

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

Nguyễn Thị Oanh

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ CHẤT CẤM TRONG
THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE HỖ TRỢ GIẢM CÂN,
CHỨC NĂNG SINH LÝ VÀ TIÊU ĐƯỜNG

Chuyên ngành: **Hóa phân tích**

Mã số: **9440112.03**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2024

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS. TS. Lê Thị Hồng Hào
2. PGS. TS. Nguyễn Thị Ánh Hương

Phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh, Trường Đại học Dược Hà Nội

Phản biện: PGS.TS. Lê Thị Phương Quỳnh, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện: PGS.TS. Phạm Thị Mai Hương, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Lý do lựa chọn đề tài

Trong những năm gần đây, việc sử dụng các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) ngày càng gia tăng bởi sự tiện dụng và hiệu quả của các sản phẩm này, đặc biệt các sản phẩm có chức năng hỗ trợ giảm cân, tăng cường sinh lý nam, hỗ trợ bệnh xương khớp, tiểu đường... Tuy nhiên, một số nhà sản xuất với mục đích muốn tăng nhanh hiệu quả của sản phẩm, đã phối trộn thêm các chất cấm, ảnh hưởng đến sức khỏe người sử dụng. Nhóm chất này nằm trong danh mục thuốc kê đơn, khi được sử dụng không có kiểm soát, sẽ gây ra các tác dụng phụ ảnh hưởng nguy hại đến sức khỏe người sử dụng. Trong đó, các hoạt chất ức chế PDE5 có thể gây ra các tác dụng không mong muốn trên cơ thể như: chóng mặt, tức ngực, khó thở, rối loạn tiêu hóa,... Sibutramin làm tăng áp lực máu, nhịp tim và thường tăng nguy cơ đau tim cũng như đột quỵ. Các chất điều hòa đường huyết có tương tác mạnh với nhau khi dùng cùng, đặc biệt gây nguy hiểm đến tính mạng cho người sử dụng đang có bệnh lý nền và dùng nhiều loại thuốc khác nhau.

Mặc dù đã có một số nghiên cứu được tiến hành với các nhóm chất khác nhau, nhưng hầu hết là các quy trình riêng rẽ cho từng nhóm chất hoặc các quy trình cho một số lượng hạn chế các chất. Ngoài ra, sự đa dạng của kỹ thuật phân tích còn hạn chế nên khả năng ứng dụng rộng rãi chưa cao. Sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HR/MS) và sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS) là lựa chọn tối ưu nhằm phân tích sàng lọc đồng thời, phát hiện và định lượng các chất phân tích trong TPBVSK. Trên cơ sở đó, đề tài "*Nghiên cứu xác định một số chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cân, chức năng sinh lý và tiểu đường*" đã được thực hiện nhằm góp phần vào

việc phát triển phương pháp phân tích trong kiểm soát các dược chất trộn lẫn trong TPBVSK nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm và bảo vệ người tiêu dùng.

2. Mục tiêu của luận án

Nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích các chất cấm trong TPBVSK với hai mục tiêu:

- Nghiên cứu phát triển phương pháp sắc lý lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS và sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS để sàng lọc và định lượng một số chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cân, chức năng sinh lý và tiểu đường.
- Áp dụng các phương pháp để xác định một số chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.

3. Nội dung của luận án

- Xây dựng quy trình LC-HR/MS phân tích sàng lọc các chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường: Khảo sát điều kiện HR/MS, điều kiện sắc ký lỏng và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.

- Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý: Khảo sát điều kiện LC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý.

- Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân: Khảo sát điều kiện LC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân.

- Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiêu đường: Khảo sát điều kiện LC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ tiêu đường.

4. Những đóng góp mới của luận án

❖ Về mặt khoa học

Nghiên cứu sử dụng các phương pháp phân tích hiện đại, có độ nhạy và độ chính xác cao như: sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HR/MS) để sàng lọc đồng thời và phát hiện các chất mới; phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) để định lượng các chất trộn trái phép trong TPBVSK. Đây là hướng nghiên cứu không chỉ có tính mới, ý nghĩa trong khoa học, mà còn mang tính toàn diện, góp phần nâng cao chất lượng công tác kiểm nghiệm an toàn thực phẩm, bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng. Nghiên cứu đã phát hiện 1 chất mới và phối hợp với các nhà khoa học Singapore xác định hợp chất mới là N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil, góp phần cập nhật vào thư viện phổ của các thiết bị khối phổ phân giải cao (HR/MS).

❖ Về mặt thực tiễn

Số lượng các chất cấm trộn trái phép trong TPBVSK ngày càng đa dạng và phức tạp. Quá trình tổng hợp các chất này dẫn tới xuất hiện nhiều chất với dẫn xuất khác nhau ở một hay vài nhóm thế. Các chất mới sinh ra này có hoạt độ, tác dụng tương tự với các chất gốc nên có thể được phân lập và sử dụng trong sản phẩm gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm nếu chỉ sử dụng các phương pháp truyền thống. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS phân tích chính xác cấu trúc của chất phân tích cũng

như tìm kiếm các chất mới dựa trên cấu trúc khung của nhóm chất đã giải quyết được vấn đề trên. Quy trình này có thể áp dụng tại các phòng kiểm nghiệm tuyến trung ương và các phòng kiểm nghiệm trọng điểm cấp khu vực, những nơi có đầy đủ trang thiết bị hiện đại để tiến hành phân tích đảm bảo kết quả chính xác cao.

