



Original Article

Determination of Anti-Diabetic Drugs in Health Supplements by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method

Nguyen Thi Oanh^{1,2}, Hoang Quoc Anh¹, Vu Thi Trang³, Cao Cong Khanh³,
Nguyen Thi Hong Ngoc³, Mac Thi Thanh Hoa³, Dinh Viet Chien³, Le Thi Phuong
Thao³, Tran Cao Son³, Nguyen Thi Anh Huong¹, Le Thi Hong Hao^{3,*}

¹VNU University of Science, 19 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Food Administration, Ministry of Health, 135 Nui Truc, Ba Dinh, Hanoi, Vietnam

³National Institute for Food Control, 65 Pham Than Duat, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 11 April 2024

Revised 18 June 2024; Accepted June 2024

Abstract: The mixing of unpermitted drugs with health supplements to increase effectiveness can cause negative effects to consumers, requiring quality testing of these products. In this study, an analytical method for simultaneously determination of 5 anti-diabetic drugs (ADDs) (i.e., metformin, phenformin, buformin, glibenclamide, and gliclazide) in health supplement samples was developed with a combination of ultrasonic extraction, dispersive solid-phase extraction (d-SPE), and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Hard capsule, soft capsule, and liquid samples were extracted with methanol twice, followed by activated carbon addition for extract clean-up and LC-MS/MS quantification. The analytical method was validated through various factors such as: specificity, limit of detection, limit of quantification, linearity, repeatability, and recovery. The method had high precision (mean recovery from 88% to 99%, relative standard deviation lower than 10%) and low detection limit of 0.1 mg/kg, meeting the requirements of detection of these substances at trace to ultra-trace levels in complex sample matrices. The validated method was then applied to analyze concentrations of 5 ADDs in 30 health supplement samples. Metformin was detected at a concentration of 2.20 mg/kg in one hard capsule sample, while the remaining samples did not contain ADDs at detectable levels.

Keywords: Anti-obesity drug, health supplement, d-SPE, LC-MS/MS.

* Corresponding author.

E-mail address: haolth@nifc.gov.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5666>

Phân tích hàm lượng các chất hỗ trợ giảm đường huyết trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Nguyễn Thị Oanh^{1,2}, Hoàng Quốc Anh¹, Vũ Thị Trang³, Cao Công Khánh³, Nguyễn Thị Hồng Ngọc³, Mạc Thị Thanh Hoa³, Đinh Việt Chiến³, Lê Thị Phương Thảo³, Trần Cao Sơn³, Nguyễn Thị Ánh Hường¹, Lê Thị Hồng Hào^{3,*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội,
19 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Cục An toàn thực phẩm, Bộ Y tế, 135 Núi Trúc, Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, 65 Phạm Thận Duật, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 11 tháng 4 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 6 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày tháng 6 năm 2024

Tóm tắt: Tình trạng phối trộn các dược chất không được phép sử dụng trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) để tăng hiệu quả sử dụng có thể gây ra những tác hại xấu đến người tiêu dùng, đặt ra yêu cầu về kiểm nghiệm chất lượng các sản phẩm này. Quy trình phân tích đồng thời hàm lượng của 5 chất hỗ trợ giảm đường huyết (ADDs) (metformin, phenformin, buformin, glibenclamide và gliclazide) trong mẫu TPBVSK được nghiên cứu với sự kết hợp của kỹ thuật chiết siêu âm, chiết phân tán pha rắn (d-SPE) và sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS). Mẫu dạng viên nang cứng, viên nang mềm và lỏng được chiết với methanol 2 lần, dịch chiết sau đó được thêm than hoạt tính để làm sạch trước khi phân tích định lượng trên hệ thống LC-MS/MS. Giá trị sử dụng của phương pháp được xác nhận qua các yếu tố như: độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ thu hồi. Phương pháp có độ chính xác cao (độ thu hồi trung bình từ 88% đến 99%, độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 10%) và giới hạn phát hiện thấp ở mức 0,1 mg/kg, đáp ứng được yêu cầu xác định sự có mặt của các chất này ở mức hàm lượng vết đến siêu vết trong nền mẫu phức tạp. Phương pháp sau khi thẩm định được áp dụng để phân tích hàm lượng 5 chất AADs trong 30 mẫu TPBVSK. Metformin được phát hiện với mức hàm lượng 2,20 mg/kg trong một mẫu viên nang cứng, trong khi các mẫu còn lại đều không tìm thấy sự có mặt của ADDs.

Từ khóa: Chất hỗ trợ giảm đường huyết, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, d-SPE, LC-MS/MS.

