong nghiên cứu, hệ đệm Arg/Ace có các nồng độ 10 mM, 12 mM, 15 mM + ACN 10%; pH = 7,5 được tiến hành khảo sát. Các điều kiện thực hiện thí nghiệm cố định như trên, thời gian bơm mẫu 30 s. Kết quả khảo sát thu được cho thấy nồng độ đệm 10 mM cho tín hiệu pic lớn nhưng đường nền không ổn định và bị giãn chân pic, ngoài ra thời gian phân tích dài. Đối với nồng độ 15 mM thời gian phân tích ra nhanh tuy nhiên đường nền không ổn định và chân pic bị dãn. Có thể thấy rằng, ở nồng độ Arg 12 mM cho hình dáng pic cân đối, tín hiệu tách tương đối tốt, thời gian phân tích hợp lí. Vì vậy, nồng độ Arg 12 mM được chọn là nồng độ tối ưu cho hệ điện di.

3.3.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Ba giá trị thế tách đã được lựa chọn để khảo sát là: +15 kV, +17 kV và +20 kV. Trong quá trình khảo sát các điều kiện khác được giữ cố định. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thế tách đến diện tích pic và thời gian di chuyển được thể hiện trong hình 3.42 và bảng 3.23.



Hình 3.42. Ảnh hưởng của thế điện trường đến sự phân tách các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của thế đến việc xác định các vitamin nhóm B

Chất phân tích	Nồng độ (mg/L)	15 kV		17 kV		20 kV	
		S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)
Vitamin B ₁	100	3,7	2,50	3,45	2,22	3,4	1,92
Vitamin B ₅	60	42,77	7,46	33,7	6,2	29,88	5,6
Vitamin B ₉	60	39,19	11,76	27,2	8,65	20,89	8,45

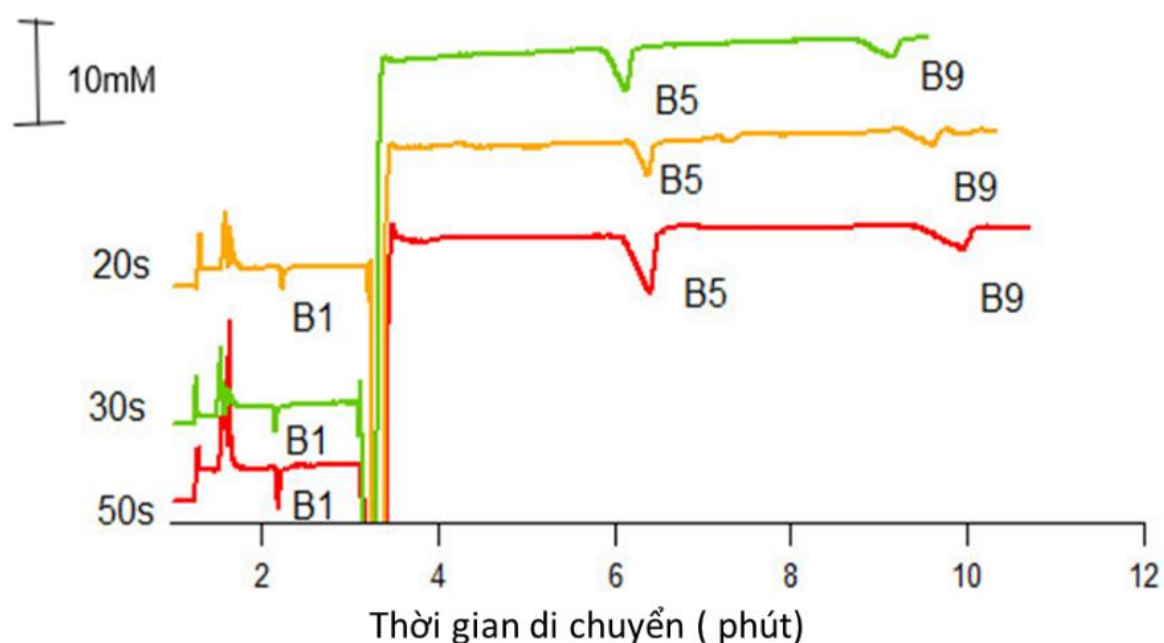
Từ kết quả khảo sát thu được cho thấy, tín hiệu các chất ra tốt tuy nhiên thế tách càng tăng thì chất ra càng nhanh và diện tích pic giảm. Khi thế tách ở giá trị +15 kV và +20 kV pic của chất ra không đều và đẹp như ở giá trị thế tách bằng +17 kV. Ở thế tách +15 kV diện tích lớn nhưng thời gian phân tích lâu và pic không cân đối. Tại thế bằng +17 kV thu được pic đều nhất, tín hiệu nền ổn định, diện tích pic lớn, thời gian phân tích hợp lý. Vì vậy, thế tách bằng +17 kV được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.3.1.5. Khảo sát thời gian bơm mẫu

Trong quá trình bơm mẫu, tùy vào thời gian bơm sẽ cho ra diện tích pic khác nhau, thời gian bơm càng lâu thì diện tích pic càng lớn. Khảo sát được thực hiện với các giá trị thời gian là 20 s, 30 s, 50 s cùng các điều kiện cố định trong tất cả các thí nghiệm là dung dịch điện ly Arg 12 mM/ Ace + ACN 10%; pH = 7,5. Kết quả thể hiện ở bảng 3.24 và hình 3.43 cho thấy, thời gian bơm mẫu tăng thì diện tích pic càng tăng. Điều này hoàn toàn phù hợp vì khi tăng thời gian bơm mẫu thì lượng mẫu bơm vào mao quản cũng tăng, do đó tín hiệu chất phân tích tốt. Dễ dàng thấy được, thời gian bơm mẫu là 30 s cho tín hiệu tốt và đường nền tương đối ổn định, tại thời bơm mẫu là 40 s chân pic bị rộng còn đối với thời gian bơm mẫu 20 s, tín hiệu cho độ nhạy chưa cao. Do đó, thời gian bơm mẫu được lựa chọn là 30 s cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến sự tách và xác định các vitamin B

Chất phân tích	Nồng độ (mg/L)	20s		30s		50s	
		S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)	S _{pic} (mV.s)	t _{dc} (phút)
Vitamin B ₁	100	2,74	2,25	3,6	2,22	6,32	2,3
Vitamin B ₅	60	23	6,35	32,5	6,15	59,5	6,42
Vitamin B ₉	60	19,62	9,65	25,3	9,2	39,23	9,95



Hình 3.43. Ảnh hưởng của thời gian bơm mẫu đến sự tách và xác định vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉

Qua các khảo sát thu được điều kiện tối ưu cho quá trình phân tích đồng thời các vitamin B bằng phương pháp điện di mao quản CE-C⁴D như trong bảng 3.25.

Bảng 3.25. Điều kiện tối ưu xác định các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉

Các yếu tố	Điều kiện lựa chọn
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 50 cm, chiều dài hiệu dụng là 30 cm, đường kính trong là 50 μm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phong
Chiều cao bơm mẫu	15 cm
Thời gian bơm mẫu	30 s
Dung dịch điện ly	Arg 12 mM/ Ace + ACN 10%; pH = 7,5
Thế tách	+17 kV

3.3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

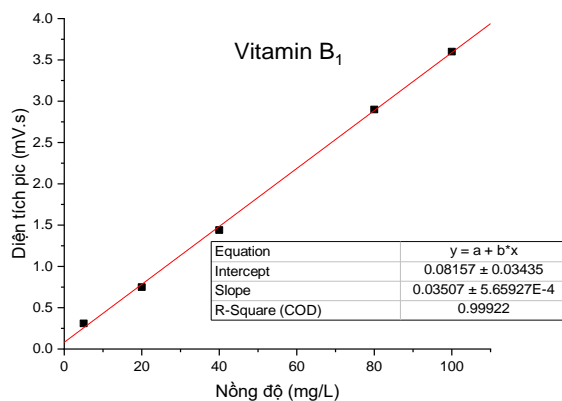
3.3.2.1. Đường chuẩn xác định các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Các dung dịch để dựng đường chuẩn được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc. Các dung dịch này có nồng độ biến thiên đối với vitamin B₁ trong khoảng 5 mg/L đến 100 mg/L, đối với vitamin B₅ từ 3 mg/L đến 100 mg/L và vitamin B₉ từ 10 mg/L đến 150 mg/L. Mỗi dung dịch được đo lặp lại 3 lần và tiến hành theo các điều kiện đã tối ưu ở bảng 3.25. Đường chuẩn được xây dựng trên cơ sở sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ. Các kết quả được trình bày trong bảng 3.26.

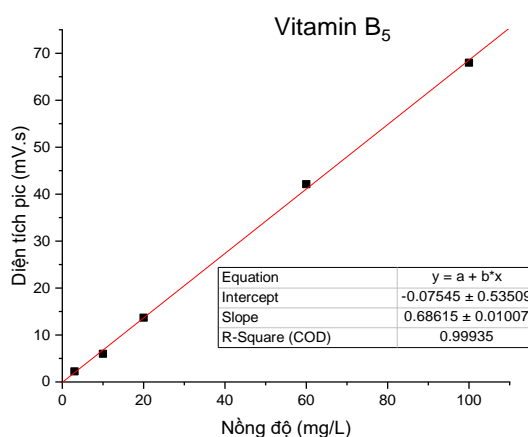
Bảng 3.26. Sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

STT	Vitamin B ₁		Vitamin B ₅		Vitamin B ₉	
	Nồng độ (mg/L)	S _{pic} (mV.s)	Nồng độ (mg/L)	S _{pic} (mV.s)	Nồng độ (mg/L)	S _{pic} (mV.s)
1	5,00	0,31	3,00	2,25	10,00	4,20
2	20,00	0,75	10,00	6,00	20,00	8,70
3	40,00	1,44	20,00	13,70	60,00	24,60
4	80,00	2,90	60,00	42,11	100,00	39,70
5	100,00	3,60	100,00	67,99	150,00	61,00

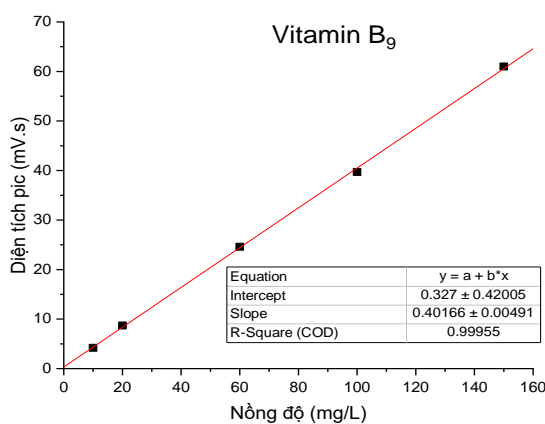
Kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số hồi quy tương ứng được trình bày ở hình 3.44-3.46 và bảng 3.27.



Hình 3.44. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B₁



Hình 3.45. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B₅



Hình 3.46. Đường chuẩn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ vitamin B₉

Bảng 3.27. Kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số hồi qui

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R	P
Vitamin B ₁	$Y = (0,03507 \pm 0,00057)X + (0,08157 \pm 0,03435)$	0,9992	< 0,001
Vitamin B ₅	$Y = (0,68615 \pm 0,01007)X + (-0,07545 \pm 0,53509)$	0,9994	< 0,001
Vitamin B ₉	$Y = (0,40166 \pm 0,00491)X + (0,32700 \pm 0,42005)$	0,9996	< 0,001

Kết quả thu được cho thấy, đường chuẩn của vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ có hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ tốt ($R^2 > 0,999$), đồng thời các giá trị $P < 0,001$ (đối với cả 3 chất phân tích) chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính. Tính theo thống kê giá trị P_{value} của vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ lần lượt là 0,098; 0,897 và 0,493 (tham khảo phụ lục PL6) đều lớn hơn 0,05 nên phương pháp không mắc sai số hệ thống.

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

Tiến hành xác định giới hạn phát hiện (LOD) bằng cách pha loãng dần dung dịch chuẩn của vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ tới nồng độ nhỏ nhất mà tín hiệu cho tỷ số $S/N = 3$. Giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ nhỏ nhất mà tín hiệu cho tỷ số $S/N = 10$. Cụ thể, kết quả thu được trong bảng 3.28.

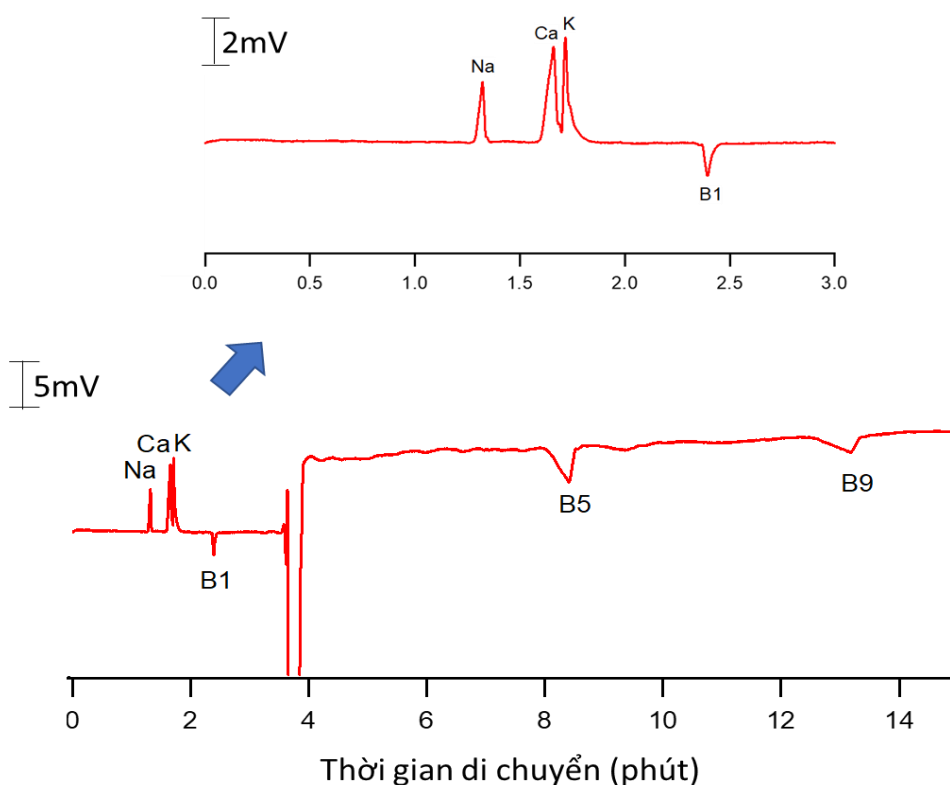
Bảng 3.28. Kết quả khảo sát LOD

Chất phân tích	Chiều cao pic (S) (mV)	Tín hiệu nhiễu nền (N) (mV)	S/N	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Vitamin B ₁	0,06	0,02	3,00	1,50	4,95
Vitamin B ₅	0,39	0,12	3,25	1,00	3,33
Vitamin B ₉	0,25	0,08	3,13	3,00	9,90

Như vậy, giới hạn phát hiện (LOD) của vitamin B₁ là 1,50 mg/L, vitamin B₅ là 1,00 mg/L và vitamin B₉ là 3,00 mg/L. Giới hạn định lượng của vitamin B₁ là 4,95 mg/L, vitamin B₅ là 3,33 mg/L và vitamin B₉ là 9,90 mg/L.

3.3.2.3. Đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

Sự có mặt của các cation Na, Ca, K (50 ppm) cùng với các vitamin B₁, B₃, B₅, B₆, B₉ (100 ppm) được khảo sát. Kết quả thu được như điện di đồ hình 3.47 cho thấy sự xuất hiện của các kim loại Na, Ca, K ở rất xa so với vitamin B₁ và không thấy xuất hiện các vitamin B₃, B₆ cho thấy phương pháp phân có độ đặc hiệu tốt.