Kết quả phân tích các mẫu TPBVSK trên thực tế đưa ra các bằng chứng và khuyến nghị cho các nhà quản lý trong quá trình cập nhật và xây dựng văn bản quản lý chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 216 trang với 26 hình và sắc ký đồ; 25 bảng số liệu và 124 tài liệu tham khảo. Luận án được cấu tạo gồm: 10 trang danh mục các bảng biểu, hình vẽ, sắc đồ, đồ thị và mục lục, 4 trang mở đầu, 47 trang tổng quan tài liệu, 19 trang thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu, 65 trang kết quả nghiên cứu và thảo luận, 2 trang kết luận. Ngoài ra, luận án còn có 1 trang danh mục công trình của tác giả có liên quan đến luận án, 14 trang tài liệu tham khảo và 58 trang phụ lục.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Chương này đề cập đến các nội dung như sau:

Tổng quan về chất cấm trong TPBVSK, chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý, chất cấm hỗ trợ giảm cân, chất cấm hỗ trợ tiểu đường.

Tổng quan về các phương pháp xác định chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý, hỗ trợ giảm cân và hỗ trợ tiểu đường trong TPBVSK: phương pháp điện hóa, quang phổ hấp thụ phân tử, điện di mao quản, sắc ký.

Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ được giới thiệu cụ thể với hệ thống sắc ký lỏng và khối phổ phân giải cao.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

Phương pháp phân tích: Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS và phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần LC-MS/MS.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình LC-HR/MS sàng lọc một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

3.1.1. Khảo sát điều kiện HR/MS phân tích chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

3.1.1.1. Tìm kiếm mảnh phổ các chất phân tích

Dựa vào cấu trúc của các chất phân tích, nghiên cứu tiến hành tiêm 10 μ L dung dịch chuẩn hỗn hợp 1 μ g/mL vào thiết bị HR/MS đo mảnh phổ thực nghiệm bằng chế độ Fullscan đối với mảnh mẹ và dd-dependent MS2 đối với mảnh con sử dụng chế độ ion hóa phun điện tử dương ESI (+). Kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.1 với điều kiện khối phổ bao gồm:

- Full MS-dd-MS²:
 - Độ phân giải MS: 70000 (FWHM)
 - Khoảng khối: m/z 220 - 1100
 - Độ phân giải MS²: 17500 (FWHM)
 - Năng lượng va chạm tương đối (NCE): 30%.
- AIF:
 - Độ phân giải: 70000 (FWHM)
 - Khoảng khối: 50 - 750

- Năng lượng va chạm tương đối (NCE): 40%, 70% và 100%

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát một số mảnh phổ ion mẹ và ion con của các chất cấm

| TT | Tên chất | Mảnh mẹ (m/z) | Mảnh con (m/z) |
|-----------|--------------------|----------------------|--|
| 1 | Acetaminotadalafil | 433,15065 | 204,08078; 262,08626; 135,04406; 205,0886; 233,08352; 232,07569; 169,07602; 191,07295; 263,09408; 250,08626 |
| 2 | Acetildenafil | 467,27652 | 111,09167; 97,07602; 70,06513; 84,08078; 72,08078; 127,12297; 112,09950; 297,13460; 56,04948; 166,09749 |
| 3 | Avanafil | 484,18584 | 155,02582; 375,12184; 105,03349; 77,03858; 95,04914; 53,03858; 357,11128; 233,10330; 67,05423; 221,10330 |
| 4 | Homosildenafil | 489,22785 | 72,08078; 58,06513; 99,09167; 113,10732; 70,06513; 283,11895; 84,08078; 71,07295; 114,11515; 311,15025 |
| 5 | Nortadalafil | 376,12918 | 204,08078; 262,08626; 135,04406; 233,08352; 232,07569; 169,07602; 191,07295; 254,09240; 250,08626 |
| 6 | Sildenafil | 475,21220 | 58,06513; 100,0995; 99,09167; 56,04948; 283,11895; 70,06513; 311,15025; 225,07709; 299,11387 |
| 7 | Tadalafil | 390,14483 | 204,08078; 135,04406; 262,08626; 169,07602; 205,08861; 232,07569; 233,08352; 240,11314; 268,10805; 250,08626 |
| 8 | Sibutramin | 280,18237 | 125,01525; 139,03096; 103,05428; 153,04664; 97,10118; 179,06220; 83,08553; 103,05423 |

| TT | Tên chất | Mảnh mẹ (m/z) | Mảnh con (m/z) |
|----|--------------|---------------|---|
| 9 | Metformin | 130,10872 | 60,05562; 71,06043; 85,05091; 96,05560; 113,08220; 88,08629; 56,03760; 68,02431 |
| 10 | Phenformin | 206,14002 | 60,05563; 164,11830; 85,05080; 105,06991; 189,11356; 147,09160; 103,05430; 79,05428 |
| 11 | Glibenclamid | 494,15110 | 55,05484; 100,11210; 169,00517; 198,03165; 259,05195; 304,07351; 369,06702; 414,12357 |
| 12 | Gliclazid | 324,13764 | 110,09643; 119,06048; 127,12302; 153,10220; 168,11315; 80,07007; 93,07029; 91,05423; 65,03860 |

3.1.1.2. Tìm kiếm mảnh phổ lý thuyết

Trong số các chất cấm được nghiên cứu, các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý được xem là phức tạp nhất do sự đa dạng của chúng. Ban đầu chỉ một số chất như: sildenafil, tadalafil, vardenafil được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên, sau đó, để tránh sự kiểm tra của các cơ quan chức năng dẫn đến ngày càng nhiều các chất PDE-5i và chất tương tự chúng được tổng hợp. Các chất thay thế chỉ khác các chất nhóm PDE-5i nguyên bản ở một hoặc vài nhóm thế. Các dẫn chất này có hoạt độ, tác dụng tương tự với các chất gốc nên có thể được phân lập và sử dụng trái phép trong TPBVSK. Do đó, cần thiết phải tối ưu các điều kiện để phát hiện được các chất tương tự trong cùng nhóm của các chất cấm, khi không có chất chuẩn của chúng.