1. Mở đầu

Tiểu đường hay đái tháo đường là một trong những căn bệnh lâu đời nhất mà con người biết đến, đây là một bệnh chuyển hóa thường được đặc trưng bởi sự gia tăng lượng đường trong máu cần được theo dõi thường xuyên và kiểm soát thích hợp [1]. Bệnh tiểu đường được chia

thành 2 nhóm là loại I và loại II. Trong khi tiểu đường loại I thường được điều trị bằng liệu pháp thay thế insulin, thì tiểu đường loại II được điều trị bằng thuốc hạ đường huyết đường uống [2]. Bên cạnh đó, các loại thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) có khả năng hỗ trợ giảm đường huyết cũng được sử dụng để phòng tránh hoặc cải thiện tình trạng sức khỏe của bệnh nhân tiểu đường [3]. Mặc dù các TPBVSK này được giới thiệu có nguồn gốc từ dược liệu tự nhiên và an toàn hơn so với thuốc đặc trị, một số vấn đề liên quan đến sử dụng và lạm

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: haolth@nifc.gov.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5666>

dụng các sản phẩm này ở bệnh nhân tiểu đường đã được báo cáo [4].

Một số nghiên cứu về chất hỗ trợ giảm đường huyết (anti-diabetic drugs, ADDs) đã được thực hiện trước đây trên đối tượng là các mẫu TPBVSK với nhiều phương pháp phân tích khác nhau như sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV-Vis, sắc ký lỏng khối phổ, sắc ký bản mỏng, điện di mao quản, cùng với các phương pháp phân tích quang học và điện hóa [5]. Trong số các phương pháp này, nhóm phương pháp sắc ký lỏng với detector khối phổ hai lần (LC-MS/MS) có độ chọn lọc, độ chính xác cao và giới hạn phát hiện thấp nên được sử dụng phổ biến để kiểm tra sự có mặt của các chất ADDs trong các mẫu TPBVSK [6-8], mẫu huyết tương của người [9] và mẫu nước sông [10]. Huang và cs. đã phân tích 8 chất ADDs (gliquidone, glibenclamide, glimepiride, sildenafil, repaglinide, glipizide, tadalafil và gliclazide) trong các mẫu TPBVSK hỗ trợ tiểu đường tại Trung Quốc bằng phương pháp LC-MS/MS và đã tìm thấy một số hoạt chất này trong 9/15 lô mẫu [6]. Zhou và cs. đã xác định 7 hợp chất ADDs (glipizide, tolbutamide, tolazamide, gliclazide, glibenclamide, glurenor và glimepiride) trong mẫu TPBVSK và thuốc đông y tại Trung Quốc, phát hiện được 3 mẫu dương tính với các chất glibenclamide (5,2 µg/kg), glimepiride (6,4 µg/kg) gliclazide (7,9 µg/g) [7]. Trong khi đó, Ma và cs. đã không phát hiện được sự có mặt của 14 hợp chất ADDs trong 80 mẫu TPBVSK có nguồn gốc thực vật tại Mỹ [8].

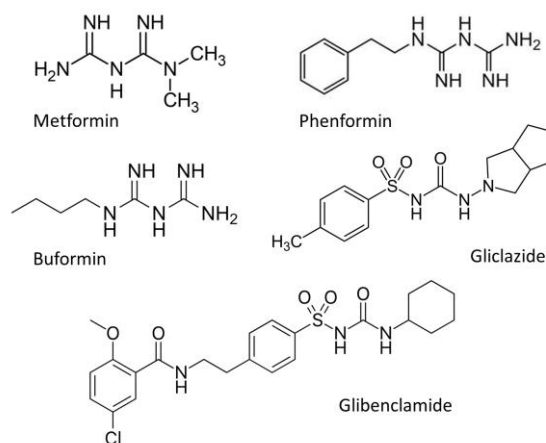
Trên cơ sở tìm kiếm thông tin từ các nguồn dữ liệu khoa học, chúng tôi chưa tìm thấy các nghiên cứu về sự có mặt của ADDs trong mẫu TPBVSK tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, phương pháp phân tích hàm lượng của 5 chất ADDs bao gồm metformin, phenformin, buformin, glibenclamide và gliclazide được nghiên cứu và thẩm định cho các nền mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm đường huyết. Quy trình phân tích bao gồm bước chiết siêu âm, làm sạch dịch chiết với kỹ thuật chiết phân tán pha rắn và định lượng trên hệ thống LC-MS/MS. Phương pháp sau khi thẩm định đã được áp dụng để

phân tích hàm lượng các ADDs trong một số mẫu TPBVSK trên thị trường Việt Nam. Các kết quả nghiên cứu này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn trong các lĩnh vực hóa học phân tích và kiểm nghiệm chất lượng TPBVSK.