Hình 3.47. Điện di đồ độ đặc hiệu của phương pháp phân tích đồng thời vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

3.3.2.4. Đánh giá độ chụm (độ lặp) và độ đúng (độ thu hồi) của phương pháp

Độ lặp và độ thu hồi của phương pháp được tiến hành như trong mục 2.4.2. Kết quả đánh giá được thể hiện trong bảng 3.29.

Bảng 3.29. Độ lặp và độ thu hồi của phương pháp trong xác định hàm lượng các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Chất phân tích	Nồng độ thêm chuẩn (mg/L)	Nồng độ thu hồi (mg/L)	RSD (%) (n=6)	Độ thu hồi (%)	Độ thu hồi trung bình (%)
Vitamin B ₁	20,00	19,80	1,50	99,00	99,78
	40,00	40,40	0,90	101,00	
	60,00	59,60	0,87	99,33	
Vitamin B ₅	20,00	20,40	1,93	102,00	100,97
	40,00	40,50	1,87	101,25	
	60,00	59,80	2,28	99,67	
Vitamin B ₉	20,00	20,50	1,16	102,50	100,80
	50,00	49,70	0,83	99,40	
	100,00	100,50	0,61	100,50	

Kết quả cho thấy, phương pháp phân tích đã đáp ứng được các yêu cầu về độ chụm và độ đúng. Độ lệch chuẩn tương đối của các chất phân tích RSD < 3%, độ thu hồi trong khoảng 99,00-102,50%. Như vậy, phương pháp có độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC (với mức nồng độ từ trên 10 mg/L tới 100 mg/L, độ thu hồi nằm trong khoảng 80-110%) [77].

3.3.3. Phân tích vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong mẫu thực phẩm chức năng

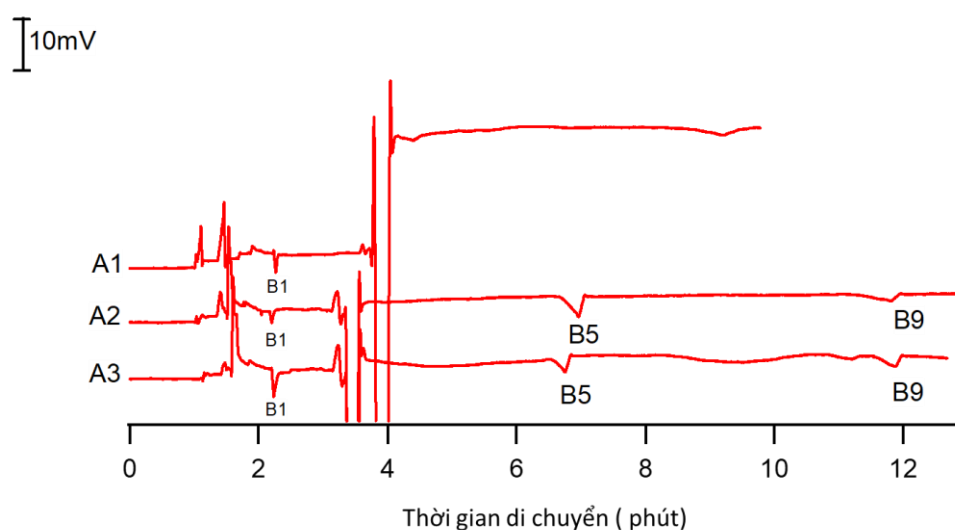
3.3.3.1. Kết quả phân tích vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong mẫu TPCN bằng phương pháp CE-C⁴D

Tiến hành phân tích 3 mẫu TPCN được mua ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Mẫu được chuẩn bị theo quy trình ở mục 2.3.1. Việc xác định sự có mặt của vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ có trong các mẫu được thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn. Đối với các mẫu có nồng độ lớn cần pha loãng đến nồng độ thích hợp

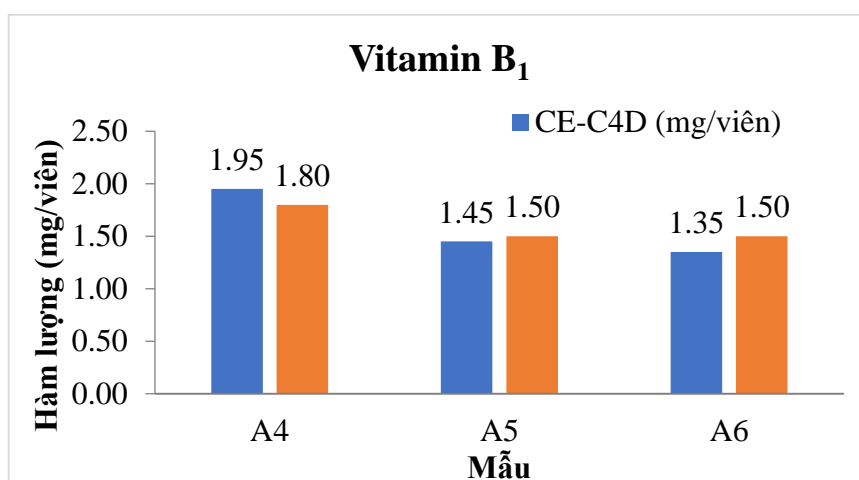
trước khi tiến hành bơm mẫu vào thiết bị CE-C⁴D. Kết quả thu được như bảng 3.30 và các hình 3.48-3.51.

Bảng 3.30. Kết quả phân tích hàm lượng vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong mẫu TPCN bằng phương pháp CE-C⁴D

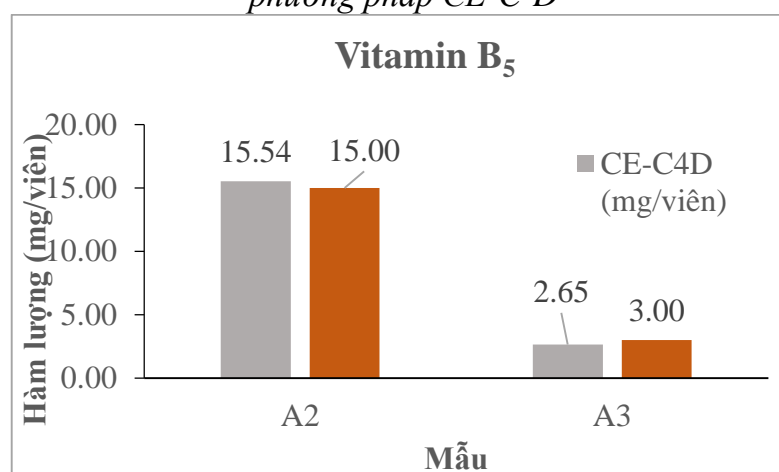
STT	Kí hiệu mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D (mg/viên)	Hàm lượng công bố trên nhãn (mg/viên)	Sai khác (%)
1	A1	Vitamin B ₁	1,95	1,80	+8,33
2	A2	Vitamin B ₁	1,45	1,50	-3,33
		Vitamin B ₅	15,54	15,00	+3,60
		Vitamin B ₉	0,45	0,40	+12,50
3	A3	Vitamin B ₁	1,35	1,50	-10,00
		Vitamin B ₅	2,65	3,00	-11,67
		Vitamin B ₉	0,92	1,00	-8,30



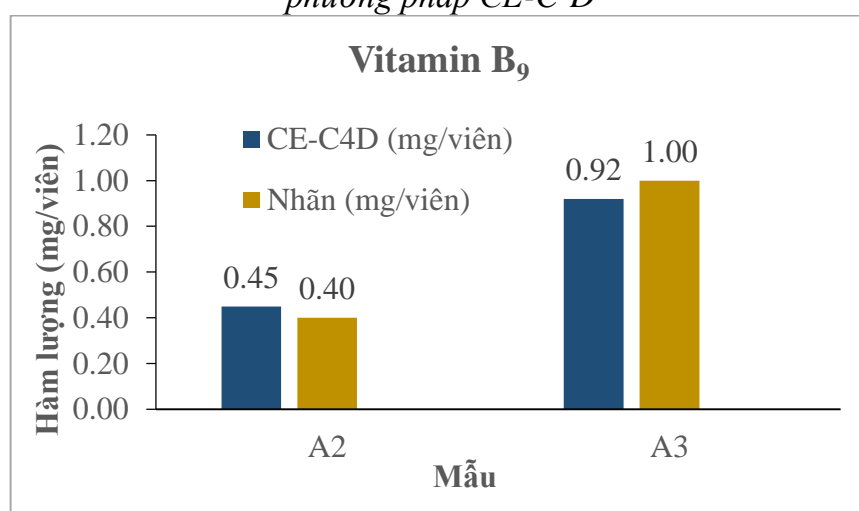
Hình 3.48. Điện di đồ phân tích các vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong các mẫu thực phẩm chức năng



Hình 3.49. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₁ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D



Hình 3.50. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₅ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D



Hình 3.51. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₉ trên nhãn và phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D

Kết quả cho thấy, hàm lượng vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ trong TPCN phân tích được dao động trong khoảng từ 0,45 mg/viên đến 15,54 mg/viên. So với công bố trên nhãn, hàm lượng này có sự sai khác trong khoảng từ -11,67% đến +12,50%.

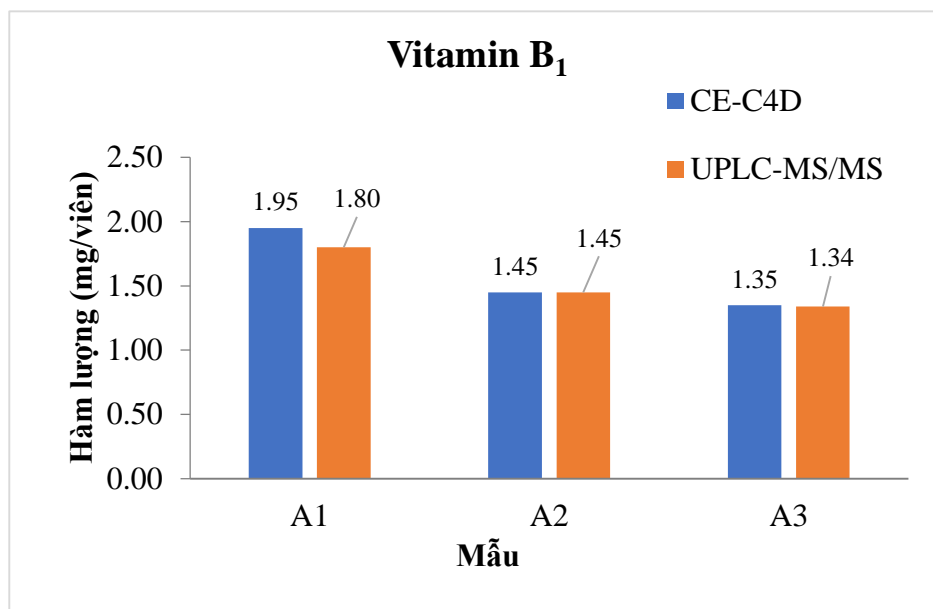
3.3.3.2. Kết quả phân tích đối chứng vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong mẫu TPCN bằng phương pháp UPLC-MS/MS

Việc phân tích đối chứng hàm lượng các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ trong các mẫu TPCN được thực hiện bằng phương pháp UPLC-MS/MS do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia thực hiện (số hiệu Vilas 203, mã phương pháp xác định vitamin B₅: NIFC.02.M.19 (AOAC2012.16), mã phương pháp xác định vitamin B₉: NIFC.02.M.18 (AOAC 2013.13)). Phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS sử dụng cột sắc ký lỏng ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm), 130 Å, pha động A (amoni fomat 10 mM) và B (metanol) (chi tiết tham khảo phụ lục). Kết quả thu được trong bảng 3.31.

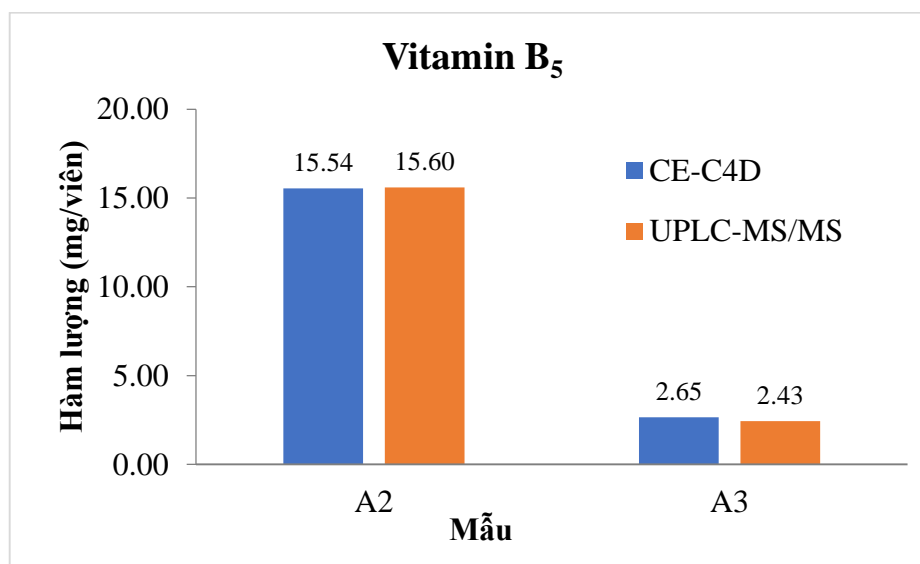
Bảng 3.31. Kết quả phân tích đối chứng bằng phương pháp UPLC-MS/MS

STT	Kí hiệu mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng phân tích bằng CE-C ⁴ D (mg/viên)	Hàm lượng phân tích bằng UPLC (mg/viên)	Sai khác (%)
1	A1	Vitamin B ₁	1,95	1,80	+8,33
2	A2	Vitamin B ₁	1,45	1,45	+0,00
		Vitamin B ₅	15,54	15,60	-0,38
		Vitamin B ₉	0,45	0,50	-10,00
3	A3	Vitamin B ₁	1,35	1,34	+0,75
		Vitamin B ₅	2,65	2,43	+9,05
		Vitamin B ₉	0,92	0,93	-1,08

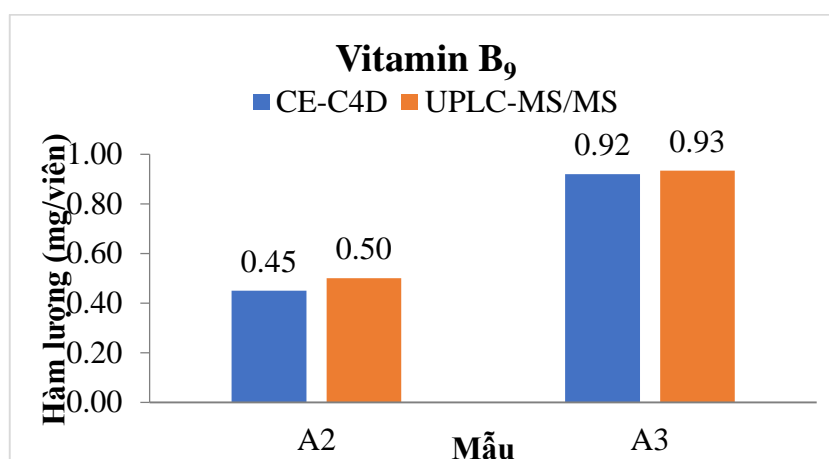
Các kết quả phân tích được trình bày trong bảng 3.7 cho thấy, sai khác giữa hai phương pháp dao động trong khoảng -10,00% đến + 9,05%. Tiến hành thiết lập đồ thị tương quan giữa hai phương pháp cho kết quả như trong các hình 3.52-3.55.