Đối với các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý chưa có chất chuẩn nhưng đã có các thông tin về phân mảnh đã được công bố, nghiên cứu tiến hành tra cứu mảnh phổ lý thuyết theo thư viện Mzcloud, mảnh phổ thu được được trình bày trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Các mảnh phổ lý thuyết của ion mẹ và ion con của chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý còn lại

| TT | Tên chất | Mảnh mẹ (m/z) | Mảnh con (m/z) |
|-----------|------------------------------|----------------------|---|
| 1. | Dinitrodenafil | 403,13606 | 283,11279; 358,10269; 375,10480; 225,07710; 361,10172; 154,06116; 344,09900; 344,09900; 217,10846; 253,07246 |
| 2. | Gisadenafil | 520,23366 | 72,08078; 111,09170; 58,06513; 99,09167; 56,04948; 83,06037; 70,06513; 113,10734; 332,13530 |
| 3. | N-Butyltadalafil | 432,19178 | 135,04416; 204,08008; 169,07669; 262,08630; 205,08862; 250,08634; 282,16011; 232,07572; 191,07683; 264,10196 |
| 4. | N-Ethyltadalafil | 404,16048 | 135,04418; 204,08008; 169,07646; 262,08663; 205,08876; 232,07574; 250,08663; 233,08345; 254,12880; 191,07360 |
| 5. | Propoxyphenyl-sildenafil | 489,22785 | 58,06513; 283,11900; 100,09905; 99,09167; 299,11723; 56,04948; 255,12484; 225,07742; 166,09745; 97,07602 |
| 6. | Propoxyphenyl-thiosildenafil | 505,20501 | 58,06513; 299,09610; 99,09167; 100,09950; 313,11180; 56,04948; 70,06513; 315,09170; 329,10671; 271,10124 |
| 7. | Thiosildenafil | 491,18936 | 58,06513; 99,09167; 100,09951; 299,09610; 56,04948; 70,06513; 341,14224; 327,12074; 85,07602; 312,10331 |
| 8. | Vardenafil oxopiperazine | 475,17582 | 169,09712; 344,14793; 110,06459; 299,11309; 123,09178; 316,11606; 68,01309; 82,06513; 55,05423; 95,06037 |

Trên cơ sở đó, nguồn dữ liệu đối chiếu (thư viện) đã được xây dựng để phân tích các chất cấm gồm một số thông tin trong thư viện ở bảng 3.1 - 3.2.

3.1.2. Điều kiện sắc ký lỏng phân tích chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

Nghiên cứu sử dụng cột BEH C18 (100 mm x 1,7 μ m x 2,1 mm) và tiền cột tương ứng của hãng Waters với chương trình gradient tại bảng 3.3 và hệ dung môi pha động gồm:

- Kênh A: 10 mM ammonium format và 0,1 % acid formic trong nước
- Kênh B: 10 mM ammonium format và 0,1 % acid formic trong acetonitril: methanol (1:1, v/v)

Bảng 3.3. Chương trình gradient tối ưu phân tích các chất cấm

| Thời gian | Kênh A (%) | Kênh B (%) | Tốc độ dòng (mL/phút) |
|------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| 0,0 | 98 | 2 | 0,3 |
| 5,0 | 98 | 2 | 0,3 |
| 15,0 | 60 | 40 | 0,3 |
| 22,0 | 5 | 95 | 0,3 |
| 25,0 | 5 | 95 | 0,3 |
| 26,0 | 98 | 2 | 0,3 |
| 29,0 | 98 | 2 | 0,3 |

3.1.3. Thẩm định phương pháp LC-HR/MS sàng lọc một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

3.1.3.1. Giới hạn phát hiện

Kết quả xác định giới hạn phát hiện (MDL) của các nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý, hỗ trợ giảm cân và hỗ trợ tiểu đường được thể hiện trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. Giới hạn phát hiện của các chất cấm

| TT | Chất phân tích | | MDL |
|----|---------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| 1 | Chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý | Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil | 1,0 µg/kg |
| | | Các chất còn lại | 0,1 mg/kg |
| 2 | Chất cấm nhóm hỗ trợ giảm cân | | 0,1 µg/kg |
| 3 | Chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường | | 0,1 mg/kg |

3.1.3.2. Tính chọn lọc (độ đặc hiệu)

Phương pháp có độ chọn lọc đạt yêu cầu.

3.1.4. Sàng lọc các chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường trong mẫu TPBVSK

Áp dụng quy trình thu được, 92 mẫu TPBVSK hỗ trợ tăng cường sinh lý, 30 mẫu hỗ trợ giảm cân và 30 mẫu hỗ trợ tiểu đường được tiến hành phân tích sàng lọc bằng chế độ FullMS-dd-dependent-MS2. Các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 3.5.