2. Thực nghiệm

2.1. Chất chuẩn, hóa chất, thiết bị

Các chất chuẩn metformin hydrochloride (Met, độ tinh khiết 99,1%), phenformin hydrochloride (Phe, 98,8%), buformin hydrochloride (Buf, 99,1%), glibenclamide (Glb, 99,2%) và gliclazide (Glc, 99,9%) được cung cấp bởi hãng LGC Standards Ltd. Dung dịch chuẩn gốc của mỗi chất phân tích được chuẩn bị bằng cách hòa tan 10 mg từng chất chuẩn trong 10 mL methanol và bảo quản ở -20°C trong các lọ thủy tinh tối màu có nắp kín, dung tích 15 mL. Các dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị từ dung dịch chuẩn gốc bằng cách pha loãng với methanol. Công thức cấu tạo của các chất phân tích được thể hiện trong Hình 1. Các hóa chất tinh khiết phân tích khác được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: methanol, acetonitril, acid formic, ammonium formate, nước tinh khiết sắc ký (Merck KGaA) và bột carbon graphite (Carbon SPE Bulk Sorbent, Agilent Technologies).



Hình 1. Công thức cấu tạo của các ADDs trong nghiên cứu này.

Hệ thống Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS (Agilent Technologies) được sử dụng trong nghiên cứu để tách và định lượng các ADDs với cột tách pha đảo Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (150 mm × 3 mm × 3,5 μm) và tiền cột ZORBAX Eclipse XDB-C18 (12,5 mm × 4,6 mm × 5 μm). Các thiết bị xử lý mẫu bao gồm: cân phân tích và cân kỹ thuật (Mettler Toledo), máy đồng nhất mẫu (Phillips), máy rung siêu âm (Elma), máy lắc xoay vortex (IKA) và máy li tâm (Hettich).

2.2. Mẫu nghiên cứu

Các thí nghiệm khảo sát quy trình xử lý mẫu được thực hiện trên mẫu thêm chuẩn với lượng chính xác của các chất phân tích được thêm vào các nền mẫu đại diện, bao gồm mẫu viên nang cứng, viên nang mềm và mẫu lỏng (đã được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS không phát hiện các chất phân tích trong mẫu). Mẫu viên nang cứng được xay nghiền và trộn đều bằng máy đồng nhất mẫu. Mẫu viên nang mềm được tách bỏ phần vỏ nang để lấy phần ruột và trộn đều. Mẫu lỏng được lắc trộn đều trước khi phân tích. Bên cạnh đó, các mẫu TPBVSK ($n = 30$) cũng được thu thập để chứng minh hiệu quả áp dụng của phương pháp phân tích, bao gồm 10 mẫu viên nang cứng, 10 mẫu viên nang mềm và 10 mẫu lỏng.

2.3. Nghiên cứu điều kiện LC-MS/MS

Điều kiện phân tích ADDs trên detector khối phổ hai lần được tối ưu và lựa chọn tự động trên thiết bị bằng cách tiêm trực tiếp dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 100 ng/mL vào detector (không qua cột tách) ở chế độ ion hóa phun điện tích dương (ESI) và quan sát đa phản ứng (MRM). Các điều kiện được tối ưu bao gồm: thế phun ion (ion spray voltage), nhiệt độ khí, lưu lượng dòng khí, áp suất nebulizer và các tín hiệu mảnh ion định lượng, định tính của các chất phân tích. Điều kiện pha động cũng được nghiên cứu để có được hiệu quả tách và tín hiệu phân tích tốt, bao gồm thành phần pha động và chương trình gradient.

2.4. Khảo sát điều kiện chiết mẫu

Hiệu quả chiết ADDs từ nền mẫu viên nang cứng, viên nang mềm và dạng lỏng được đánh

giá cho 3 dung môi là methanol, acetonitril và nước trên mẫu thêm chuẩn (ở mức hàm lượng 0,1 mg/kg). Điều kiện chiết được lựa chọn dựa trên độ thu hồi cao nhất của chất phân tích trong từng nền mẫu. Mẫu thêm chuẩn cũng được chiết lặp đến 3 lần để tìm ra số lần chiết tối thiểu đảm bảo được độ thu hồi tốt.

2.5. Khảo sát điều kiện làm sạch dịch chiết

Điều kiện làm sạch dịch chiết mẫu với bột carbon graphite cũng được khảo sát để tìm ra lượng chất hấp phụ cần thiết với 3 mức là 25 mg, 50 mg và 100 mg. Thí nghiệm khảo sát được thực hiện trên 10 mL dịch chiết mẫu trong methanol (dung môi chiết được lựa chọn ở bước khảo sát điều kiện chiết mẫu) được thêm chuẩn các chất ADDs ở mức nồng độ 0,1 mg/L. Lượng chất hấp phụ được lựa chọn ứng với độ thu hồi cao nhất của các chất phân tích.