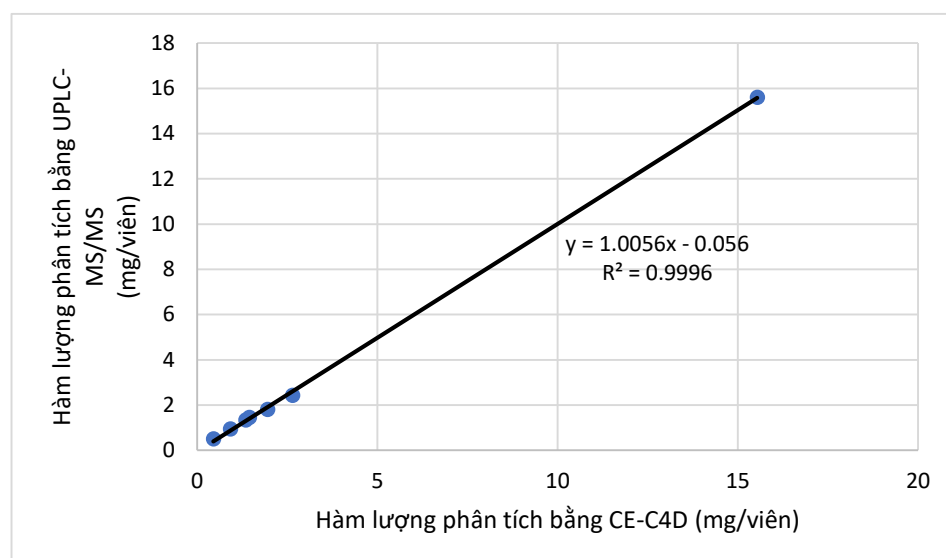
Hình 3.52. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₁ giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLS-MS/MS



Hình 3.53. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₅ giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLS-MS/MS



Hình 3.54. Đồ thị so sánh hàm lượng vitamin B₉ giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS



Hình 3.55. Sự tương quan giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS

Đồ thị hình 3.55 có hệ số tương quan $R^2 = 0,9996$ cho thấy kết quả phân tích hàm lượng các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ bằng hai phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS có độ tương quan cao, giá trị P_{value} khi so sánh từng cặp chuẩn theo chuẩn t đều lớn hơn 0,05 (tham khảo phụ lục PL7) cho thấy phương pháp CE-C⁴D là đáng tin cậy. Từ đó chứng tỏ phương pháp CE-C⁴D phù hợp và có tiềm năng để phân tích hàm lượng vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ trong mẫu thực phẩm chức năng.

KẾT LUẬN

Với mục tiêu đặt ra là nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích glucosamin và một số vitamin trong dược phẩm, thực phẩm chức năng, luận án đã thành công trong việc phát triển 3 quy trình phân tích: phân tích đồng thời glucosamin với canxi (phụ lục PL.8), phân tích đồng thời vitamin B₆ với magie (phụ lục PL.9) và phân tích đồng thời vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ (phụ lục PL.10) thu được các kết quả như sau:

1. Đã tối ưu được các điều kiện phân tích để xác định đồng thời các nhóm chất bằng phương pháp CE-C⁴D:

- Điều kiện phân tích để xác định đồng thời glucosamin và canxi: detector C⁴D; dung dịch điện ly Ace 200 mM; chiều dài mao quản 50 cm; chiều dài hiệu dụng là 35 cm; đường kính trong 50 μm; phương pháp bơm mẫu: thủy động học kiểu xi phong ở độ cao 10 cm trong 20 s và thế điện di là + 15kV.

- Điều kiện phân tích để xác định đồng thời vitamin B₆ và magie: detector C⁴D, dung dịch điện ly: đệm Arg 10 mM/ Ace + ACN 20% ; pH=5,0; tổng chiều dài mao quản 55 cm; chiều dài hiệu dụng 40 cm; đường kính trong ID 50 μm; phương pháp bơm mẫu: thủy động học kiểu xi phong ở độ cao 20 cm trong 25 s và thế điện di là + 20 kV.

- Điều kiện phân tích để xác định đồng thời các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉: detector C⁴D; dung dịch điện ly: đệm Arg 12 mM/ Ace + ACN 10%; pH = 7,5; chiều dài mao quản 50 cm; chiều dài hiệu dụng là 30 cm; đường kính trong 50 μm; phương pháp bơm mẫu: thủy động học kiểu xi phong ở độ cao 15 cm trong 30 s và thế điện di là + 17 kV.

2. Đã xác nhận được giá trị sử dụng của phương pháp: Xây dựng các đường chuẩn với các giá trị hệ số tương quan $R^2 > 0,99$, độ lệch chuẩn tương đối RSD < 3,0; giới hạn phát hiện (LOD) của canxi là 0,05 mg/L và glucosamin là 0,50 mg/L; giới hạn phát hiện (LOD) của vitamin B₆ là 1,00 mg/L và magie là 0,10 mg/L; giới hạn

phát hiện (LOD) của vitamin B₁ là 1,50 mg/L, vitamin B₅ là 1,00 mg/L, vitamin B₉ là 3,00 mg/L. Độ thu hồi trung bình trong khoảng từ 92,0% đến 106,0%;

3. Đã áp dụng phương pháp để phân tích đồng thời hàm lượng các chất có tính chất hoàn toàn khác nhau: glucosamin và canxi trong 14 mẫu thực phẩm chức năng; hàm lượng vitamin B₆ và magie trong 7 mẫu dược phẩm và TPCN và hàm lượng vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉ trong 3 mẫu thực phẩm chức năng, cho kết quả sai khác so với nhãn công bố trong khoảng -11,67% đến +12,50% góp phần công bố 03 bài báo quốc tế. Đã tiến hành phân tích đối chứng với các phương pháp tiêu chuẩn cho kết quả có độ sai khác đều dưới 10% cho thấy phương pháp CE-C⁴D đáng tin cậy.

CÔNG BỐ KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Quang Huy Nguyen**, Anh Quoc Hoang, Thi My Hanh Truong, Thi Diu Dinh, Thi Thuy Le, Thi Huyen Trang Luu, Viet Chien Dinh, Thi Minh Thu Nguyen, Thi Trang Vu, Thi Anh Huong Nguyen (2021), "Development of Simple Analytical Method for B-Group Vitamins in Nutritional Products: Enzymatic Digestion and UPLC-MS/MS Quantification", Journal of Analytical Methods in Chemistry, vol. 2021, Article ID 5526882, 10 pages.
2. Phạm Thị Mai Hương, Trương Thị Mỹ Hạnh, Đặng Thị Huyền My, Vũ Thị Trang, Cao Công Khánh, Hoàng Quốc Anh, Mai Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Minh Thư, **Nguyễn Quang Huy**, Nguyễn Thị Ánh Hường (2022), "Xác định glucosamin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector huỳnh quang (HPLC-FLD)", Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm, Tập 5, Số 1, tr. 11-24.
3. Đặng Thị Huyền My, Nguyễn Thị Ngọc Ly, Đỗ Yến Nhi, Vũ Tùng Lâm, Đinh Thị Dịu, Kiều Thị Lan Phương, Hoàng Quốc Anh, Trần Cao Sơn, Nguyễn Thị Minh Thư, **Nguyễn Quang Huy**, Nguyễn Thị Ánh Hường (2022), "Xác định glucosamin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp CE-C⁴D", Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm, Tập 5, Số 3, tr. 243-255.
4. Thi Huyen My Dang, Anh Quoc Hoang, **Quang Huy Nguyen**, Dinh Chi Le, Thanh Duc Mai, Yen Nhi Do, Van Anh Kieu, Cong Khanh Cao, Thi Minh Hien Lu, Thi Minh Thu Nguyen, Bach Pham, Thi Anh Huong Nguyen (2022), "Simultaneous determination of vitamin B6 and magnesium using capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection: Method development, validation, and application to pharmaceutical and nutraceutical samples", Journal of Chromatography B, Vol. 1210, 123471.
5. Đặng Thị Huyền My, **Nguyễn Quang Huy**, Mai Thị Thanh Tâm, Lê Đức Dũng, Phạm Hoàng Nguyên, Phạm Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Minh Thư, Nguyễn Thị Ánh Hường (2022), "Xác định đồng thời hàm lượng một số vitamin nhóm B bằng

phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D)”,
Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới, Số 26, tr. 137-147.

6. **Quang Huy Nguyen**, Thi Huyen My Dang, Thi Phuong Quynh Le, Thi Huyen Trang Luu, Thi Diu Dinh, Trong Khoa Mai, Thi Minh Thu Nguyen, Thi Anh Huong Nguyen, Thanh Duc Mai (2023), “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. 115, 104882.
7. Yen Nhi Do, Thi Lan Phuong Kieu, Thi Huyen My Dang, **Quang Huy Nguyen**, Thu Hien Dang, Cao Son Tran, Anh Phuong Vu, Thi Trang Do, Thi Ngan Nguyen, Son Luong Dinh, Thi Minh Thu Nguyen, Thi Ngoc Mai Pham, Anh Quoc Hoang, Bach Pham, Thi Anh Huong Nguyen (2023), “Green analytical method for simultaneous determination of glucosamin and calcium in dietary supplements by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2023, Article ID 2765508, 10 pages.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Lê Thị Hồng Hào, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hương, Nguyễn Văn Anh, Phạm Tiến Đức, Vũ Thị Trang (2016), *Ứng dụng phương pháp điện di trong phân tích thực phẩm*, Nhà Xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
3. Nguyễn Thị Ánh Hương (2010), *Nghiên cứu xác định các dạng Asen vô cơ trong nước ngầm bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc*, Luận án Tiến sĩ Hóa học, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Hà Nội.
4. Phạm Thị Thanh Hà, Phan Mai Phương và Nguyễn Thị Thanh Nhài (2010), "Xây dựng phương pháp định lượng các vitamin tan trong nước trong thuốc và thực phẩm bổ sung bằng điện di mao quản", *Tạp chí dược học - 6/2010 (Số 410 năm 50)*, tr. 53-56.
5. Phạm Luận (2005), *Cơ sở lý thuyết của sắc ký điện di mao quản hiệu suất cao*, Giáo trình giảng dạy dành cho sinh viên chuyên ngành Hóa Phân tích, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Hà Nội.
6. Nguyễn Lục Thơ, Nguyễn Thị Chung, Nguyễn Đức Tuấn (2014), "Xây dựng quy trình định lượng glucosamin bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA", *NXB Y học TP.Hồ Chí Minh*, 18(2), tr. 157-161.
7. Lê Thị Thúy, Vũ Thị Thu Trang, Lê Thị Hồng Hào, Trần Hoàng Giang (2019), "Xác định đồng thời một số dạng của vitamin nhóm B trong sản phẩm dinh dưỡng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) sau thủy phân enzyme", *Tạp chí kiểm nghiệm và an toàn thực phẩm*, 2(1), tr. 38-44.
8. Tạ Thị Thảo (2010), *Bài giảng chuyên đề thống kê trong hóa phân tích*, Giáo trình giảng dạy dành cho sinh viên chuyên ngành Hóa phân tích, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Hà Nội.

TIẾNG ANH

9. Abua Ikem, Alwell Nwankwoala, Seyi Oduyungbo, Kafui Nyavor, Nosa Egiebor (2002), "Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP–OES", *Food Chemistry*, 77(4), pp. 439-447.
10. Amid R., Jasmina B., Olivera U., Sote V. (2004), "Determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12 in multivitamin tablets", *J. Serb. Chem. Soc*, 70(10), pp. 1229-1235.
11. Anna Krejcova, David Kahoun, Tomas Cernohorsky, Milan Pouzar (2006), "Determination of macro and trace element in multivitamins preparations by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with slurry sample introduction", *Food Chemistry*, 98, pp. 171-178.
12. Armando Alcázar, Magaña Katarzyna Wrobel, Alma Rosa Corrales Escobosa, Kazimierz Wrobel (2014), "Fast determination of glucosamin in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography without pre-Column derivatization", *Acta universitaria*, 24, pp. 16-22.
13. Aysegül Semiz, Osman Duman, Sibel Tunç (2020), "Development of a reversed phase-high performance liquid chromatographic method for the analysis of glucosamin sulphate in dietary supplement tablets", *Journal of Food Composition and Analysis*, 93, pp. 1-8.
14. Brini Marisa, Ottolini Denis, Calì Tito, Carafoli Ernesto (2013), "Calcium in health and disease, interrelations between essential metal ions and human diseases", *Metal Ions in Life Sciences*, Astrid Sigel Helmut Sigel, Roland K. O. Sigel ed, pp. 81-83.
15. De Backer B. L., Nagels L. J. (1996), "Potentiometric detection for capillary electrophoresis: determination of organic acids", *Analytical Chemistry*, 68(24), pp. 4441-4445.
16. Desiderio C., Rossetti D. V., Iavarone F., Messanac I., Castagnola M. (2010), "Capillary electrophoresis-mass spectrometry: Recent trends in clinical

- proteomics", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), pp. 1161-1169.
17. Dhyani A., Chander V., Singh N. (2019), "Overdose risk of vitamins: a review", *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 8(3), pp. 91-96.
 18. Duong Hong Anh, Le Minh Duc, Nguyen Kim Diem Mai, Hauser Peter C., Pham Hung Viet, Mai Thanh Duc (2015), "In-house-made capillary electrophoresis instruments coupled with contactless conductivity detection as a simple and inexpensive solution for water analysis: A case study in Vietnam", *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 17, pp. 1941-1951.
 19. Duong Hong Anh, Nguyen Thanh Dam, Mai Thanh Duc, Sáiz Jorge, Hauser Peter C., Pham Hung Viet (2016), "Inexpensive and versatile measurement tools using purpose-made capillary electrophoresis devices coupled with contactless conductivity detection: A view from the case study in Vietnam", *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 1(3), pp. 273-281.
 20. E., Munsell H. (1940), "Vitamins and their occurrence in foods", *The Milbank Memorial Fund Quarterly*, 18(4), pp. 311-344.
 21. Ekine R., Kadakal C., Pamukkale (2005), "Determination of seven water-soluble vitamins in Tarhana, a traditional turkish cereal food by High-Performance Liquid Chromatography", *Aceta Chromatographica*, 15, pp. 289-297.
 22. Eliška Václavíková, František Kvansnicka (2013), "Isotachophoretic determination of glucosamin and chondroitin sulphate in dietary supplements", *Czech J. Food Sci*, 31, pp. 55-65.
 23. F., Othman A. (2004), "A novel method for determination of magnesium in urine and water samples with mercury film-plated carbon paste electrode", *Talanta*, 63(2), pp. 497-501.
 24. Felix F. S., Quintino Maria S. M., Carvalho Alexandre Z., Coelho Lúcia H.G., Lago Claudimir L. do, Angnes Lúcio (2006), "Determination of

- salbutamol in syrups by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C4D)", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(5), pp. 1288-1292.
25. Fotsing L., Fillet M., Bechet I., Hubert Ph., Crommen J. (1997), "Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, pp. 1113-1123.
26. Fracassi da Silva José A., Lago do Claudimir L. (1998), "An oscillometric detector for capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 70(20), pp. 4339-4343.
27. Franco M., Jasionowska R., Salvatore E. (2012), "Application of CZE method in routine analysis for determination of B-complex vitamins in pharmaceutical and veterinary preparations", *International Journal of Analytical Chemistry*, 4, pp. 592-650.
28. G., LeBlanc J. (2018), "Introductory chapter: B-group vitamins in B group vitamins current uses and perspectives", *Intech Open, London*.
29. García Carlos D., Liu Y., Anderson Paul, Henry Charles S. (2003), "Versatile 3-channel high-voltage power supply for microchip capillary electrophoresis", *Lab on a Chip*, 3(4), pp. 324-328.
30. Giray, Dilgin Didem (2017), "Determination of calcium dobesilate by differential pulse voltammetry at a disposable pencil graphite electrode", *Analytical Letters*, 51(1), pp. 186-197.
31. Green J. S., Jorgenson J. W. (1986), "Variable-wavelength on-column fluorescence detector for open-tubular zone electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 352, pp. 337-343.
32. Hodges, R. E., Ohlson, M. A. và Bean, W. B. (1958), "Pantothenic acid deficiency in man", *J Clin Invest*, 37(11), pp. 1642-57.
33. Holcomb R. E., Kraly J. R., Henry C. S. (2009), "Electrode array detector for microchip capillary electrophoresis", *Analyst*, 134(3), pp. 486-492.