Kết quả cho thấy các chất nhóm PDE-5i đã được phát hiện trong các mẫu TPBVSK hỗ trợ sinh lý; sibutramin được phát hiện trong mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân và metformin được phát hiện trong mẫu TPBVSK hỗ trợ tiểu đường. Bên cạnh đó, nghiên cứu đã phát hiện 12 hợp chất chưa biết có trong thư viện phổ của hệ thống; 01 hợp chất không có trong thư viện và 01 hợp chất có cấu trúc tương tự nhóm PDE-5i. Đối với hợp chất chưa biết có mảnh phân tử m/z là 501,2099 (M+H), nghiên cứu tiến hành phân lập hợp chất thu được bằng sắc ký điều chế, đo phổ FTIR, phổ NRM và phối hợp với các nhà khoa học Singapore xác định hợp chất mới là N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil.

Bảng 3.5. Một số chất cấm được phát hiện trong mẫu TPBVSK

| STT | Loại mẫu | Số lượng mẫu | Chất phân tích | Số mẫu phát hiện |
|-----|---------------------------|--------------|---|------------------|
| 1 | TPBVSK hỗ trợ sinh lý nam | 92 | Nortadalafil | 11 |
| 2 | | | Tadalafil | 10 |
| 3 | | | Sildenafil | 9 |
| 4 | | | Hydroxyhomosildenafil | 6 |
| 5 | | | Hydroxythiohomosildenafil | 6 |
| 6 | | | Homosildenafil | 6 |
| 7 | | | Thiohomosildenafil | 1 |
| 8 | | | Sildenafil N-oxyde | 2 |
| 9 | | | Chloropredadalafil | 1 |
| 10 | | | Propoxyphenyl homohydroxysildenafil | 1 |
| 11 | | | Propoxyphenylalildenafil | 1 |
| 12 | | | Hydroxythiovardenafil | 1 |
| 13 | | | Methisosildenafil | 1 |
| 14 | | | N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil | 2 |
| 15 | TPBVSK hỗ trợ giảm cân | 30 | Sibutramin | 6 |
| 16 | | | Didesmethyilsibutramin | 1 |
| 17 | TPBVSK hỗ trợ tiêu đường | 30 | Metformin | 1 |

3.2. Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý

3.2.1. Điều kiện LC-MS/MS

Các điều kiện LC-MS/MS tối ưu để định lượng đồng thời 53 PDE-5i là điều kiện đã được tối ưu tại mục 3.1, cụ thể như sau:

- Điều kiện LC:
 - + Tốc độ dòng: 0,3 mL/min
 - + Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng
 - + Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L
 - + Pha động: Theo chế độ gradient như Bảng 3.3

- Điều kiện khối phổ:

| | |
|----------------------|-------|
| Use lockmasses | Off |
| Lockmass injection | - |
| Chrom. Peak width | 10 s |
| Time Method duration | 29,0 |
| HESI temperature | 320°C |
| Sheath gas | 30 |
| Aux gas flow rate | 10 |

- Điều kiện FullMS/ dd MS2

| | |
|------------------------------------|----------------|
| Tổng thời gian quét | 0 - 29 phút |
| Chế độ quét mảnh | Positive |
| Phân mảnh trong source (CID) | 0 V |
| Điện tích (default charge) | 1 |
| Full MS microscan | 1 |
| Độ phân giải | 70000 |
| AGC target | 10^6 |
| Khoảng quét mảnh | 220 - 1100 |
| Độ phân giải dd MS2 | 17.500 |
| AGC target | 10^5 |
| Khoảng quét | 200 - 2000 |
| NCE (năng lượng bắn phá tương đối) | 40%, 70%, 100% |

- Điều kiện phân mảnh (AIF)

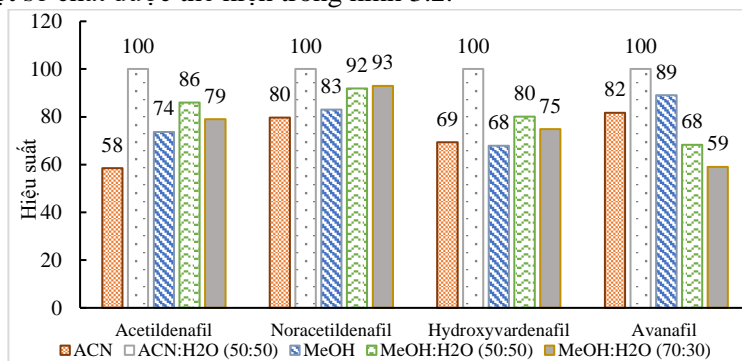
| | |
|------------------------------------|----------------|
| Thời gian quét | 0 - 29 phút |
| Chế độ quét | Positive |
| Độ phân giải | 70000 |
| NCE (năng lượng bắn phá tương đối) | 40%, 70%, 100% |
| Khoảng quét | 50 - 750 |

Mảnh phổ: Cài đặt các mảnh phổ theo Bảng 3.1.

3.2.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

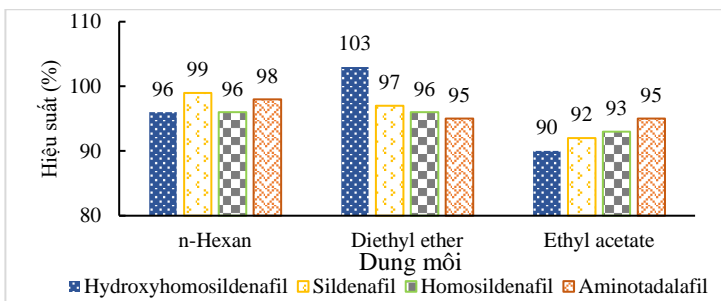
a) Khảo sát dung môi chiết

Nghiên cứu tiến hành khảo sát các hệ dung môi khác nhau gồm acetonitril, methanol, acetonitril: nước (50:50), methanol: nước (50:50), methanol: nước (70:30). Kết quả khảo sát hiệu suất chiết của một số chất được thể hiện trong hình 3.2.