2.6. Thẩm định phương pháp

Phương pháp phân tích được thẩm định với các yếu tố như: độ đặc hiệu (đánh giá thông qua số điểm nhận dạng IP), giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) (đánh giá thông qua tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu S/N của mẫu thêm chuẩn ở mức hàm lượng 0,1 mg/kg), độ tuyến tính và đường chuẩn, độ thu hồi và độ lặp lại (xác định thông qua thí nghiệm phân tích lặp lại $n = 6$ các mẫu thêm chuẩn với 3 mức hàm lượng thêm chuẩn là 1,0; 5,0 và 10,0 mg/kg). Phương trình đường chuẩn của các chất mô tả sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích peak vào nồng độ của chất và có dạng $S = a \times C + b$, trong đó S là diện tích peak, C là nồng độ, a và b là hằng số.

2.7. Công thức tính hàm lượng và độ thu hồi

Hàm lượng (mg/kg) của các chất phân tích trong mẫu được tính theo công thức: $A = C \times V \div m$, trong đó C là nồng độ chất trong dịch chiết mẫu (xác định theo phương pháp ngoại chuẩn dựa trên phương trình đường chuẩn, mg/L), V là thể tích dịch chiết mẫu (L) và m là khối lượng mẫu (kg).

Độ thu hồi (%) của các chất phân tích trong mẫu thêm chuẩn để khảo sát các bước chiết mẫu và làm sạch dịch chiết được xác định theo

công thức: $R\% = (C \div C_0) \times 100\%$, trong đó C là hàm lượng đo được và C₀ là hàm lượng thêm chuẩn.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Điều kiện MS/MS

Các điều kiện tối ưu của hệ thống LC-MS/MS cho phân tích ADDs được tối ưu tự động sử dụng phần mềm của hệ thiết bị, bao gồm: i) Thế phun ion 4000 V; ii) Nhiệt độ khí 300 °C; iii) Lưu lượng dòng khí 11 L/phút và iv) Áp suất nebulizer 15 psi. Tín hiệu mảnh ion định lượng, định tính và thể va chạm của từng chất phân tích được trình bày trong Bảng 1.

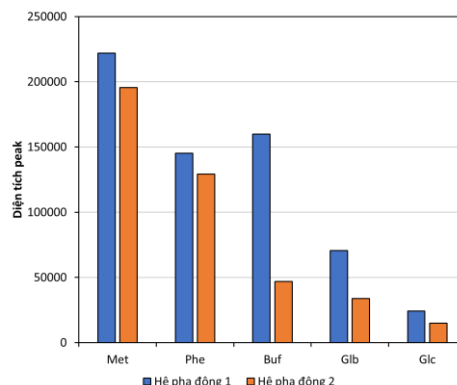
Bảng 1. Điều kiện MS/MS của các ADDs

Chất	Tín hiệu mảnh ion (định lượng, định tính)	Thế va chạm (eV)
Met	130 → 60, 130 → 71	52, 76
Buf	158 → 60, 158 → 43	12, 32
Phe	206 → 60, 206 → 105	32, 16
Glc	324 → 91, 324 → 65	20, 20
Glb	494 → 369, 494 → 169	48, 12

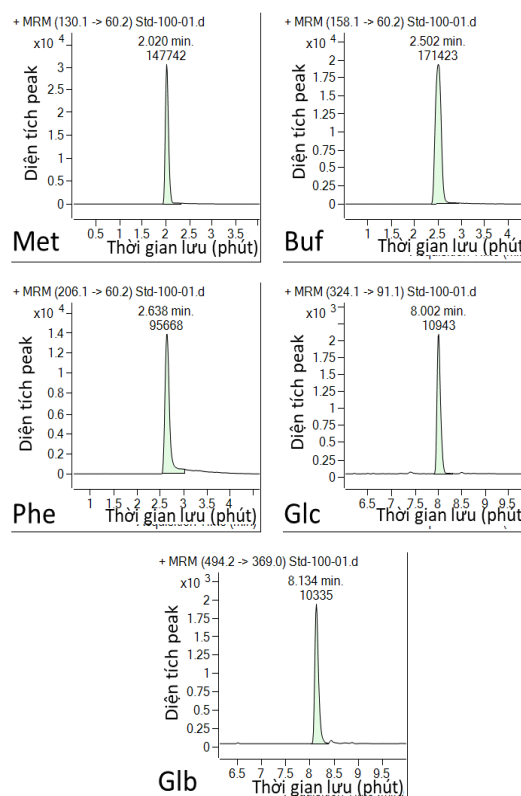
3.2. Điều kiện sắc ký lỏng (LC)

Hai hệ pha động được khảo sát bao gồm: hệ pha động 1 (kênh A: dung dịch acid formic 0,1%, kênh B: acetonitril) và hệ pha động 2 (kênh A: dung dịch đệm ammonium format 10 mM trong acid formic 0,1%, kênh B: acetonitril). Diện tích peak của tất cả 5 chất ADDs trong dung dịch chuẩn 0,1 mg/L đạt được khi sử dụng hệ pha động 1 đều lớn hơn so với hệ pha động 2 (Hình 2), vì vậy hệ pha động gồm kênh A: dung dịch acid formic 0,1% và kênh B: acetonitril được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo để đảm bảo khả năng phát hiện chất ở mức nồng độ thấp.