34. J., Longe (2004), "The gale encyclopedia of alternative medicine", *Gale/Cengage Learning*, Michigan.
35. Jin T., Rong L., Zi-Tao J. (2011), "Determination of thiamin (vitamin B₁) in pharmaceutical tablets and human urine by titania-based ligand-exchange hydrophilic", *Anal. Methods*, 3, pp. 1568-1573.
36. Jingsu X., Stefano P., Paul B. (2020), "Cerebral deficiency of vitamin B₅ (D-pantothenic acid; pantothenate) as a potentially-reversible cause of neurodegeneration and dementia in sporadic Alzheimer's disease", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527, pp. 676-681.
37. Jong-Jyh Chen, Yeun Chung Lee, Tzong-Jih Cheng, Hsien-Yi Hsiao (2006), "Determination of glucosamin content in nutraceuticals by capillary electrophoresis using in-capillary OPA labeling techniques", *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(2), pp. 203-206.
38. Jorgenson J. W., Lukacs K. D. (1981), "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries", *Journal of Chromatography A*, 218, pp. 209-216.
39. Joseany M.S.Almeida, Aldaléa L.B.Marques (2014), "A simple electroanalytical procedure for the determination of calcium in biodiesel", *Fuel*, 115, pp. 658-665.
40. Kwok-Keung S., Kang S. (2000), "Selective determination of vitamin B₂ at electrochemically activated glassy carbon electrode", *Electroanalysis*, 12(2), pp. 134-139.
41. L., Michaelis (1906), "Biochemische zeitschrift", *Springer Science & Business Media, Berlin/ Heidelberg*.
42. L., Siaw-Cheok (2016), "Folic acid and diseases-supplement it or not", *Rev Assoc Med Bras*, 62(1), pp. 90-100.
43. Lieberman S., Bruning N. (1990), "The real vitamin & mineral book", *Avery Group, New York City*.
44. M., George (2016), "The world's healthiest foods", *George Mateljan Foundation, California*.

45. M., Matysik F. (2008), "Advances in amperometric and conductometric detection in capillary and chip-based electrophoresis", *Microchimica Acta*, 160(1), pp. 1-14.
46. Mai Thanh Duc, Le Minh Duc, Sáiz J., Duong Hong Anh, Koenka Israel Joel, Pham Hung Viet, Hauser Peter C. (2016), "Triple-channel portable capillary electrophoresis instrument with individual background electrolytes for the concurrent separations of anionic and cationic species", *Analytica Chimica Acta*, 911, pp. 121-128.
47. Marina F., Jasionowska R., Salvatore E. (2012), "Application of CZE method in routine analysis for determination of B-complex vitamins in pharmaceutical and veterinary preparations", *International journal of analytical chemistry*, 2012, pp. 592-602.
48. Matthias S., Ebrahim R., Wolfgang L. (2003), "Determination of water-soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis", *Nahrung/Food*, 47(4), pp. 243-247.
49. Medicine, Institute of (2011), "Dietary reference intakes for calcium and vitamin", *The National Academies Press, Washington*.
50. Mischak H., Coon Joshua J., Novak J., Weissinger Eva M., Schanstra Joost P., Dominiczak Anna F. (2009), "Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarker discovery and clinical diagnosis: an update of recent developments", *Mass Spectrometry Reviews*, 28, pp. 703-724.
51. Mohamed B., Aguerssif N. (2008), "Simultaneous determination of calcium and magnesium by derivative spectrophotometry in pharmaceutical products", *Spectrochimica acta. Part A. Molecular and biomolecular spectroscopy*, 69, pp. 676-681.
52. Mojtaba Shamsipur, Gholamreza Khayatian, Sayed Yahya Kazemi (2011), "The Synthesis of 1,4-Diaza-2,3;8,9-dibenzo-7,10-dioxacyclododecane-5,12-dione and its use in calcium-selective carbon paste electrodes", *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 40, pp. 303-307.

53. Mouhammed K., Elias B., Rahal F. (2015), "Validated spectrophotometric method to assay of B₆ and B₃ vitamins in pharmaceutical forms using Potassium Iodide and Potassium Iodate", *International Letters of Chemistry Physics and Astronomy*, 60, pp. 113-119.
54. Nations, World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United (2004), "Vitamin and mineral requirements in human nutrition", World Health Organization (WHO), Geneva Switzerland.
55. N. Byrd, Rapid (2012), "Sensitive and cost-effective detection of B vitamins in Foods by UHPLC/MS/MS", *Agilent Technologies*, 78, pp. 121-128.
56. Nguyen Thi Anh Huong, Nguyen Van Ri, Le Duc Dung, Nguyen Thi Thanh Binh, Cao Van Hoang, Nguyen Thi Kim Dung, Sáiz Jorge, Hauser Peter C., Mai Thanh Duc (2016), "Simultaneous determination of rare earth elements in ore and anti-corrosion coating samples using a portable capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection", *Journal of Chromatography A*, 1457, pp. 151-158.
57. Nicola, Volpi (2009), "Capillary electrophoresis determination of glucosamin in nutraceutical formulations after labeling with anthranilic acid and UV detection", *J. Pharm Biomed Analytical*, 49(3), pp. 868-871.
58. Nief R., Hajum O. (2012), "Spectrophotometric determination of pyridoxine hydrochloride via complexation with Fe(III) in pharmaceutical and environmental wastewater samples (NJC)", *Iraqi National Journal of Chemistry*, 48, pp. 413-423.
59. Nussbaumer S., Souverain Sandrine Fleury, Bouchoud, Rudaz, Bonnabry Pascal, Veuthey Jean Luc (2010), "Determination of potassium, sodium, calcium and magnesium in total parenteral nutrition formulations by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection", *J Pharm Biomed Anal*, 53(2), pp. 130-136.
60. Olayemi J.Fakayode, Thabo T.I. Nkambule (2022), "Cyclic voltammetric determination of calcium in water in the presence of natural organic matter

- (humic acid) and Cu (II) at gold electrode's surface", *Food Chemistry Advances*, 1, pp. 34-42.
61. Pajchel G., Pawłowski K., Tyski S. (2002), "CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, pp. 75-81.
62. Patcharin Chaisuwan, Thitiya Kongprasertsak, Areeporn Sangcakul (2011), "Direct injection of human serum and pharmaceutical formulations for glucosamin determination by CE-C⁴D method", *Journal of Chromatography B*, 879(23), pp. 2185- 2188.
63. Pavel Jac, Petr Los, Zdenek Spacil, Marie Pospisilova, Miroslav Polasek (2008), "Fast assay of glucosamin in pharmaceuticals and nutraceuticals by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, 29, pp. 3511-3518.
64. Peter M., Valásková I., Havránek E. (2005), "Determination of salbutamol in pharmaceuticals by capillary electrophoresis", *Chemistry in Life Sciences*, 338, pp. 498-501.
65. Priya Gaonkar, Vineeta Khanvilkar, Rajani shettigar, Chhaya Gadgoli (2006), "Spectrophotometric method for determination of glucosamin in tablets", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(1), pp. 83-88.
66. R., Weinberger (1993), "Practical capillary electrophoresis", *Academic Press Inc., San Diego*.
67. S., Hjertén (1967), "Free zone electrophoresis", *Chromatographic reviews*, 9(2), pp. 122-219.
68. S.Pulla Reddy, C.Rambabu (2015), "Simultaneous determination of glucosamin and diacerein in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC", *International journal of pharmacy and pharmaceutical research*, 2(2), pp. 139-151.

69. Saad Antakli, Leon Nejem, Ahmad Kullah (2021), "Determination of pitavastatin calcium by analytical spectrophotometry", *Journal of advanced in chemistry*, 18, pp. 30-39.
70. Satyaranayana U., Chakrapani U. (2006), "The vitamins", *Biochemistry*, 7, pp. 116-160.
71. Services, Wiley Subscription (2009), "Contents-Electrophoresis", *Electrophoresis*, 30(19), pp. 3035-3039.
72. Susanne N., Fleury-Souverain S., Bouchoud Lucie , Rudaz Serge (2010), "Determination of potassium, sodium, calcium and magnesium in total parenteral nutrition formulations by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection", *J Pharm Biomed Anal*, 53(2), pp. 130-136.
73. Takako Yamaguchi, Mayumi Inoue, Kanako Miyachi, Hiroshi Tominaga, Yoshikazu Fujita (2004), "Spectrophotometric determination of glucosamin and its analogous amino sugars with o-hydroxyhydroquinonephthalein and palladium(II)", *Analytical Sciences*, 20(2), pp. 387-389.
74. Tanyanyiwa J., Leuthardt S., Hauser Peter C. (2002), "Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 23(21), pp. 3659-3666.
75. Thamma Narendra Kumar, R. Sreenivasulu, Raju satya, Useni Reddy Mallu (2011), "A Novel RP- HPLC method for the quantification of impurities in glucosamin hydrochloride", *International journal of research and reviews in pharmacy and applied sciences*, 2, pp. 242-266.
76. W., Jorgenson J. (1984), "Zone electrophoresis in open-tubular capillaries", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 3(2), pp. 51-54.
77. W.L.Deorge (2012), "AOAC Official Methods of Analysis- Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements", *AOAC international, Arlington*.
78. Wang Xinmina, Zhang Ruilia, Lv Zhihua, , Wang Yuanhonga, Jiang Tingfu (2007), "Determination of glucosamin and lactose in milk-based formulae by

- high-performance liquid chromatography", *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), pp. 255-258.
79. Wayne K., Way Kathleen G. Gibson, Andrew G. Breite (2000), "Determination of glucosamin in nutritional supplements by reversed phase ion-pairing HPLC", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23(18), pp. 2861-2871.
80. Westmacott K. L., Crew A., Doran O., Hart J. P. (2018), "A novel electroanalytical approach to the measurement of B vitamins in food supplements based on screen-printed carbon sensors", *Talanta*, 181, pp. 13-18.
81. Wu X., Wang Y., Yang Xu, Depei Wu, Aining Sun, Ziling Zhu, Yue Han, Huiying Qiu, Xiaowen Tang, Zhengzheng Fu, Guangsheng He, Caixia Li, Xiao Ma, Yuejun Liu (2010), "Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China", *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(5), pp. 647-652.
82. Xiaoxuan Shen, Min Yang, Sterling A. Tomellini (2007), "Liquid chromatographic analysis of glucosamin in commercial dietary supplements using indirect fluorescence detection", *Journal of Chromatographic Science*, 45(2), pp. 70-75.
83. Yun E. K., Prince A. J., Johanna E McMillin, Lawrence E Welch (1998), "High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 712(1), pp. 145-152.
84. Zemann A. J., Schnell E., Volgger D., Bonn G. K. (1998), "Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis", *Analytical Chemistry*, 70(3), pp. 563-567.
85. Zeriet O. T., van Staden J. F., Stefan R. I. (2004), "Spectrophotometric determination of magnesium in pharmaceutical preparations by cost-effective sequential injection analysis", *Talanta*, 64(4), pp. 981-988.

86. Kelvin Li, Xia-Fang Wang, Ding-You Li, Yuan-Cheng Chen, Lan-Juan Zhao, Xiao-Gang Liu, Yan-Fang Guo (2018), "The good, the bad, and the ugly of calcium supplementation: a review of calcium intake on human health", *Clinical Interventions in Aging*, 28, pp. 2443-2452.
87. Tanyanyiwa, Jatisai, Leuthardt, Sandro và Hauser, Peter C. (2002), "Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 23(21), pp. 3659-3666.

PHỤ LỤC

PL1. Thông tin chi tiết các mẫu sử dụng trong nghiên cứu

Bảng PL1.1. Thông tin mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa canxi và glucosamin

Ký hiệu mẫu	Đặc điểm	Hàm lượng
M1	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 312,5 mg Glucosamin và 17,5 mg Canxi
M2	Mẫu TPCN Dạng viên nang	Mỗi viên chứa 265,7 mg Glucosamin và 4,6 mg Canxi
M3	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 284,6 mg Glucosamin và 20,0 mg Canxi
M4	Mẫu TPCN Dạng viên nang	Mỗi viên chứa 323,7 mg Glucosamin và 11,6 mg Canxi
M5	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 100,0 mg Canxi
M6	Mẫu TPCN Dạng viên nang	Mỗi viên chứa 208 mg Canxi
M7	Mẫu TPCN Dạng viên nang	Mỗi viên chứa 126 mg Canxi
M8	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 342 mg glucosamin và 8,0 mg canxi
M9	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 488,0 mg Glucosamin và 25,0 mg Canxi

M10	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 506 mg Glucosamin và 4,6 mg Canxi
M11	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 519 mg Glucosamin
M12	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 344,0 mg Glucosamin
M13	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 457 mg Glucosamin và 40 mg Canxi
M14	Mẫu TPCN Dạng viên nén	Mỗi viên chứa 107 mg Glucosamin và 48 mg Canxi

Bảng PL1.2. Thông tin mẫu dược phẩm và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa magie và vitamin B₆

Ký hiệu mẫu	Đặc điểm	Hàm lượng
S1	Mẫu TPCN Bột	Mỗi viên chứa 75,00 mg magie và 3,10 mg vitamin B ₆
S2	Mẫu dược phẩm Viên nén	Mỗi viên chứa 47,30 mg magie và 5,00 mg vitamin B ₆
S3	Mẫu dược phẩm Viên nén	Mỗi viên chứa 47,30 mg magie và 5,00 mg vitamin B ₆
S4	Mẫu TPCN Viên nang cứng	Mỗi viên chứa 48,00 mg magie và 2,00 mg vitamin B ₆
S5	Mẫu TPCN Viên nang cứng	Mỗi viên chứa 30,00 mg magie và 5,00 mg vitamin B ₆
S6	Mẫu TPCN Viên nang mềm	Mỗi viên chứa 39,00 mg magie và 2,00 mg vitamin B ₆
S7	Mẫu TPCN Viên nang mềm	Mỗi viên chứa 7,20 mg magie và 1,00 mg vitamin B ₆

Bảng PL1.3. Thông tin mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa vitamin B₁, vitamin B₅, vitamin B₉

Ký hiệu mẫu	Đặc điểm	Hàm lượng
A1	Mẫu TPCN Viên nang mềm	Mỗi viên chứa 1,8 mg vitamin B ₁
A2	Mẫu TPCN Viên nang mềm	Mỗi viên chứa 1,5 mg Vitamin B ₁ , 15 mg vitamin B ₅ và 0,4 mg vitamin B ₉
A3	Mẫu TPCN Viên nang mềm	Mỗi viên chứa 1,5mg Vitamin B ₁ , 3mg vitamin B ₅ và 1mg vitamin B ₉

PL2. Xác định vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ bằng phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS

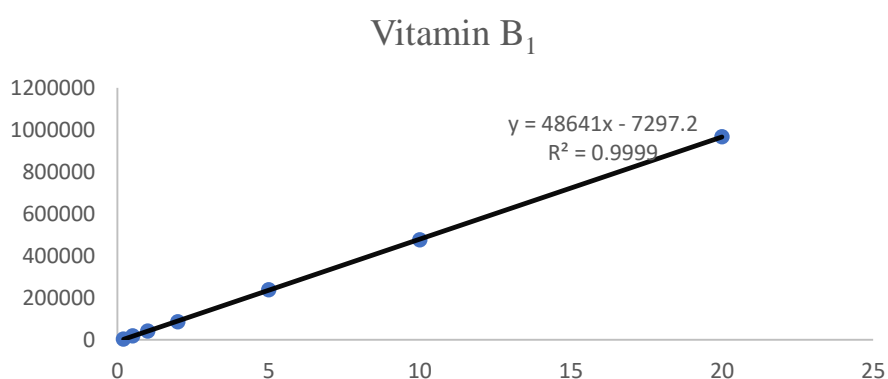
PL2.1. Quy trình và điều kiện phân tích

Với pha động A là dung dịch amoni formate 20 mM và pha động B là metanol, chương trình gradient được lựa chọn như sau:

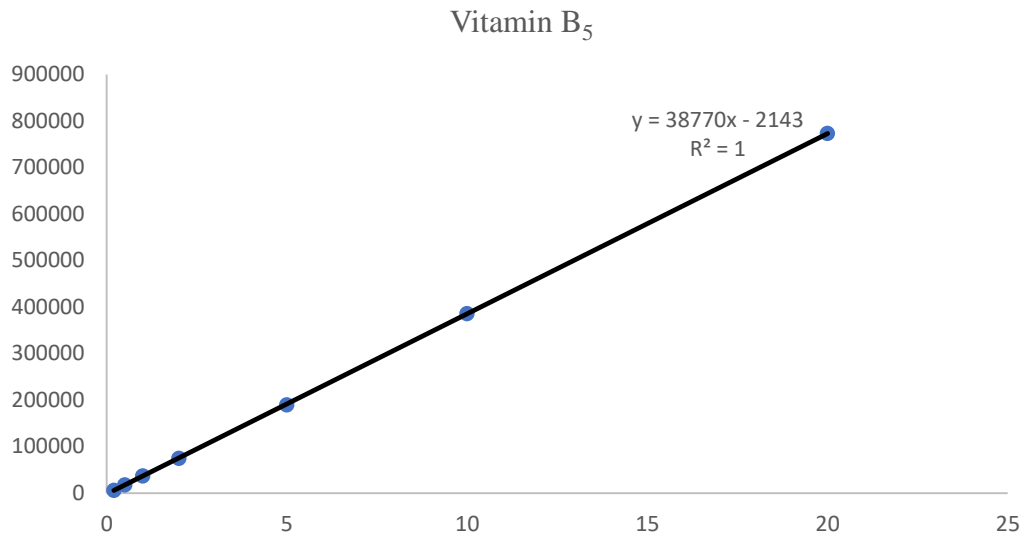
Thời gian	%A	%B
0-0,1	99	1
0,5	95	5
2,5	92	8
4,0-5,0	10	90
6,0-10,0	99	1

Xử lý mẫu: Cân chính xác một lượng mẫu vào ống falcon 50 mL, thêm chất chuẩn nội (100 µL ISSM tiêu chuẩn) và 5 mL dung dịch enzyme và trộn hỗn hợp bằng máy lắc vortex. Sau đó, hỗn hợp được ủ trong máy lắc ổn định nhiệt ở 37 °C trong 12h. Tiếp theo, chuyển vào bình định mức 25 mL, định mức đến 25 mL với dung dịch amoni formate 50 mM và lọc qua màng PTFE 0,2 µm trước khi phân tích bằng hệ thiết bị LC-MS/MS.

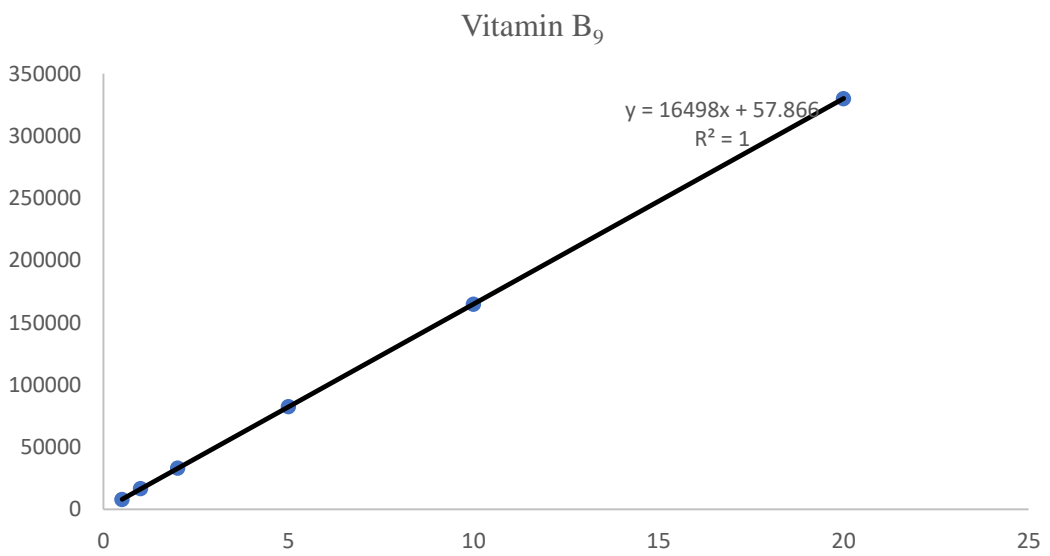
PL2.2. Đường chuẩn



Hình PL2.1. Đường chuẩn xác định vitamin B₁ bằng phương pháp UPLC-MS/MS



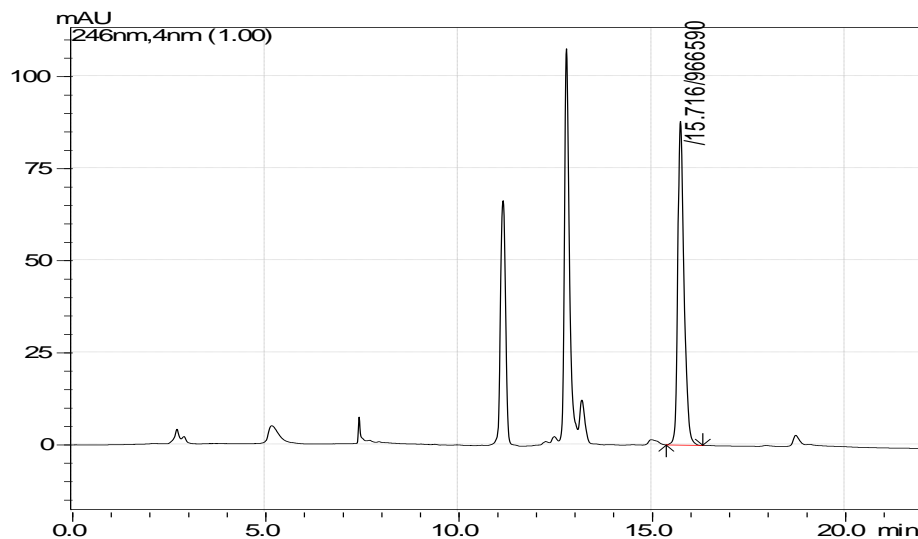
Hình PL2.2. Đường chuẩn xác định vitamin B₅ bằng phương pháp UPLC-MS/MS



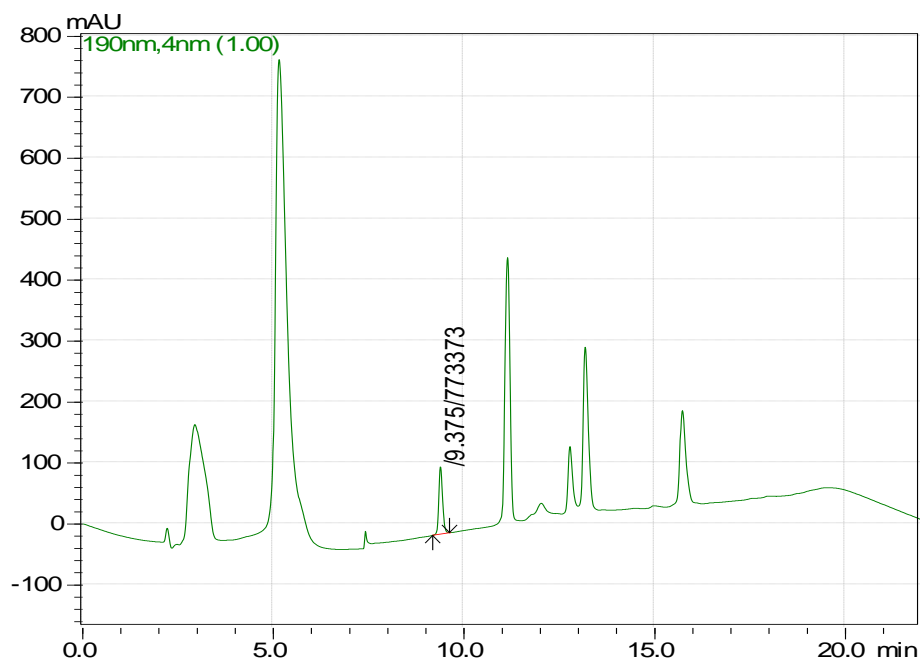
Hình PL2.3. Đường chuẩn xác định vitamin B₉ bằng phương pháp UPLC-MS/MS

PL 2.3. Sắc kí đồ phân tích các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ bằng phương pháp UPLC-MS/MS

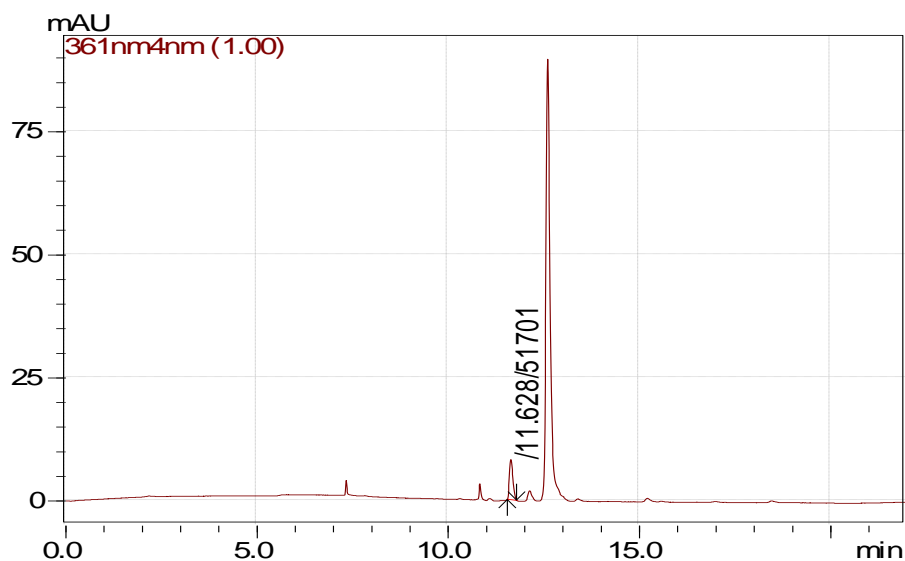
PL2.3.1. Sắc kí đồ chuẩn của các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ bằng phương pháp UPLC-MS/MS



Hình PL2.3.1.1. Sắc kí đồ chuẩn của vitamin B₁ bằng phương pháp UPLC-MS/MS

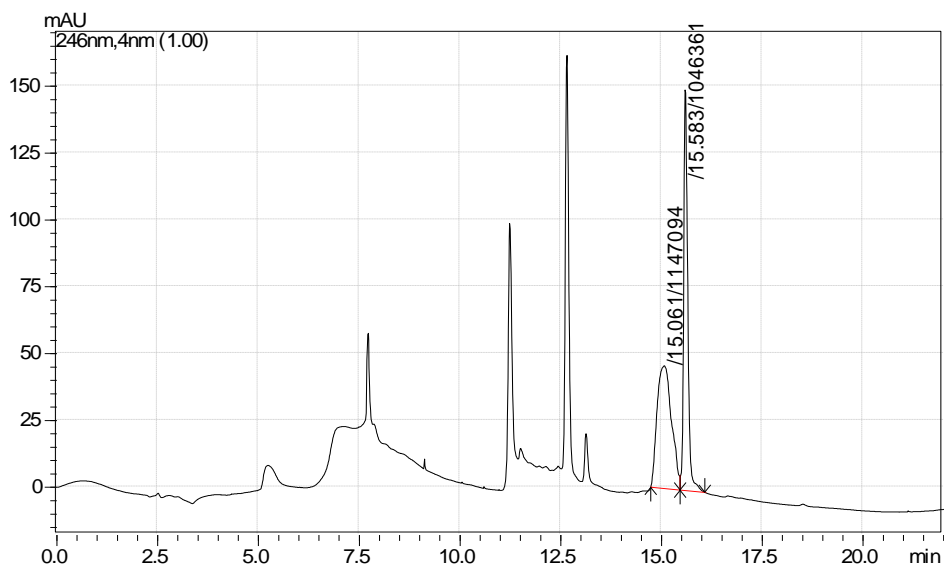


Hình PL2.3.1.2. Sắc kí đồ chuẩn của vitamin B₅ bằng phương pháp UPLC-MS/MS

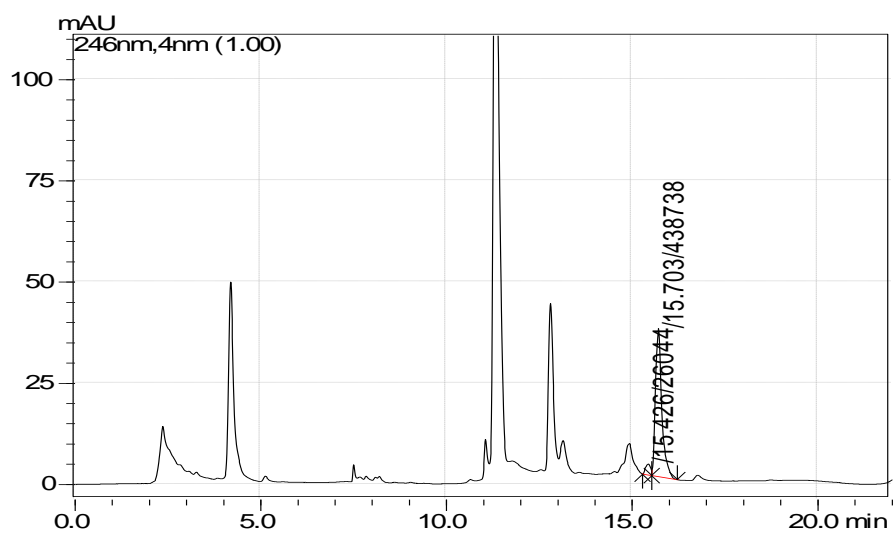


Hình PL2.3.1.3. Sắc kí đồ chuẩn của vitamin B₉ bằng phương pháp UPLC-MS/MS

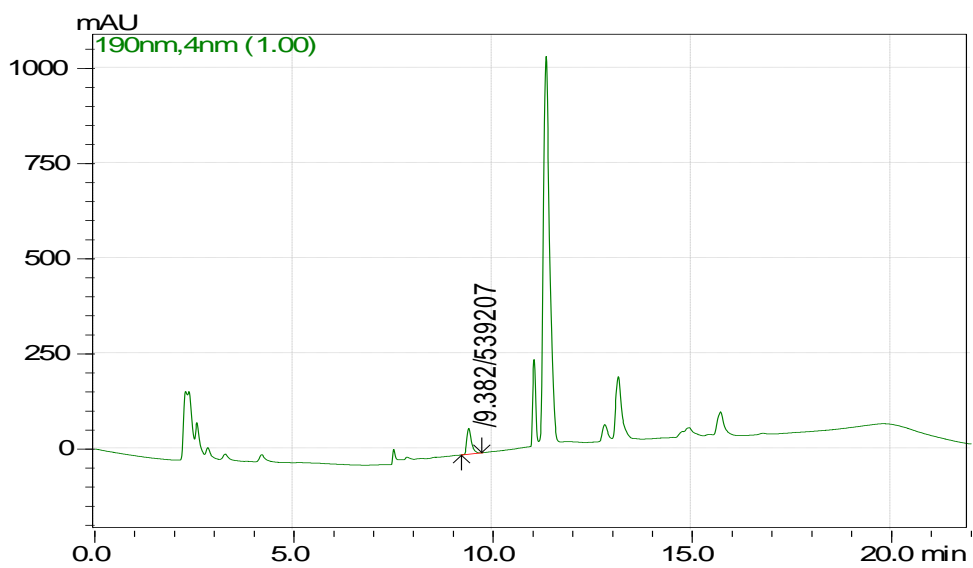
PL2.3.2. Sắc kí đồ một số mẫu chứa các vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ được phân tích đối chứng bằng phương pháp UPLC-MS/MS