Hình 3.1. Hiệu suất thu hồi một số chất PDE-5i tại dung môi chiết khác nhau

Từ kết quả trong hình cho thấy, hệ dung môi acetonitril: nước (50:50) cho hiệu suất thu hồi lớn nhất đối với các PDE-5i. Do đó, hỗn hợp dung môi acetonitril: nước (50:50) đã được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu. Đối với TPBVSK dạng dầu, nghiên cứu tiến hành khảo sát dung môi loại béo với 3 loại dung môi là n-hexane, diethyl ether, ethyl acetate và mẫu không loại béo. Kết quả được thể hiện tại hình 3.3.



Hình 3.2. Biểu đồ kết quả khảo sát dung môi loại béo

Từ kết quả cho thấy, độ thu hồi của các hợp chất PDE-5i thay đổi không đáng kể so với mẫu loại béo, tuy nhiên loại béo bằng n-hexan cho thấy sự ổn định hơn và dung môi cũng không quá độc hại. Do đó, n-hexan đã được lựa chọn là dung môi loại béo đối với mẫu TPBVSK dạng dầu để hạn chế tạp chất khi phân tích trên hệ thống MS.

b) Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu

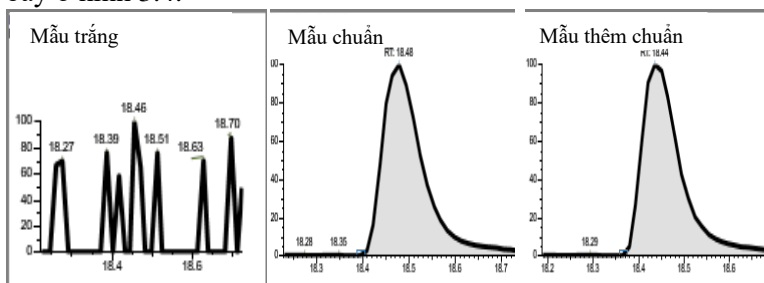
Kết quả nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu trên nền dung môi và mẫu cho giá trị ME của các chất cấm là $5,06\% < 10\%$, cho thấy ảnh hưởng nền mẫu không đáng kể. Do vậy, phương pháp có thể sử dụng đường chuẩn trên nền dung môi để phân tích mẫu. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này vẫn tiến hành thực hiện xây dựng đường chuẩn trên dịch chiết mẫu trắng để đảm bảo kết quả chính xác nhất.

3.2.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý bằng LC-MS/MS

3.2.2.1. Độ đặc hiệu

Dựa vào bảng 3.1- 3.2, các chất nhóm PDE-5i đều có một mảnh mẹ và 2 mảnh con trở lên nên số điểm IP > 5 đạt yêu cầu đối với phân tích trên khối phổ phân giải cao. Độ đặc hiệu của phương pháp phân tích còn được xác định khi phân tích dung dịch chuẩn, dung dịch thêm

chuẩn trên nền mẫu thử và dung dịch mẫu trắng. Kết quả được trình bày ở hình 3.4.



Hình 3.3. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn của sildenafil tại nồng độ 30 ng/mL

Kết quả phân tích cho thấy, mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn có tín hiệu với cùng thời gian lưu 18,4 phút đối với sildenafil. Vì vậy, phương pháp có độ đặc hiệu cao khi phân tích các chất cấm nhóm PDE-5i.

3.2.2.2. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của Sildenafil, Tadalafil và Vardenafil lần lượt là 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất cấm nhóm PDE-5i còn lại lần lượt là 0,1 mg/kg và 0,3 mg/kg.

3.2.2.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Đường chuẩn 5 điểm được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 10 đến 200 ng/mL. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ phân tích, tín hiệu của chất phân tích tỷ lệ tuyến tính với nồng độ với hệ số tương quan $R^2 > 0,997$ với độ chệch <15% với tất cả các giá trị.

3.2.2.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Kết quả đánh giá độ lặp của các chất phân tích thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) trong khoảng 2,81- 12,6 %; độ thu hồi trong khoảng 80-110% , đáp ứng yêu cầu theo AOAC.

3.2.4. Phân tích các chất nhóm hỗ trợ sinh lý trong mẫu TPBVSK

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả phân tích định lượng các chất PDE-5i trong một số mẫu TPBVSK dương tính

| Loại mẫu | Chất phát hiện | Hàm lượng (mg/g) |
|---------------|-------------------------------------|------------------|
| SL.06 | Nortadalafil | 50,0 |
| | Tadalafil | 11,6 |
| | Sildenafil-N-oxide | 0,073 |
| SL.07 | Nortadalafil | 4,41 |
| | Chloropretadalafil | 0,006 |
| SL.08 | Sildenafil | 22,2 |
| | Tadalafil | 0,39 |
| | Sildenafil-N-oxide | 0,06 |
| SL.10 | Propoxyphenylildenafil | 1,02 |
| | Thiohomosildenafil | 0,78 |
| | Homosildenafil | 0,031 |
| | Methisosildenafil | 0,03 |
| SL.13 - SL.17 | Hydroxyhomosildenafil | 1,05 - 20,1 |
| | Hydroxythiohomosildenafil | 0,78 - 22,5 |
| SL.65 | Nortadalafil | 170,0 |
| SL.82 | Hydroxythiohomosildenafil | 226,8 |
| | Hydroxythiovardenafil | 216,8 |
| | Propoxyphenyl homohydroxysildenafil | 0,13 |
| | Hydroxyhomosildenafil | 0,048 |
| | Hydroxyvardenafil | 0,047 |