Tốc độ dòng pha động là 0,4 mL/phút. Chương trình rửa giải gradient được cài đặt như sau: 0–2 phút (90% A), 2–3 phút (giảm 90% A đến 10% A), 3–7 phút (10% A), 7–8 phút (tăng 10% A đến 90% A), 8–10 phút (90% A). Thể tích bơm mẫu là 5 µL. Sắc đồ của các chất phân tích được trình bày trong Hình 3.



Hình 2. Ảnh hưởng của thành phần pha động đến tín hiệu của các ADDs.



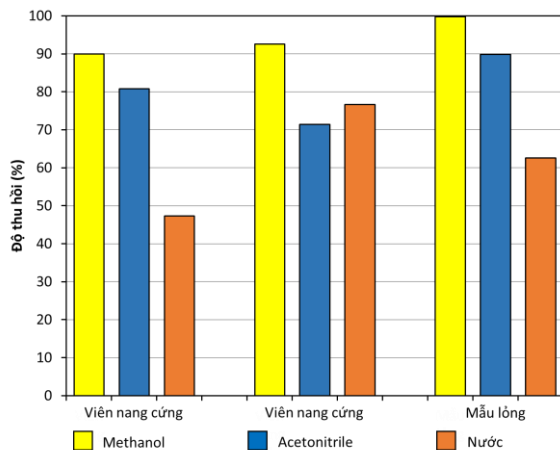
Hình 3. Sắc đồ của các ADDs trong dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1 mg/L.

Thời gian lưu của các chất Met, Buf, Phe, Glc và Glb lần lượt là 2,020; 2,502; 2,638; 8,002 và 8,134 phút. Tín hiệu của các chất được quan sát trên sắc đồ có dạng peak cân đối, chân peak hẹp, phản ánh hiệu quả tách tốt của

phương pháp sắc ký. Quá trình tách diễn ra tương đối nhanh với thời gian phân tích khoảng 10 phút.

3.3. Điều kiện chiết mẫu

Lựa chọn dung môi chiết là bước khảo sát quan trọng vì hiệu quả chiết chất phân tích từ nền mẫu có liên quan trực tiếp đến độ chính xác của phương pháp. Việc lựa chọn dung môi chiết cần chú ý đến các yếu tố sau đây: i) Độ hòa tan của chất phân tích trong các dung môi khác nhau; ii) Khả năng xâm nhập của dung môi vào nền mẫu; iii) Khả năng chiết chọn lọc của dung môi (hạn chế chiết các chất cản trở có mặt trong nền mẫu); và iv) Kỹ thuật chiết (năng lượng hỗ trợ quá trình chiết, tỉ lệ mẫu và thể tích dung môi, số lần chiết). Trong nghiên cứu này, dung môi methanol cho hiệu quả chiết cao nhất đối với cả 3 nền mẫu là viên nang cứng, viên nang mềm và mẫu lỏng (Hình 4). Sau 2 lần chiết, bã mẫu tiếp tục được chiết lần 3 với methanol nhưng lượng chất chiết được không đáng kể. Do đó, điều kiện chiết được lựa chọn như sau: mẫu (1 g hoặc 1 mL) được chiết 2 lần, mỗi lần với 20 mL methanol (lắc vortex 1 phút, siêu âm 15 phút). Các phần dịch chiết sau đó được gộp chung và định mức đến 50 mL.



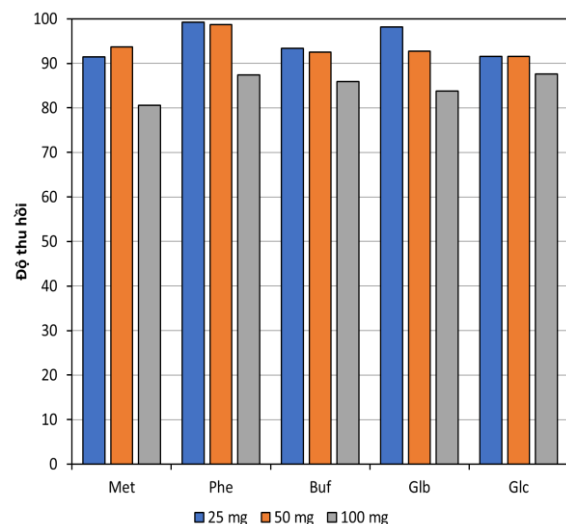
Hình 4. Độ thu hồi của bufonin trong các nền mẫu TPBVSK thêm chuẩn với các dung môi khác nhau.

