BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



ĐÀO THỊ CẨM MINH

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÂN DƯỢC TRỘN TRÁI PHÉP TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



ĐÀO THỊ CẨM MINH

XÂY DỰNG QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÂN DƯỢC TRỘN TRÁI PHÉP TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH : KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT

MÃ SỐ : 62720410

Người hướng dẫn khoa học : **PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh**

PGS.TS. Phạm Thị Thanh Hà

HÀ NỘI, NĂM 2019

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.

Đào Thị Cẩm Minh

LỜI CẢM ƠN

Đề hoàn thành Luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ tận tình và hiệu quả của nhiều cá nhân và tập thể, các thầy cô giáo, đồng nghiệp, bạn bè và gia đình. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới:

PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh, Phó Viện trưởng Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, Trường Đại học Dược Hà Nội và **PGS.TS. Phạm Thị Thanh Hà**, Phó Trưởng Bộ môn Hóa phân tích – Độc chất, là hai cô giáo đã tận tình hướng dẫn, định hướng, giúp đỡ, cho tôi những kiến thức quý báu và động viên tôi quyết tâm hoàn thành luận án.

GS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu, nguyên Hiệu phó, trưởng chuyên ngành Kiểm nghiệm thuốc và Độc chất, Trường Đại học Dược Hà Nội là người thầy đã động viên, chỉ dẫn và đóng góp ý kiến quý báu cho tôi hoàn thành luận án.

PGS.TS. Nguyễn Xuân Trường, Giám đốc Trung tâm giám định ma túy, Viện khoa học hình sự, Bộ Công an và **PGS.TS. Lê Văn Vũ**, Giám đốc Trung tâm Khoa học vật liệu, Khoa Vật lý, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, là hai người thầy đã chỉ dẫn và đóng góp kinh nghiệm quý báu cho tôi hoàn thành luận án.

Ban giám hiệu Trường Đại học Dược Hà Nội và **Ban giám hiệu** Trường Đại học Y Dược Huế đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án đúng thời gian quy định.

Các thầy, cô Bộ môn Hóa phân tích – Độc chất và Phòng Sau đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập tại trường.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Gia đình và những người thân đã chia sẻ, động viên tôi có đủ nghị lực, quyết tâm hoàn thành luận án.

Tác giả luận án

Đào Thị Cẩm Minh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

ĐẶT VẤN ĐỀ **1**

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN **3**

1.1. Tổng quan các tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược **3**

1.1.1. Khái niệm, phân loại chế phẩm đông dược 3

1.1.2. Tình hình tân dược trộn trái phép trong đông dược trên thế giới 5

1.1.3. Tình hình tân dược trộn trái phép trong đông dược tại Việt Nam 9

1.2. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu **12**

1.2.1. Nhóm giảm đau, chống viêm steroid và phi steroid 12

1.2.2. Nhóm giảm glucose máu 16

1.2.3. Nhóm ức chế PDE-5 18

1.3. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu **19**

1.3.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) 19

1.3.2. Phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp với quang phổ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS) 24