Kết quả cho thấy, đa số các mẫu TPBVSK có ít nhất 1 hoặc 2 hợp chất PDE-5i chính có hàm lượng cao (>1 mg/g) và các chất phụ

có hàm lượng thấp. Có lẽ đây là các sản phẩm phụ của quá trình sản xuất các thành phần chính. Phần lớn các mẫu có hàm lượng thấp hơn so với liều được sử dụng làm thuốc. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao rất có ý nghĩa trong việc xác định các hợp chất PDE-5i.

3.3. Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân

3.3.1. Khảo sát các điều kiện LC-MS/MS

3.3.1.1. Khảo sát điều kiện MS/MS

Nghiên cứu tiến hành bơm chất chuẩn vào hệ thống khối phổ hai lần, các kết quả được trình bày như trong bảng 3.7. Kết quả cho thấy, mỗi chất thu được 1 mảnh ion mẹ và 2 ion con, phù hợp với quy định của châu Âu về số điểm IP.

Bảng 3.7. Các điều kiện khối phổ phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân

| TT | Chất phân tích | Thời gian lưu (phút) | Mảnh mẹ (m/z) | Mảnh con (m/z) | Năng lượng bắn phá (E) |
|----|------------------------|----------------------|---------------|----------------|------------------------|
| 1 | Sibutramin | 6,37 | 279,9 | 124,8 | 26 |
| | | 6,38 | | 138,4 | 26 |
| 2 | Desmethyl sibutramin | 6,33 | 266,0 | 124,8 | 28 |
| | | 6,34 | | 138,8 | 28 |
| 3 | Didesmethyl sibutramin | 6,27 | 252,1 | 208,1 | 11 |
| | | 6,28 | | 138,2 | 11 |
| 4 | Fenfluramin | 6,30 | 232,2 | 159,1 | 12 |
| | | 6,31 | | 187,0 | 12 |
| 5 | Loperamid | 7,12 | 477,1 | 266 | 15 |
| | | 7,13 | | 210 | 15 |
| 6 | Phenylpropanolamin | 4,35 | 151,5 | 134 | 19 |
| | | 4,36 | | 115 | 19 |

3.3.1.2. Khảo sát điều kiện LC

Trong nghiên cứu này, cột C18 (100 mm x 2,1 mm; 3,5 μ m) và tiền cột tương ứng được sử dụng để tách các chất nhóm hỗ trợ giảm cân với pha động tối ưu là hệ pha động 2 với chương trình gradient.

+ Kênh A: Amoni format 2mM + axit formic 0,1%/ H₂O

+ Kênh B: Amoni format 2mM + axit formic 0,1%/MeOH

3.3.1.3. Khảo sát dung môi chiết

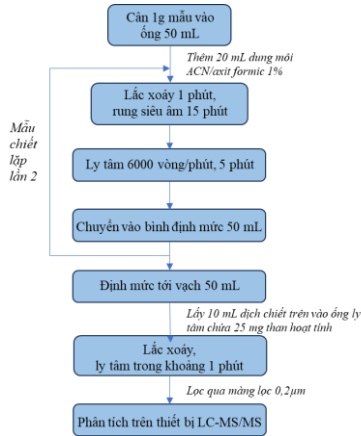
Hai loại dung môi được khảo sát là MeOH và hỗn hợp dung môi ACN/ acid formic 1%. Vì dung môi MeOH có khả năng hòa tan chọn lọc chất phân tích không tốt bằng ACN/ acid formic 1% nên độ thu hồi của chất phân tích trên các nền mẫu khi sử dụng dung môi chiết MeOH có xu hướng sai số dương. Do vậy, nghiên cứu lựa chọn hỗn hợp dung môi ACN/ acid formic 1% làm dung môi chiết tối ưu.

3.3.1.4. Khảo sát quy trình làm sạch mẫu

4 quy trình làm sạch mẫu được khảo sát để làm sạch dung dịch sau chiết: Quy trình 1: Chiết mẫu, lọc mẫu, và tiến hành xác định ngay bằng thiết bị LC-MS/MS; quy trình 2: Loại tạp bằng cách cho mẫu chiết qua cột SPE-SCX; quy trình 3: Loại tạp bằng cách cho mẫu chiết qua cột SPE-HLB; quy trình 4: Sử dụng than hoạt tính

Quy trình 4 được chọn làm điều kiện tối ưu để làm sạch mẫu. Bên cạnh đó, khối lượng than hoạt tính 25 mg tương ứng lượng mẫu 10 mL được lựa chọn làm điều kiện tối ưu.

Do vậy, quy trình tối ưu phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK được trình bày ở hình 3.5.



Hình 3.4. Quy trình tối ưu xác định các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK

3.3.2. Thẩm định phương pháp

3.3.2.1. Độ đặc hiệu

Dựa vào bảng 3.7, các chất nhóm hỗ trợ giảm cân đều có một mảnh mẹ và 2 mảnh con trở lên nên số điểm IP = 5 đạt yêu cầu đối với phân tích trên khối phổ.