Chiết siêu âm với methanol cũng là phương pháp được sử dụng trong một số nghiên cứu trước đây về các chất ADDs trong TPBVSK

[7, 8]. Zhou và cs. đã tiến hành chiết mẫu TPBVSK dạng viên nang (1 g) với methanol 2 lần, mỗi lần với 10 mL dung môi và siêu âm trong 30 phút, dịch chiết sau đó được cô đặc dưới dòng khí N_2 và hòa tan trong 1 mL dung môi pha động [7]. Ma và cs. đã chiết mẫu TPBVSK (0,5 g) với 40 mL methanol và rung siêu âm trong 30 phút, dịch chiết thu được sau đó pha loãng với methanol [8]. Như vậy, methanol là dung môi phù hợp để chiết các ADDs từ nền mẫu TPBVSK. Methanol có nhiệt độ sôi (64,7 °C) thấp hơn so với acetonitril (82 °C) và nước (100 °C) nên có thể dễ dàng cô đặc nếu quy trình yêu cầu cần phải làm giàu mẫu trước khi phân tích.

3.4. Điều kiện làm sạch dịch chiết mẫu

Do các nền mẫu TPBVSK có nguồn gốc từ dược liệu thực vật thường chứa nhiều flavonoid, acid phenolic, sắc tố thực vật, có khả năng hòa tan trong methanol, dịch chiết từ mẫu TPBVSK nếu không được xử lý để loại bỏ tạp chất sẽ gây ảnh hưởng đến tín hiệu của chất phân tích, gây nhiễu bản cột tách và các bộ phận của hệ thống sắc ký. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật chiết phân tán pha rắn (d-SPE) với chất hấp phụ carbon graphite được sử dụng để làm sạch dịch chiết trước khi phân tích trên hệ thống LC-MS/MS.



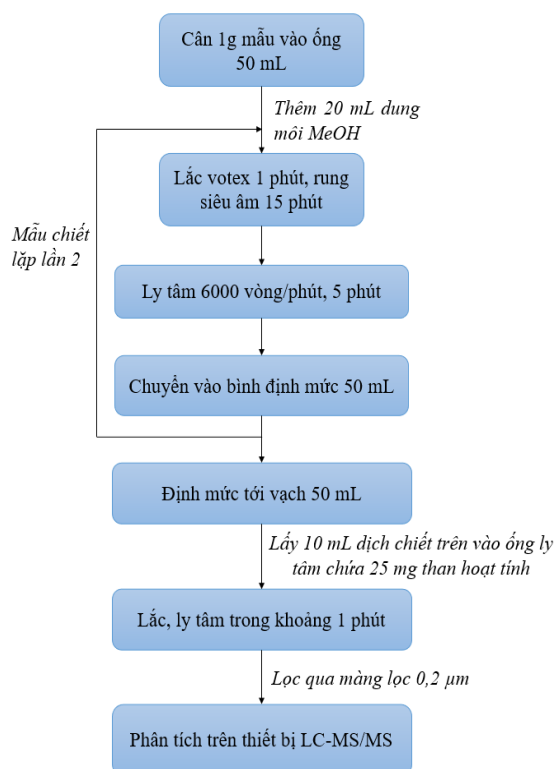
Hình 5. Độ thu hồi của ADDs trong kỹ thuật d-SPE với lượng chất hấp phụ carbon khác nhau.

Kỹ thuật d-SPE có ưu điểm như thao tác đơn giản, nhanh, hiệu quả và chi phí thấp. Chất hấp phụ được thêm trực tiếp vào dịch chiết, quá trình phân tán được hỗ trợ với thao tác lắc xoay trên máy vortex, sau đó hỗn hợp mẫu được li tâm và phân chất lỏng có thể được phân tích trên thiết bị. Kết quả khảo sát lượng chất hấp phụ carbon cho thấy, khi tăng lượng chất từ 25 mg đến 100 mg thì độ thu hồi của các chất phân tích nhìn chung giảm dần (Hình 5), trong khi hiệu quả làm sạch không có sự khác biệt đáng kể. Do đó, dịch chiết mẫu được làm sạch theo quy trình như sau: 10 mL dịch chiết mẫu trong methanol được thêm 25 mg carbon, lắc xoay trên máy vortex, li tâm và thu lấy phần dịch, và phân tích bằng thiết bị LC-MS/MS.