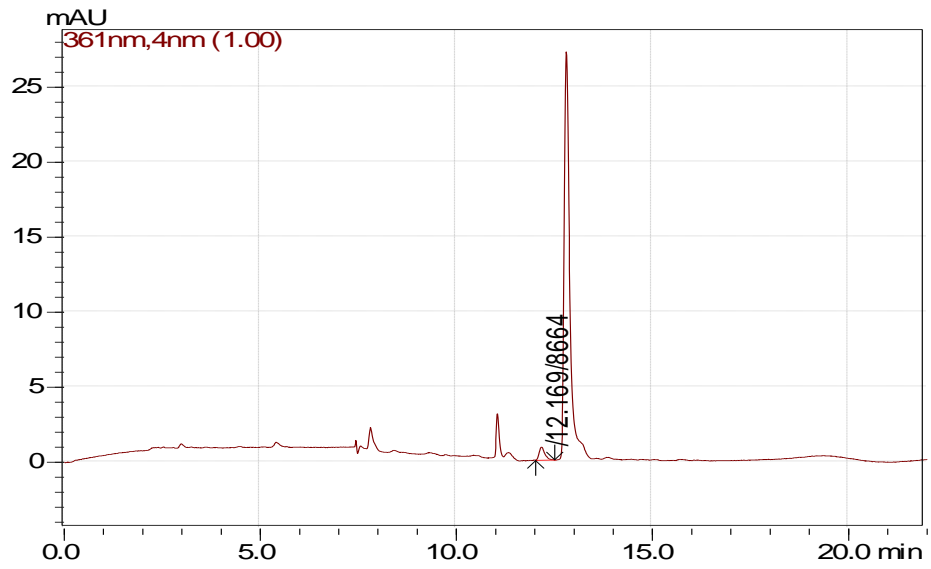
Hình PL2.3.2.1. Sắc kí đồ của mẫu A1 chứa vitamin B₁



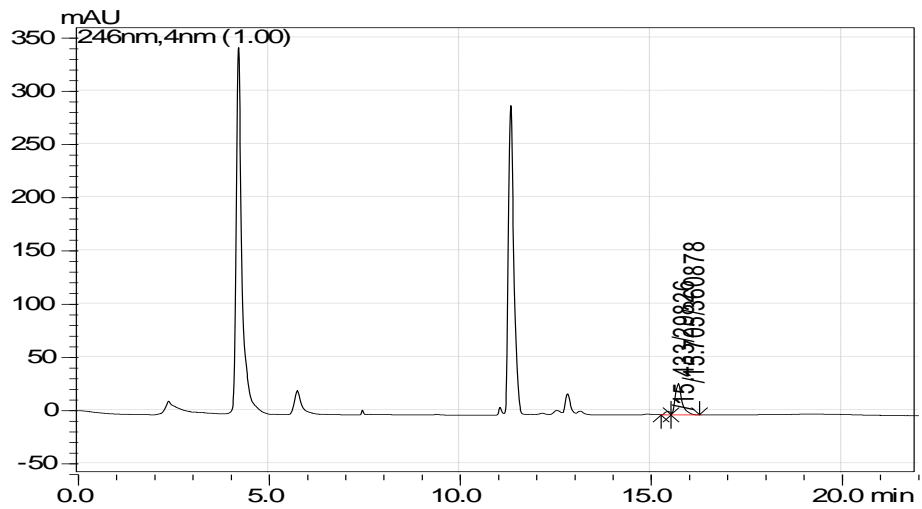
Hình PL2.3.2.2. Sắc đồ phân tích của mẫu A2 chứa vitamin B₁



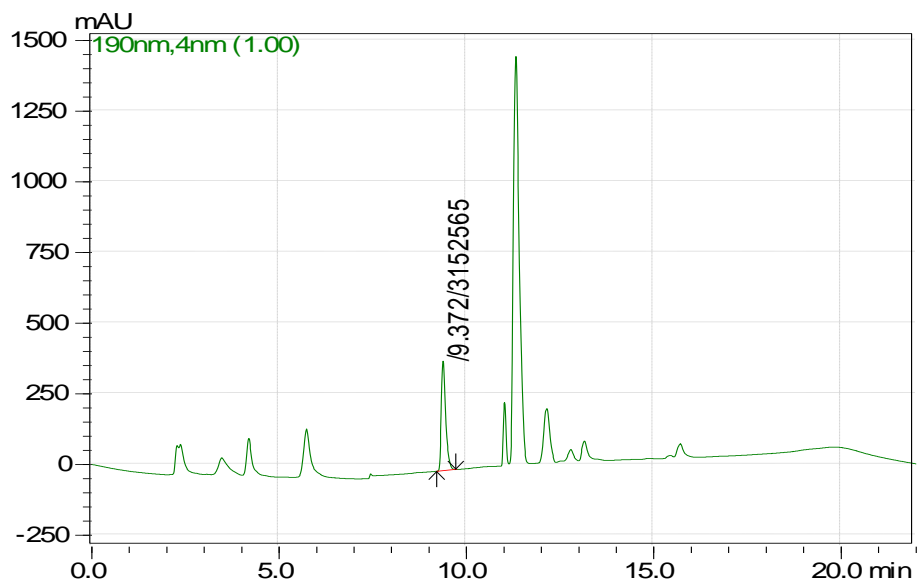
Hình PL2.3.2.3. Sắc đồ phân tích của mẫu A2 vitamin B₅



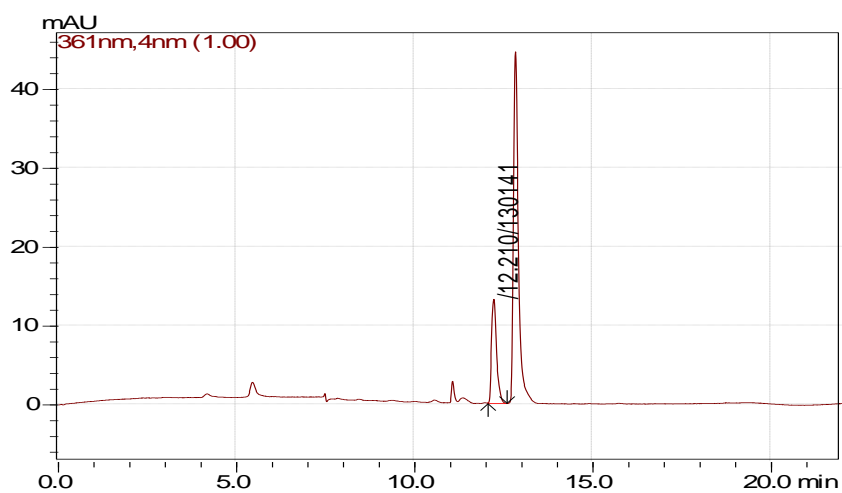
Hình PL2.3.2.4. Sắc đồ phân tích của mẫu A2 chứa vitamin B₉



Hình PL2.3.2.5. Sắc đồ phân tích của mẫu A3 chứa vitamin B₁



Hình PL2.3.2.6. Sắc đồ phân tích của mẫu A3 chứa vitamin B₅



Hình PL2.3.2.7. Sắc đồ phân tích của mẫu A3 chứa vitamin B₉

PL3. Phân tích đối chứng glucosamin bằng phương pháp HPLC-FLD

PL3.1. Quy trình và điều kiện phân tích

Các điều kiện dẫn xuất và phân tích glucosamine bằng phương pháp HPLC-FLD được lựa chọn gồm: sử dụng cột tách C18 Symmertry (150mm x 4,6mm x 5 μ m), pha động theo chế độ gradient (bảng 1) gồm kênh A là H₂O và kênh B là ACN với tốc độ dòng 1mL/phút, thể tích bơm mẫu 20 μ L, detector FLD ở bước sóng kích thích (λ_{ex}) 265nm và bước sóng phát xạ (λ_{em}) 315nm. Việc dẫn xuất bằng FMOC-Cl được thực hiện như sau: dùng pipet hút chính xác 200 μ L dung dịch cần dẫn xuất vào lọ 1,8 mL, thêm 400 μ L đệm borate (pH = 8,0) và 400 μ L dẫn xuất FMOC-Cl 500ppm, lắc 10 giây, để phản ứng ở nhiệt độ phòng ít nhất trong 30 phút trước khi phân tích trên hệ thống HPLC-FLD.

Bảng PL3.1. Chương trình gradient xác định glucosamine bằng HPLC-FLD

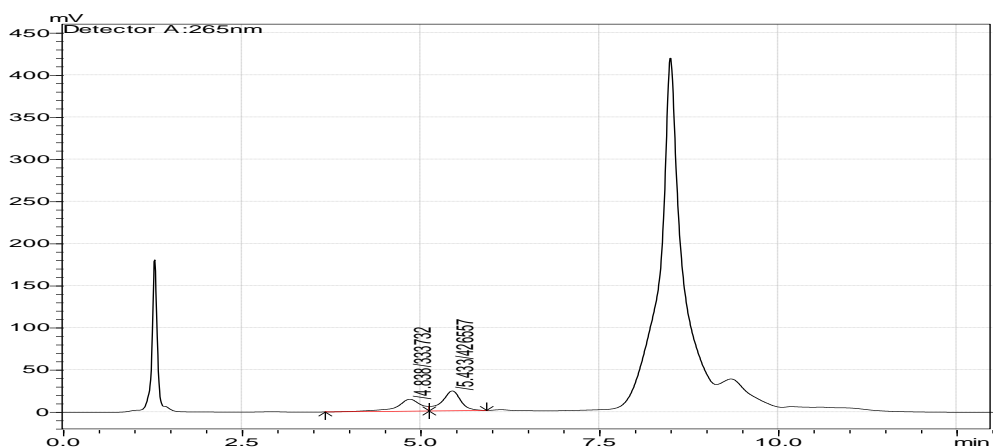
Thời gian (phút)	A (%)	B (%)
0,01	70	30
6,00	10	90
8,00	10	90
8,01	70	30
13,00	70	30

PL3.2. Quy trình xử lý mẫu

Cân chính xác trên cân phân tích khoảng 0,5 - 1,0g mẫu vào ống ly tâm 50mL. Thêm 30mL nước deion, rung siêu âm 30 phút. Ly tâm cạn dịch vào bình định mức 50mL. Chiết lần 2 bằng 15mL nước deion. Gộp dịch chiết và định mức đến vạch bằng nước deion, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,2 μ m, pha loãng (nếu cần) trước khi phân tích trên thiết bị HPLC-FLD.

PL3.3. Sắc kí đồ phân tích glucosamin bằng phương pháp HPLC-FLD

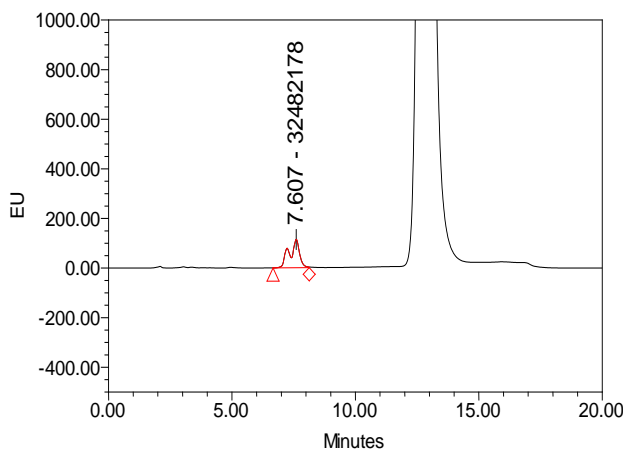
PL3.3.1. Sắc kí đồ chuẩn phân tích glucosamin bằng phương pháp HPLC-FLD



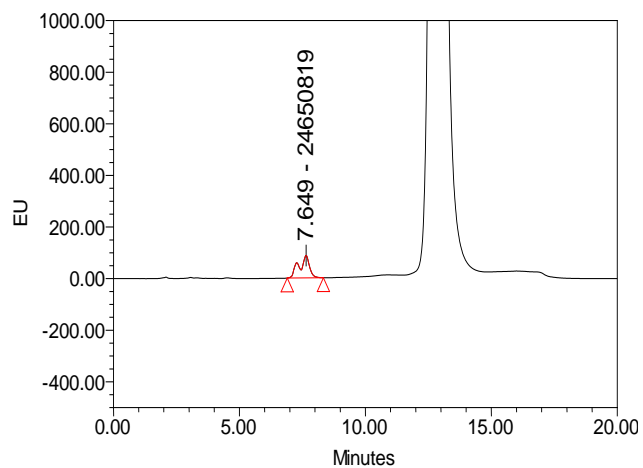
Hình 3.3.1. Sắc đồ phân tích dung dịch chuẩn glucosamin