3.3.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện của các chất là 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và giới hạn định lượng của phương pháp là 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3.3.2.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Đường chuẩn làm việc được xây dựng trong khoảng từ 2 - 100 ng/mL với 6 điểm và phân tích trên LC-MS/MS. Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ phân tích, tín hiệu của chất phân tích tỷ lệ tuyến tính với nồng độ với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$ với độ chệch <15% với tất cả các giá trị.

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

Kết quả đánh giá độ lệch chuẩn tương đối của các chất phân tích nằm trong khoảng 2,73- 9,80 %, độ thu hồi trong khoảng 82,7- 102 %.

3.3.3. Phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK

Tiến hành phân tích 30 mẫu TPBVSK có tác dụng hỗ trợ giảm cân trên thị trường, kết quả thu được trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả phân tích hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong một số mẫu TPBVSK

| Mẫu | Hàm lượng (mg/g) | | |
|---------------|------------------|----------------------|--|
| | Sibutramin | Desmethyilsibutramin | Didesmethyilsibutramin, fenfluramin, loperamid, phenylpropanolamin |
| GC.05 - GC.10 | 2,20 - 11,6 | - | - |
| GC.10 | 11,9 | 2,05 | - |

Kết quả phân tích cho thấy, đã phát hiện 06 mẫu viên nang dương tính với sibutramin, 01 mẫu viên nang cứng dương tính với desmethyilsibutramin.

3.4. Xác định quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiêu đường

3.4.1. Khảo sát các điều kiện LC-MS/MS

3.4.1.1. Khảo sát điều kiện MS/MS

Nghiên cứu tiến hành bơm chất chuẩn với nồng độ 1 µg/mL vào hệ thống khối phổ hai lần, kết quả được trình bày trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Các điều kiện khối phổ phân tích các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường

| TT | Chất phân tích | Mảnh mẹ | Mảnh con | Thế va chạm (CE) |
|----|----------------|---------|----------|------------------|
| 1. | Metformin | 130,1 | 60,2 | 52 |
| | | | 71,2 | 76 |
| 2. | Phenformin | 206,1 | 60,2 | 32 |
| | | | 105,1 | 16 |
| 3. | Buformin | 158,1 | 60,2 | 12 |

| TT | Chất phân tích | Mảnh mẹ | Mảnh con | Thế va chạm (CE) |
|----|----------------|---------|----------|------------------|
| | | | 42,8 | 32 |
| 4. | Glibenclamid | 494,2 | 369,0 | 48 |
| | | | 169,0 | 12 |
| 5. | Gliclazid | 324,1 | 91,1 | 20 |
| | | | 65,2 | 20 |

Qua bảng cho thấy, điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với quy định của châu Âu về số điểm IP.

3.4.1.2. Khảo sát điều kiện LC

Trong nghiên cứu này, cột Eclipse Plus C18 (150 mm x 3,0 mm; 3,5 μ m) và tiền cột tương ứng được sử dụng để tách các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường với pha động tối ưu là hệ pha động: Kênh A: Acid formic 0,1% trong H₂O và kênh B: Acetonitril.

3.4.1.3. Khảo sát dung môi chiết

Các loại dung môi được khảo sát là MeOH, ACN, ACN: H₂O (1:1), MeOH: H₂O (7:3) và MeOH: H₂O (5:5). Kết quả hiệu suất thu hồi trên dung môi chiết trên nền mẫu TPBVSK cho thấy, methanol cho hiệu quả chiết tốt với các chất phân tích (Độ thu hồi $\geq 80\%$). Do vậy, nghiên cứu lựa chọn methanol làm dung môi chiết tối ưu.

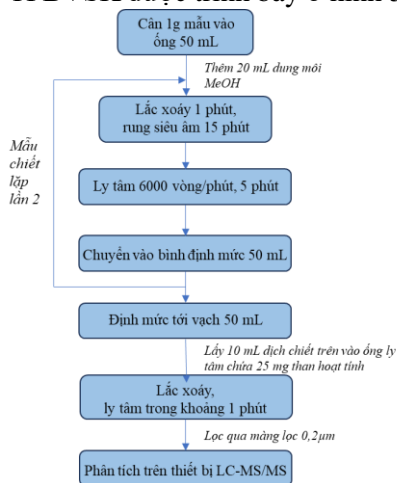
3.4.1.4. Khảo sát số lần chiết mẫu

Tiến hành chiết lại lần ba với 10 ml methanol phần cặn ở trên để đánh giá hiệu quả của số lần chiết. Quy trình phân tích với hai lần chiết lặp đã đảm bảo chiết kiệt chất phân tích ra khỏi nền mẫu.

3.4.1.5. Khảo sát quy trình làm sạch mẫu

Nghiên cứu tiến hành khảo sát khối lượng than hoạt tương ứng với lượng mẫu cần làm sạch do hàm lượng than hoạt tính ảnh hưởng tới khả năng hấp phụ các chất phân tích. Khối lượng than hoạt tính 25 mg tương ứng lượng mẫu 10 mL được lựa chọn làm điều kiện tối ưu.

Do vậy, quy trình tối ưu phân tích các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trong mẫu TPBVSK được trình bày ở hình 3.6.



Hình 3.5. Quy trình tối ưu xác định các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trong mẫu TPBVSK

3.4.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

3.4.2.1. Độ đặc hiệu

Dựa vào bảng 3.9, các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường đều có một mảnh mẹ và 2 mảnh con trở lên nên số điểm IP = 5 đạt yêu cầu đối với phân tích trên khối phổ.