3.5. Thẩm định phương pháp

Độ đặc hiệu là yếu tố cơ bản quyết định độ chính xác của kết quả phân tích. Trong nghiên cứu này, mỗi chất phân tích đều được quan sát và ghi nhận tín hiệu với 1 mảnh ion mẹ và 2 mảnh ion con, tương ứng với 2 dãy chuyển khối (mass transition). Số điểm nhận dạng IP bằng 5 đã đáp ứng được yêu cầu phân tích bằng phương pháp sắc ký sử dụng detector khối phổ. Điều này có nghĩa là nguy cơ mắc phải sai số dương của phương pháp là thấp do chất phân tích được quan sát với các mảnh ion và dãy chuyển khối đặc trưng, giúp loại bỏ được ảnh hưởng của các tín hiệu cản trở có trong nền mẫu. Đường chuẩn của các ADDs được dựng với dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 0,02; 0,05; 0,10; 0,50 và 1,00 mg/L, cho phương trình hồi quy với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các ADDs đạt được ở mức 0,1 mg/kg và 0,3 mg/kg, tương ứng. Các giá trị giới hạn này đáp ứng được yêu cầu phân tích lượng vết các ADDs trong nền mẫu TPBVSK. Theo quy định tại Công văn số 1790/ATTP-KN ngày 03/8/2023 của Cục An toàn thực phẩm về việc thống nhất LOD của một số phương pháp kiểm nghiệm chất cấm trong TPBVSK, phương pháp phân tích các chất cấm nhóm tiểu đường (phenformin, buformin, metformin, glibenclamide, glimepiride) cần đạt LOD là 0,1 mg/kg và LOQ là 0,3 mg/kg.



Hình 6. Quy trình xử lý mẫu TPBVSK cho phân tích các chất hỗ trợ giảm đường huyết.

Độ đúng và độ chụm của phương pháp phân tích được xác định dựa trên độ thu hồi và độ lệch chuẩn tương đối của kết quả phân tích mẫu TPBVSK thêm chuẩn ADDs với các mức hàm lượng khác nhau. Quy trình xử lý mẫu được tóm tắt trong Hình 6. Dung dịch mẫu và các dung dịch chuẩn để dựng đường chuẩn được phân tích trên hệ thống LC-MS/MS với các điều kiện được đưa ra trong Bảng 1. Độ thu hồi của các chất được xác định dựa trên công thức đưa ra ở Mục 2.7. Kết quả độ thu hồi và độ lặp lại cho các chất ADDs ở mức hàm lượng thêm chuẩn 1,0; 5,0 và 10,0 mg/kg được trình bày trong Bảng 2. Độ thu hồi của các chất dao động từ 88% đến 99% và độ lệch chuẩn tương đối đều nhỏ hơn 10%, cho thấy phương pháp có độ chính xác cao. Độ thu hồi của các ADDs trong nghiên cứu này có khoảng giá trị tương đương với một số nghiên cứu trước đây thực hiện tại Trung Quốc (74%–112%) [6] và Mỹ (88%–113%) [8].

Bảng 2. Độ thu hồi và độ lệch chuẩn tương đối của các ADDs trong mẫu TPBVSK thêm chuẩn ở các mức hàm lượng 1, 5 và 10 mg/kg

Chất	Độ thu hồi và độ lệch chuẩn		
	Mức 1 mg/kg	Mức 5 mg/kg	Mức 10 mg/kg
Met	86,9% (4,5%)	91,5% (4,1%)	89,5% (2,6%)
Buf	90,3% (5,8%)	97,9% (8,3%)	90,0% (7,5%)
Phe	97,9% (4,2%)	97,1% (3,9%)	92,9% (4,9%)
Glc	90,5% (6,8%)	91,1% (3,9%)	88,0% (6,3%)
Glb	90,9% (9,0%)	99,0% (6,0%)	98,2% (7,0%)

3.6. Áp dụng phân tích mẫu thực tế

Quy trình phân tích sau khi đã thẩm định được áp dụng để phân tích 30 mẫu TPBVSK ứng với 3 dạng bào chế là viên nang cứng ($n = 10$), viên nang mềm ($n = 10$) và dạng lỏng ($n = 10$). Các chất Buf, Phe, Glc và Glb không được tìm thấy trong bất kì mẫu nào. Met được tìm thấy trong một mẫu viên nang cứng ở mức hàm lượng 2,20 mg/kg. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy các TPBVSK hỗ trợ giảm đường huyết không được thêm các ADDs một cách phổ biến. Huang và cs. đã phát hiện được 2 chất ADDs trong mẫu TPBVSK tại Trung Quốc, bao gồm glibenclamide (6/15 mẫu, hàm lượng 46,4–1714 mg/kg) và glimepiride (1/15 mẫu, 1303 mg/kg) [6]. Giá trị hàm lượng 2,20 mg/kg metformin tìm thấy trong mẫu của chúng tôi nằm ở mức thấp so với các kết quả của Huang và cộng sự [6]. Trong khi đó, Zhou và cộng sự tìm thấy các hợp chất như: glibenclamide (5,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), glimepiride (6,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) và gliclazide (7,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ở mức hàm lượng thấp hơn đáng kể, trong một số mẫu TPBVSK và thuốc đông y tại Trung Quốc [7].