PL3.3.2. Sắc kí đồ các mẫu phân tích glucosamin bằng phương pháp HPLC-FLD

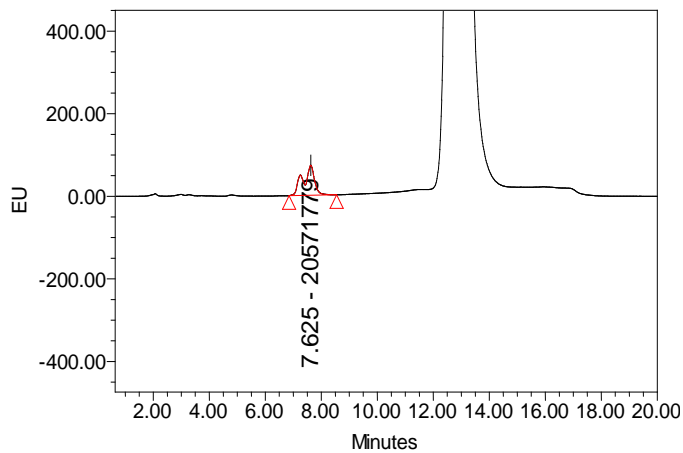
M1



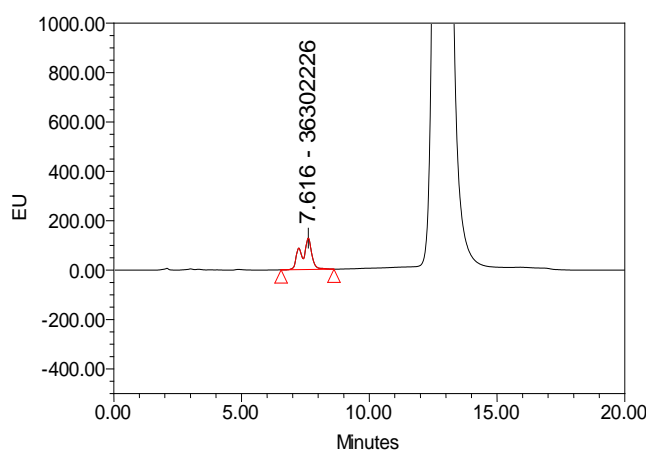
M2



M3

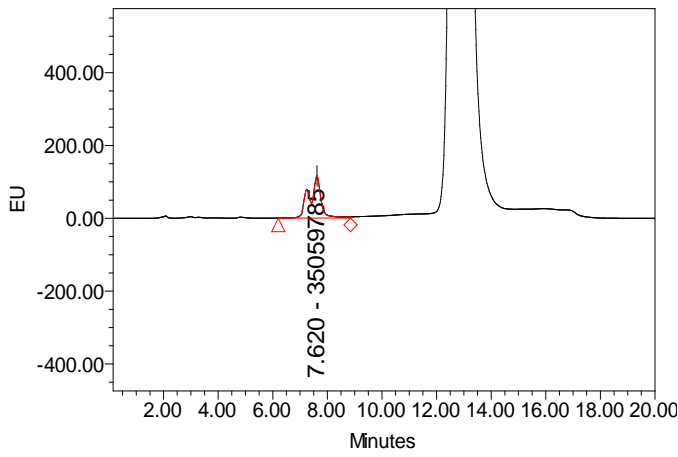


M4

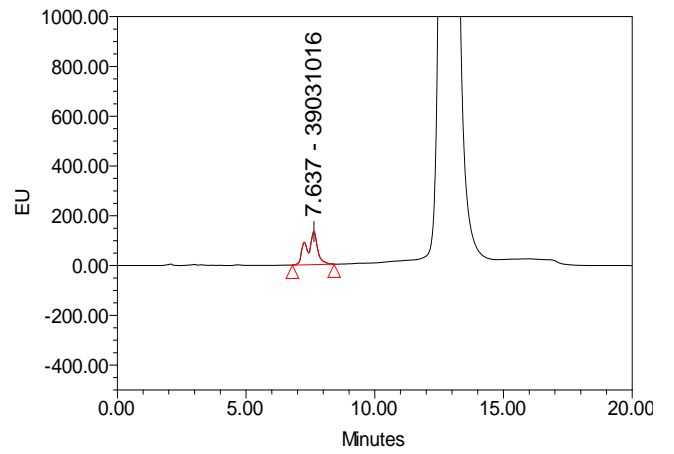


M9

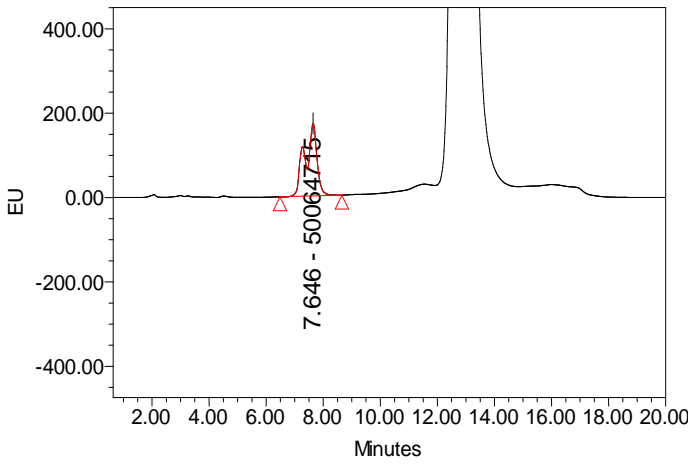
M10



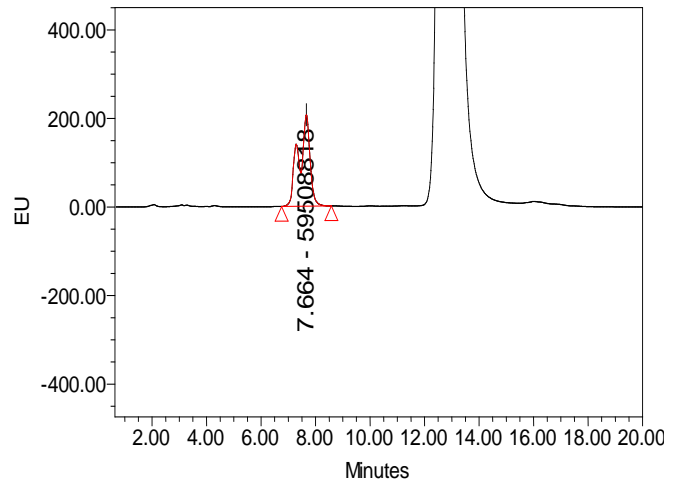
M11



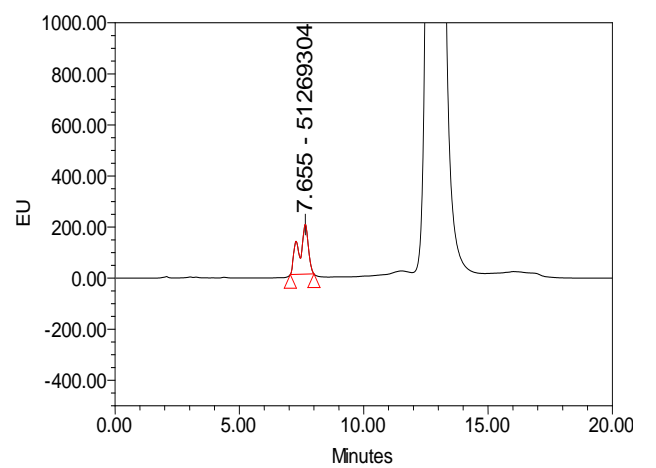
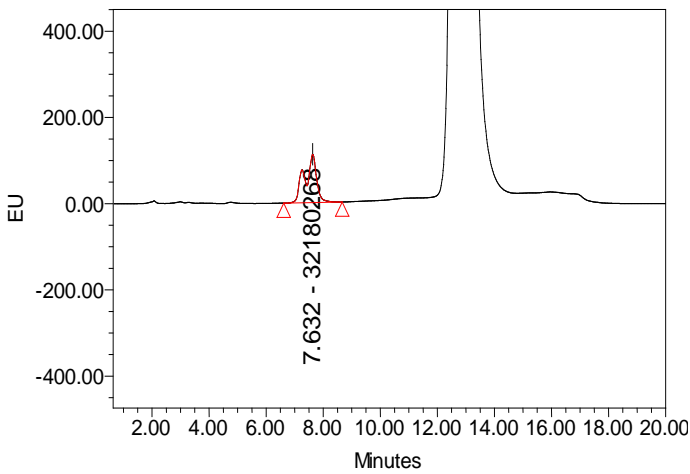
M12



M13



M14



PL4. Phân tích đối chứng Ca và Mg bằng phương pháp ICP-OES

PL4.1. Quy trình và điều kiện phân tích đối chứng Ca và Mg bằng phương pháp ICP-OES

- Mẫu được vô cơ hoá trong lò phá mẫu vi sóng có đặt chương trình theo từng đối tượng thực phẩm. Sau đó được xác định trên thiết bị ICP – OES.

Nguyên tố	Ca	Mg
Bước sóng sóng (nm)	317.933	285.213

- Mở máy và để ổn định máy trong vòng 3 giờ

- Bật plasma để ổn định trong 30 phút

- Tiến hành chạy máy theo quy trình phân tích mẫu chung H.HD.QT.13

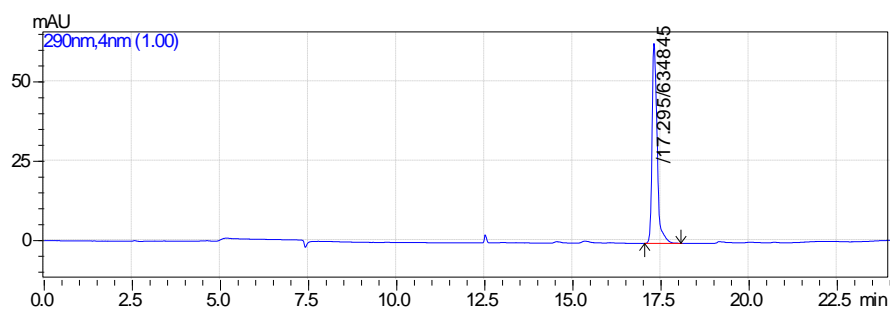
- Sau mỗi lần chạy được 10 mẫu kiểm tra độ ổn định của máy bằng cách chạy lại chuẩn, sai lệch giữa quá trình chạy sau với quá trình trước không được quá 15 % (nên kiểm tra lại chuẩn ở điểm giữa của đường chuẩn)

PL4.2. Quy trình xử lý mẫu phân tích đối chứng Ca và Mg bằng phương pháp ICP-OES

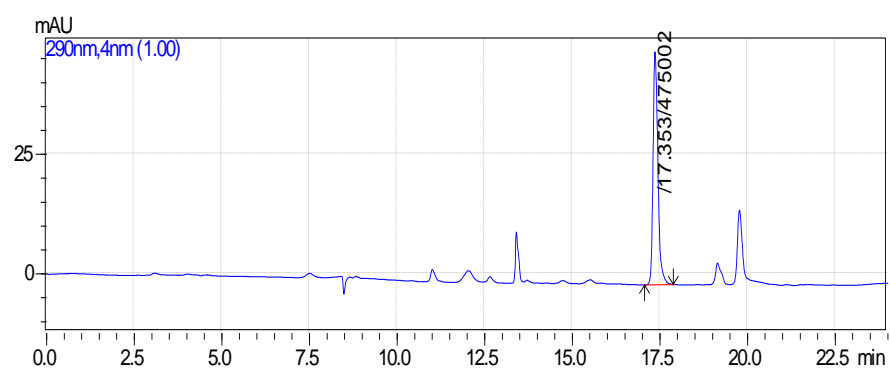
Mẫu được nghiền nhỏ, đồng nhất, cân khối lượng. Thêm vào mỗi mẫu sau khi cân lần lượt 5ml axit HNO₃ và 1ml H₂O₂. Một số đối tượng có khả năng phản ứng sinh khí mạnh (đặc biệt mẫu thực phẩm chức năng,..) nên cần được đun sơ bộ trước ở khoảng 80-90⁰c để cho phản ứng xảy ra loại bớt khí, trước khi vô cơ theo chương trình tự động của lò vi sóng phá mẫu. Mẫu sau khi vô cơ xong được chuyển vào bình định mức 50ml, định mức tới vạch bằng nước cất deion, lắc đều, sau đó lọc qua màng lọc 0,45µm trước khi tiến hành phân tích trên ICP- OES.

PL5. Sắc kí đồ một số mẫu chứa vitamin B₆ được phân tích đối chứng bằng phương pháp HPLC-PDA

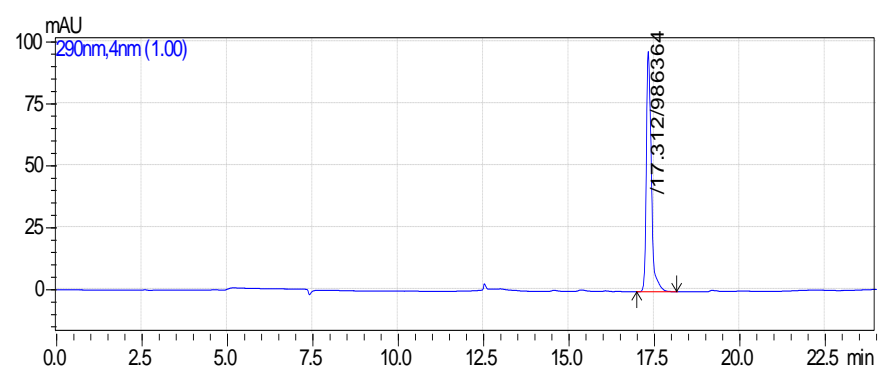
S1



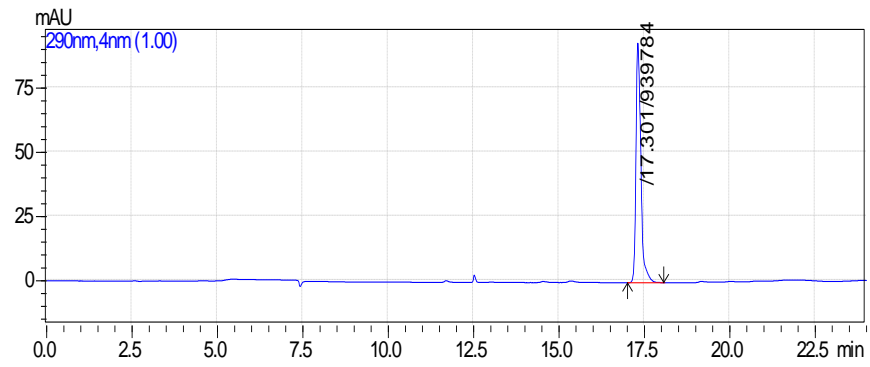
S2



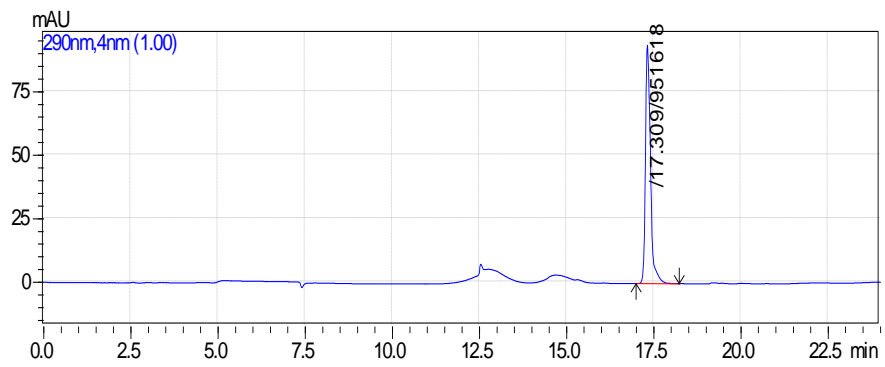
S3



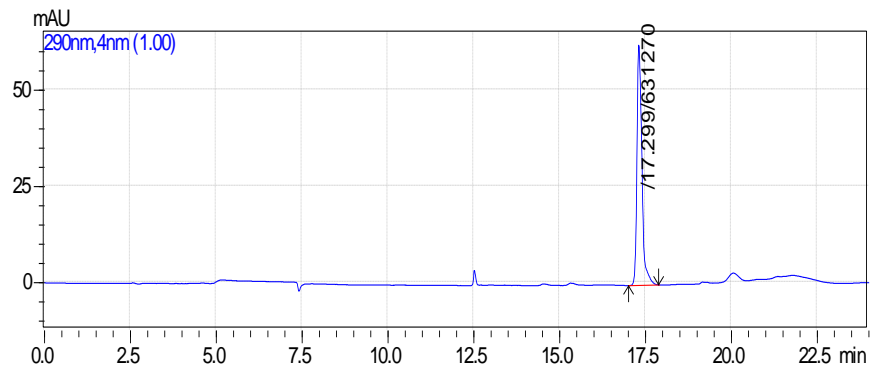
S4



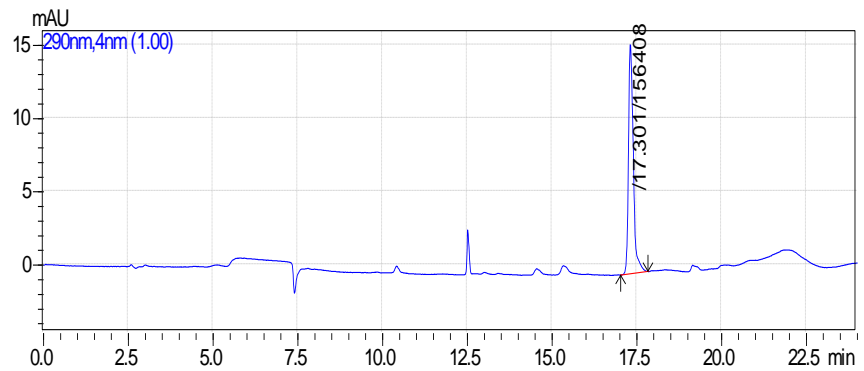
S5



S6



S7



PL6. Đánh giá đường chuẩn phân tích**Regression Analysis: Diện tích pic Ca (mV.s) versus Nồng độ Ca (mg/L)**

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	122324	122324	13737.86	0.000
Nồng độ (mg/L)	1	122324	122324	13737.86	0.000
Error	4	36	9		
Total	5	122360			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2.98398	99.97%	99.96%	99.95%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	20.4734	0.7883	11.39	0.085	
Nồng độ (mg/L)	4.0966	0.0169	117.21	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic (mV.s)} = 20.4734 + 4.0966 \text{ Nồng độ (mg/L)}$$