3.4.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện của các chất là 0,1 mg/kg và giới hạn định lượng của phương pháp tương ứng là 0,3 mg/kg.

3.4.2.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Đầy chuẩn làm việc được xây dựng trong khoảng từ 10- 200 ng/mL với kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ phân tích, tín hiệu

của chất phân tích tỷ lệ tuyến tính với nồng độ với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$ với độ chệch $< 15\%$ với tất cả các giá trị.

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

Kết quả đánh giá độ lệch chuẩn tương đối của các chất phân tích nằm trong khoảng 2,62- 8,97%, độ thu hồi trong khoảng 82,0- 108,6%, đáp ứng yêu cầu của AOAC.

3.4.3. Phân tích các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường trong mẫu TPBVSK

Phương pháp đã được áp dụng để phân tích 30 mẫu TPBVSK có tác dụng hỗ trợ tiêu đường trên thị trường. Kết quả thu được cho thấy, metformin đã được phát hiện trong 1 mẫu viên nang cứng với hàm lượng 2,20 mg/kg và không phát hiện mẫu nào dương tính với phenformin, buformin, glibenclamid và gliclazid. Các kết quả phân tích chất cấm trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ tiêu đường cho thấy tỉ lệ phát hiện rất thấp phù hợp với một số nghiên cứu trước đây.

KẾT LUẬN

Với các mục tiêu, nội dung nghiên cứu đề ra, sau quá trình thực hiện, luận án đã đạt được các kết quả như sau:

1. Đã xây dựng quy trình LC-HR/MS sàng lọc các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý, hỗ trợ giảm cân và tiêu đường trong TPBVSK: điều kiện HRMS tìm kiếm các mảnh phổ lý thuyết và thực nghiệm, giới hạn phát hiện 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đến 0,1 mg/kg; ứng dụng sàng lọc các chất cấm trong 152 mẫu TPBVSK: 20 mẫu dương tính nhóm PDE-5i với 14 hợp chất, 06 mẫu dương tính với sibutramin và desmethyilsibutramin, 01 mẫu dương tính với metformin. Phát hiện 01

hợp chất mới nhóm PDE-5i là N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil góp phần bổ sung vào thư viện toàn cầu nhóm PDE-5i.

2. Đã xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý: dung môi chiết acetonitril: nước, MDL: 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cho Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil và 0,1 mg/kg cho các chất còn lại, độ thu hồi trong khoảng 80-110% với RSD < 15%; ứng dụng phương pháp định lượng các PDE-5i trong 92 mẫu TPBVSK phát hiện được 12 hợp chất với hàm lượng trong khoảng 0,006- 226,8 mg/g.

3. Đã xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân gồm: dung môi chiết ACN/ axit formic 1%, MDL: 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, độ thu hồi trong khoảng 80-110% với RSD < 9,80%; ứng dụng phương pháp phân tích 30 mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân: 06 mẫu chứa sibutramin với hàm lượng 2,20- 11,9 mg/g, 01 mẫu chứa desmethylsibutramin với hàm lượng 2,0 mg/g.

4. Đã xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường gồm: dung môi chiết MeOH, MDL: 0,1 mg/kg, độ thu hồi trong khoảng 83-114% với RSD < 10,6%; ứng dụng phương pháp phân tích 30 mẫu TPBVSK hỗ trợ tiểu đường phát hiện 01 mẫu viên nang cứng có chứa metformin với hàm lượng 2,2 mg/kg.

Các kết quả đạt được của luận án là căn cứ để các cơ quan quản lý sửa đổi, bổ sung các quy định về chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe được quy định tại Thông tư 10/2021/TT-BYT bao gồm: bổ sung danh mục chất cấm và quy định về mức giới hạn phát hiện của các chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Thi Oanh Nguyen**, Cao-Son Tran, Thi Thu Hang Do, Thi Minh Hoa Nguyen, Quang-Dong Bui, Cao-Tien Bui, Hong-Ngoc Nguyen, Thu-Hien Dang, Viet-Chien Dinh, Thi Anh Huong Nguyen, Thi Hong Hao Le (2021), "Rapid Screening and Quantitative Determination of Illegal Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors (PDE-5i) in Herbal Dietary Supplements", Journal of Analytical Methods in Chemistry (ISI, Q2), Vol. 2021, Article ID 5579500, 11 pages.
2. **Thi Oanh Nguyen**, Khanh Cao Cong, Thi Thanh Hoa Mac, Thi Anh Huong Nguyen, Thi Hong Hao Le (2022), "Controlling of adulterants in weight loss dietary supplements in Vietnam", The All-Russian scientific and practical online conference for young scientists and Rospotrebnadzor experts with international participation "Fundamental and applied aspects of health risk analysis – 2022", Perm (Russian) from 10th to 14th October, 2022, <https://fcrisk.ru/forums/node/1280>.
3. **Nguyễn Thị Oanh**, Hoàng Quốc Anh, Vũ Thị Trang, Cao Công Khánh, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Mạc Thị Thanh Hoa, Đinh Viết Chiến, Lê Thị Phương Thảo, Trần Cao Sơn, Nguyễn Thị Ánh Hương, Lê Thị Hồng Hảo (2024), "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 (LC-MS/MS)", đăng trên Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ (Tạp chí được tính 1 điểm theo Hội đồng chức danh Giáo sư nhà nước), <https://js.vnu.edu.vn/NST/article/view/5666/4689>.