4. Kết luận

Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam xác định hàm lượng của các chất

hỗ trợ giảm đường huyết trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe ở mức hàm lượng cỡ mg/kg. Quy trình phân tích đơn giản, hiệu quả và có độ chính xác cao đã được thẩm định và áp dụng để phân tích một số lượng mẫu thực tế tương đối lớn. Trong số các chất ADDs được nghiên cứu, metformin là chất duy nhất được tìm thấy trong một mẫu TPBVSK dạng viên nang cứng. Mặc dù số lượng mẫu dương tính với ADDs và mức hàm lượng đo được không cao, sự có mặt của các hợp chất này trong TPBVSK đặt ra yêu cầu về kiểm soát chất lượng các sản phẩm này. Các nghiên cứu tiếp theo về sự có mặt và mức hàm lượng của ADDs trong nhóm TPBVSK hỗ trợ giảm đường huyết là rất cần thiết.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 104.04-2021.38.

Tài liệu tham khảo

- [1] S. Y. Tan, J. L. M. Wong, Y. J. Sim, S. S. Wong, S. A. M. Elhassan, S. H. Tan, G. P. L. Lim, N. W. R. Tay, N. C. Annan, S. K. Bhattamisra, M. Candasamy, Type 1 and 2 Diabetes Mellitus: A Review on Current Treatment Approach and Gene Therapy as Potential Intervention, *Diabetes Metabol, Syndr. Clin. Res. Rev.*, Vol. 13, 2019, pp. 364-372, <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>.
- [2] S. Padhi, A. K. Nayak, A. Behera, Type II Diabetes Mellitus: A Review on Recent Drug Based Therapeutics, *Biomed, Pharmacother*, Vol. 131, 2020, pp. 110708, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708>.
- [3] X. Meng, Q. Li, R. Shi, J. Chang, H. Chang, M. Li, Food Supplements could be an Effective Improvement of Diabetes Mellitus: A Review, *J. Future Foods*, Vol. 1, 2021, pp. 67-81, <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.09.003>.
- [4] B. A. Hannon, W. D. Fairfield, B. Adams, T. Kyle, M. Crow, D. M. Thomas, Use and Abuse of Dietary Supplements in Persons with Diabetes, *Nutr. Diabetes*, Vol. 10, 2020, pp. 14, <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0117-6>.

- [5] A. Gumieniczek, A. Berecka, Analytical Tools for Determination of New Oral Antidiabetic Drugs, Glitazones, Gliptins, Gliflozins and Glinides, in Bulk Materials, Pharmaceuticals and Biological Samples, *Open Chemistry*, Vol. 14, 2016, pp. 215-242, <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0023>.
- [6] X. Huang, J. Wang, J. Cao, Q. Zhang, Determination of 8 Drugs in Antidiabetic Supplements: A Case Study, *Food Sci.*, Vol. 35, 2014, pp. 149-152, <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201410027>.
- [7] C. Zhou, B. Tang, C. Xi, L. Zhang, G. Wang, J. Xi, Z. Chen, Simultaneous Determination of Seven Sulfonylurea-Type Oral Anti-Diabetic Agents in Adulterated Dietary Supplements and Traditional Chinese Medicines by Ultrapformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Spectrosc. Lett.*, Vol. 48, pp. 163-169, <https://doi.org/10.1080/00387010.2013.866965>.
- [8] J. Ma, R. S. Pawar, E. Grundel, Validation of an LC–MS/MS Method for Analysis of Anti-diabetic Drugs in Botanical Dietary Supplements Labeled for Blood Sugar Management, Vol. 10, 2017, pp. 609-617, <https://doi.org/10.1002/dta.2254>.
- [9] S. Kai, K. Ishikawa, H. Ito, T. Ogawa, H. Yamashita, Y. Nagata, H. Kanazawa, Simultaneous Analysis of Oral Antidiabetic Drug by LC-MS/MS, *Chromatogr.*, Vol. 36, 2015, pp. 19-24, <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2015.003>.
- [10] H. N. Mistri, A. G. Jangid, P. S. Shrivastav, Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Antidiabetic Drugs Metformin and Glyburide in Human Plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Vol. 45, 2007, pp. 97-106, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.003>.