Regression Analysis: Diện tích pic Glucosamin (mV.s) versus Nồng độ**Glucosamin (mg/L)**

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	10947.1	10947.1	21623.62	0.000
Nồng độ (mg/L)	1	10947.1	10947.1	21623.62	0.000
Error	4	2.0	0.5		
Total	5	10949.1			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.711516	99.98%	99.98%	99.88%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.300	0.391	0.77	0.485	
Nồng độ (mg/L)	1.23298	0.00838	147.05	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic (mV.s)} = 0.300 + 1.23298 \text{ Nồng độ (mg/L)}$$

Regression Analysis: Diện tích pic Mg (V.s) versus Nồng độ Mg (mg/L)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	47.8759	47.8759	4800.39	0.000
Nồng độ Mg (mg/L)	1	47.8759	47.8759	4800.39	0.000
Error	4	0.0399	0.0100		
Total	5	47.9158			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0998665	99.92%	99.90%	99.65%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.0947	0.0542	1.75	0.155	
Nồng độ Mg (mg/L)	0.039999	0.000577	69.28	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic Mg (V.s)} = 0.0947 + 0.039999 \text{ Nồng độ Mg (mg/L)}$$

Regression Analysis: Diện tích pic vitamin B6 (V.s) versus Nồng độ vitamin B6 (mg/L)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	1.21745	1.21745	4226.36	0.000
Nồng độ vitamin B6 (mg/L)	1	1.21745	1.21745	4226.36	0.000
Error	4	0.00115	0.00029		
Total	5	1.21860			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0169723	99.91%	99.88%	99.78%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.0436	0.0109	4.00	0.061	
Nồng độ vitamin B6 (mg/L)	0.012707	0.000195	65.01	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic vitamin B(V.s)} = 0.0436 + 0.012707 \text{ Nồng độ vitamin B6 (mg/L)}$$

Regression Analysis: Diện tích pic vitamin B1 (mV.s) versus Vitamin B1 (mg/L)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	7.89603	7.89603	3840.20	0.000

Nồng độ vitamin B1 (mg/L)	1	7.89603	7.89603	3840.20	0.000
Error	3	0.00617	0.00206		
Total	4	7.90220			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0453448	99.92%	99.90%	99.77%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.0816	0.0344	2.37	0.098	
Nồng độ vitamin B1 (mg/L)	0.035070	0.000566	61.97	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic vitamin B1(mV.s)} = 0.0816 + 0.035070 \text{Nồng độ vitamin B1 (mg/L)}$$

Regression Analysis: Diện tích pic vitamin B5 (mV.s) versus Vitamin B5 (mg/L)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	3135.18	3135.18	4639.92	0.000
Nồng độ vitamin B5 (mg/L)	1	3135.18	3135.18	4639.92	0.000
Error	3	2.03	0.68		
Total	4	3137.20			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.822008	99.94%	99.91%	99.71%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	-0.075	0.535	-0.14	0.897	
Nồng độ vitamin B5 (mg/L)	0.6862	0.0101	68.12	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic vitamin B5(mV.s)} = -0.075 + 0.6862 \text{Nồng độ vitamin B5 (mg/L)}$$

Regression Analysis: Diện tích pic vitamin B9 (mV.s) versus Vitamin B9 (mg/L)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Regression	1	2174.76	2174.76	6693.09	0.000
Nồng độ vitamin B9 (mg/L)	1	2174.76	2174.76	6693.09	0.000
Error	3	0.97	0.32		
Total	4	2175.73			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.570023	99.96%	99.94%	99.84%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	0.327	0.420	0.78	0.493	
Nồng độ vitamin B9 (mg/L)	0.40166	0.00491	81.81	0.000	1.00

Regression Equation

$$\text{Diện tích pic vitamin B9 (mV.s)} = 0.327 + 0.40166 \text{Nồng độ vitamin B9 (mg/L)}$$

PL7. Đánh giá độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp phân tích đối chứng bằng phần mềm Minitab

PL7.1. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng ICP-OES khi phân tích Canxi

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp ICP-OES

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	9	60.1	60.2	19.1
Phương pháp ICP-OES	9	61.3	61.0	19.3

Estimation for Paired Difference

95% CI for			
Mean	StDev	SE Mean	$\mu_{\text{difference}}$
-1.235	2.726	0.862	(-3.185, 0.715)

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D- Phương pháp ICP-OES)

Test

Null hypothesis Ho: $\mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis H₁: $\mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value P-Value

-1.43 0.186

PL7.2. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng ICP-OES khi phân tích Magie

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp ICP-OES

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	7	43.61	22.07	8.34
Phương pháp ICP-OES	7	43.64	22.73	8.59

Estimation for Paired Difference

95% CI for			
Mean	StDev	SE Mean	$\mu_{\text{difference}}$
-0.033	2.057	0.777	(-1.935, 1.869)

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D - Phương pháp ICP-OES)

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis $H_1: \mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value	P-Value
-0.04	0.968

PL7.3. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng HPLC-FLD khi phân tích Glucosamin

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp HPLC-FLD

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	11	375.9	141.0	40.7
Phương pháp HPLC-FLD	11	375.3	138.2	39.9

Estimation for Paired Difference

95% CI for			
Mean	StDev	SE Mean	$\mu_{\text{difference}}$
0.67	13.03	3.76	(-7.61, 8.95)

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D - Phương pháp HPLC-FLD)

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis $H_1: \mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value P-Value

0.18 0.863

PL7.4. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng HPLC-PDA khi phân tích vitamin B₆

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp HPLC-PDA

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	7	3.327	1.785	0.675
Phương pháp HPLC-PDA	7	3.279	1.731	0.654

Estimation for Paired Difference

95% CI for			
Mean	StDev	SE Mean	$\mu_{\text{difference}}$
0.0486	0.1442	0.0545	(-0.0848, 0.1819)

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D - Phương pháp HPLC-PDA)

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis $H_1: \mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value P-Value

0.89 0.407

PL7.5. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS khi phân tích vitamin B₁

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp UPLC-MS/MS

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	3	40.8	53.7	24.0
Phương pháp UPLC-MS/MS	3	42.5	56.2	25.1

Estimation for Paired Difference

95% CI for				
Mean	StDev	SE Mean	$\mu_{\text{difference}}$	
-1.74	4.16	1.86	(-6.91, 3.43)	

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D - Phương pháp UPLC-MS/MS)

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis $H_1: \mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value	P-Value
-0.93	0.403

PL7.6. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS khi phân tích vitamin B₅

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp UPLC-MS/MS

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	2	38.9	52.1	30.1
Phương pháp UPLC-MS/MS	2	40.0	54.1	31.2

Estimation for Paired Difference

95% CI for				
Mean	StDev	SE Mean	$\mu_{\text{difference}}$	
-1.08	2.02	1.17	(-6.10, 3.93)	

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D - Phương pháp UPLC-MS/MS)

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis $H_1: \mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value P-Value

-0.93 0.451

PL7.7. Độ phù hợp giữa phương pháp CE-C⁴D và phương pháp đối chứng UPLC-MS/MS khi phân tích vitamin B₉

Paired T-Test and CI: Phương pháp CE-C4D, Phương pháp UPLC-MS/MS_2

Descriptive Statistics

Sample	N	Mean	StDev	SE Mean
Phương pháp CE-C4D	2	1	0	0
Phương pháp UPLC-MS/MS	2	467	660	467

Estimation for Paired Difference

95% CI for

Mean StDev SE Mean $\mu_{\text{difference}}$

-467 660 467 (-6394, 5461)

$\mu_{\text{difference}}$: mean of (Phương pháp CE-C4D - Phương pháp UPLC-MS/MS)

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_{\text{difference}} = 0$

Alternative hypothesis $H_1: \mu_{\text{difference}} \neq 0$

T-Value P-Value

-1.00 0.500

PL8. Quy trình phân tích đồng thời glucosamin và canxi bằng phương pháp CE-C⁴D

1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn gốc
 - Cân chính xác 31,16 mg chất chuẩn (glucosamin hydroclorid độ tinh khiết 99,8%) chuyển vào bình định mức 25,00 mL và định mức đến vạch thu được dung dịch glucosamin 1000 mg/L. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở tủ mát, dung dịch gốc bền trong 6 tháng.
 - Dung dịch chuẩn Ca²⁺ 1000 mg/L (Merk)
- Dung dịch chuẩn làm việc
 - Pha loãng thích hợp để đường chuẩn nằm trong khoảng 0,5-100,0 mg/L
- Xây dựng đường chuẩn
 - Chạy các dung dịch chuẩn làm việc. Lập mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chuẩn thu được đường chuẩn. Hệ số tương quan $R^2 \geq 0,99$.

2. Chuẩn bị dung dịch đệm điện ly

Dung dịch điện ly axit acetic được pha loãng từ dung dịch axit acetic gốc và được thay mới hàng ngày.

3. Chuẩn bị mẫu

Mẫu TPCN (dạng viên nang) được tháo vỏ nang, lấy phân 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 0,0001g). Thêm 25 mL dung dịch acid trichloroacetic (TCA) 4% vào 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 μ m và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

4. Điều kiện phân tích

Các yếu tố	Điều kiện
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 50 cm, chiều dài hiệu dụng là 35 cm, đường kính trong là 50 μm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phong: 10 cm
Thời gian bơm mẫu	20 s
Dung dịch điện ly	Ace 200 mM
Thế tách	+15 kV

5. Tính toán kết quả

Kết quả được tính theo công thức sau:

$$A = B * 0.025 * \frac{M_A}{M_B} * \frac{KLV}{KLC} \quad (4)$$

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

KLV là khối lượng của 1 viên mẫu (mg)

KLC là khối lượng cân của mẫu (mg)

PL9. Quy trình phân tích đồng thời vitamin B₆ và magie bằng phương pháp CE-C⁴D

1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn gốc
 - Cân chính xác 12,63 mg vitamin B₆ (độ tinh khiết 99%) chuyển vào bình định mức 25,00 mL và định mức đến vạch thu được dung dịch vitamin B₆ nồng độ 500 mg/L. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở tủ mát, dung dịch gốc bền trong 6 tháng.
 - Cân chính xác 131,87 mg Mg(NO₃)₂.6H₂O (độ tinh khiết 98%) chuyển vào bình định mức 25,00 mL và định mức đến vạch thu được dung dịch Mg²⁺ nồng độ 500 mg/L. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở tủ mát, dung dịch gốc bền trong 6 tháng.
- Dung dịch chuẩn làm việc
Pha loãng thích hợp để đường chuẩn nằm trong khoảng 0,3-200,0 mg/L.
- Xây dựng đường chuẩn
Chạy các dung dịch chuẩn làm việc. Lập mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chuẩn thu được đường chuẩn. Hệ số tương quan $R^2 \geq 0,99$.

2. Chuẩn bị dung dịch đệm điện ly

Cân chính xác khoảng 174,22 mg Arg vào bình định mức 100 mL, thêm 20 mL ACN sau đó định mức đến vạch bằng nước deion. Chỉnh dung dịch đệm đến pH=5 bằng axit acetic trước khi sử dụng thu được dung dịch điện ly Arg 10 mM/Ace + 20% ACN; pH=5,0. Dung dịch đệm điện ly được pha mới hằng ngày.

3. Chuẩn bị mẫu

- Mẫu dược phẩm (dạng viên nén) được nghiền mịn và trộn đều. Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001g). Thêm 10 mL nước deion để hòa tan, tiến hành rung siêu âm trong 30 phút và ly tâm trong 15 phút. Chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 25 mL (tráng cốc ít nhất 3 lần bằng nước deion) và định mức tới vạch. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 μm và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết

bị CE-C4D.

- Mẫu TPCN (dạng viên nang) được tháo vỏ nang, lấy phần bên trong, nghiền mịn (nếu cần). Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001g). Thêm 25 mL dung dịch acid trichloroacetic (TCA) 4% vào 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.

4. Điều kiện phân tích

Yếu tố ảnh hưởng	Điều kiện tối ưu hóa
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 55 cm, chiều dài hiệu dụng 40 cm, đường kính trong ID=50 μm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phong
Chiều cao bơm mẫu	20 cm
Thời gian bơm mẫu	25 s
Dung dịch điện ly	Arg 10 mM/Ace + 20% ACN; pH=5,0
Thế tách	+20 kV

5. Tính toán kết quả

Kết quả được tính theo công thức sau: $A = B \cdot 0.025 \cdot \frac{M_A}{M_B} \cdot \frac{KLV}{KLC}$ (4)

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

KLV là khối lượng của 1 viên mẫu (mg)

KLC là khối lượng cân của mẫu (mg)

PL10. Quy trình phân tích đồng thời vitamin B₁, vitamin B₅ và vitamin B₉ bằng phương pháp CE-C⁴D

1. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn gốc
 - Cân chính xác khoảng 12,53 mg vitamin B₁ (độ tinh khiết 99,8%), pha loãng bằng nước deion vào bình định mức 100mL và định mức đến vạch thu được dung dịch vitamin B₁ nồng độ 500 mg/L. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở tủ mát, dung dịch gốc bền trong 6 tháng.
 - Cân chính xác khoảng 12,76 mg vitamin B₅ (độ tinh khiết 98%), pha loãng bằng nước deion vào bình định mức 100mL và định mức đến vạch thu được dung dịch vitamin B₅ nồng độ 500 mg/L. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở tủ mát, dung dịch gốc bền trong 6 tháng.
 - Cân chính xác khoảng 12,89 mg vitamin B₉ (độ tinh khiết 97%), pha loãng bằng nước deion vào bình định mức 100mL và định mức đến vạch thu được dung dịch vitamin B₉ nồng độ 500 mg/L. Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở tủ mát, dung dịch gốc bền trong 6 tháng.
- Dung dịch chuẩn làm việc
 - Pha loãng thích hợp để đường chuẩn nằm trong khoảng 3-150 mg/L.
- Xây dựng đường chuẩn
 - Chạy các dung dịch chuẩn làm việc. Lập mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chuẩn thu được đường chuẩn. Hệ số tương quan $R^2 \geq 0,99$.

2. Chuẩn bị dung dịch đệm điện ly

Cân chính xác khoảng 209,06 mg Arg vào bình định mức 100 mL, thêm 10 mL ACN sau đó định mức đến vạch bằng nước deion. Chỉnh dung dịch đệm đến pH=7,5 bằng axit acetic trước khi sử dụng thu được dung dịch điện ly Arg 12 mM/Ace + 10% ACN; pH = 7,5. Dung dịch đệm điện ly được pha mới hằng ngày.

3. Chuẩn bị mẫu

Mẫu TPCN (dạng viên nang) được tháo vỏ nang, lấy phần bên trong, nghiền mịn (nếu cần). Cân chính xác một lượng mẫu trên cân phân tích (độ chính xác 0,0001g). Thêm 10 mL Metaphosphoric 3% và 15 mL n-hexan, tiến hành rung siêu âm trong 30 phút cho tan hết và ly tâm trong 15 phút. Loại bỏ hết n-hexan và chuyển dung dịch thu được vào bình định mức 25 mL, định mức tới vạch bằng Metaphosphoric 3%. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 µm và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

4. Điều kiện phân tích

Các yếu tố	Điều kiện lựa chọn
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 50 cm, chiều dài hiệu dụng là 30 cm, đường kính trong là 50 µm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phong
Chiều cao bơm mẫu	15 cm
Thời gian bơm mẫu	30 s
Dung dịch điện ly	Arg 12 mM/ Ace + 10% ACN; pH = 7,5
Thế tách	+17 kV

5. Tính toán kết quả

Kết quả được tính theo công thức sau:

$$A = B * 0.025 * \frac{M_A}{M_B} * \frac{KLV}{KLC} \quad (4)$$

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

KLV là khối lượng của 1 viên mẫu (mg)

KLC là khối lượng cân của mẫu (mg)