1.3.3. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) 32

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU **39**

2.1. Nguyên liệu, trang thiết bị **39**

2.1.1. Nguyên liệu 39

2.1.2. Trang thiết bị 40

2.2. Đối tượng nghiên cứu **41**

2.2.1. Mẫu thử 41

2.2.2. Mẫu placebo 41

2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu **43**

2.3.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS 43
2.3.2. Xây dựng quy trình định tính một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC 46
2.3.3. Phát triển quy trình định tính sildenafil trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp với tán xạ Raman tăng cường bề mặt (TLC – SERS) 48
2.3.4. Ứng dụng của các phương pháp phân tích 50
2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu 51
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 52
3.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS 52
3.1.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số thuốc nhóm giảm đau, chống viêm trộn trái phép trong chế phẩm đông dược 52
3.1.2. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số thuốc nhóm giảm glucose máu trộn trái phép trong chế phẩm đông dược 68
3.1.3. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số thuốc nhóm ức chế PDE-5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược 78
3.2. Xây dựng quy trình định tính bằng phương pháp HPTLC 87
3.2.1. Xây dựng quy trình định tính nhóm glucorticoid bằng phương pháp HPTLC 87
3.2.2. Xây dựng quy trình định tính nhóm NSAID bằng phương pháp HPTLC 92
3.2.3. Xây dựng quy trình định tính nhóm giảm glucose máu bằng phương pháp HPTLC 97
3.2.4. Xây dựng quy trình định tính nhóm ức chế PDE-5 bằng phương pháp HPTLC 102
3.3. Phát triển quy trình định tính bằng phương pháp TLC-SERS 106
3.3.1. Xây dựng quy trình định tính bằng phương pháp TLC-SERS 106
3.3.2. Thẩm định phương pháp định tính sildenafil bằng TLC-SERS 109
3.4. Đánh giá khả năng ứng dụng của các phương pháp HPTLC, LC-MS/MS và TLC-SERS 110
3.4.1. Ứng dụng phương pháp HPTLC trên mẫu thực 111
3.4.2. Ứng dụng phương pháp LC-MS/MS xác định các dược chất trộn lẫn trong chế phẩm đông dược 117
3.4.3. Ứng dụng phương pháp TLC-SERS trên mẫu thực 120
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 122

4.1. Xây dựng các nền mẫu chế phẩm đông dược 122
4.2. Phương pháp LC-MS/MS 124
4.2.1. Xây dựng quy trình chiết xuất các thuốc tân dược trong chế phẩm đông dược 124
4.2.2. Xây dựng phương pháp phân tích LC-MS/MS 126
4.2.3. Thẩm định phương pháp LC-MS/MS 128
4.3. Phương pháp HPTLC 130
4.3.1. Xây dựng phương pháp phân tích HPTLC 130
4.3.2. Thẩm định phương pháp HPTLC 133
4.4. Phương pháp TLC-SERS 135
4.4.1. Lựa chọn phương pháp 135
4.4.2. Xây dựng quy trình định tính sildenafil bằng TLC – SERS 136
4.4.3. Thẩm định phương pháp TLC-SERS 139
4.5. Đánh giá khả năng ứng dụng của các phương pháp 139
4.5.1. Ứng dụng phương pháp HPTLC để phân tích mẫu thực 139
4.5.2. Ứng dụng phương pháp LC-MS/MS trong phân tích các mẫu thực 141
4.5.3. Ứng dụng phương pháp TLC – SERS để phân tích mẫu thực 143
4.5.4. Bước đầu đánh giá tình hình các dược chất được trộn lẫn trong các mẫu thực 144
4.6. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của luận án 145
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 147
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ
TÀI LIỆU THAM KHẢO
PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

ACN	Acetonitril
AOAC	Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thống (Association of Official Analytical Chemists)
AR	Thuốc thử phân tích
BETA	Betamethason
CRE	Hiệu ứng giọt cà phê (Coffe ring effect)
CE	Điện di mao quản (Capillary electrophoresis)
COX	Cyclooxygenase
DEXA	Dexamethason acetat
ESI	Ion hóa phun điện tử (Electrospray Ionization)
GLIB	Glibenclamid
GLIC	Gliclazid
GLM	Glimepirid
GLIP	Glipizid
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	Sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (High Performance Thin Layer Chromatography)
HPLC- DAD	Sắc ký lỏng hiệu năng cao – Detector diod (High Performance Liquid Chromatography-Diode-Array Detection)
HYDRO	Hydrocortison acetat
KETO	Ketoprofen
ICH	Hội đồng hòa hợp quốc tế (International Conference on Harmonisation)
INDO	Indomethacin
IR	Hồng ngoại (Irradation)
LC-MS	Sắc ký lỏng kết hợp khối phổ (Liquid chromatography - mass spectrometry)
LC-MS/MS	Sắc ký lỏng khối phổ hai lần (Liquid chromatography tandem mass spectrometry)
LOD	Giới hạn phát hiện (Limit of Detection)
LOQ	Giới hạn định lượng (Limit of Quantitation)
m/z	Khối lượng/điện tích
MeOH	Methanol

MRM	Chế độ khảo sát đa phản ứng (Multiple Reaction Monitoring)
MS	Khối phổ (Mass Spectrometry)
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
NSAID	Thuốc chống viêm không steroid (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug)
PA	Tinh khiết phân tích (Pure Analysis)
PARA	Paracetamol
PDE – 5	Phosphodiesterae – 5
PIRO	Piroxicam
PREL	Prednisolon
PREN	Prednison
RSD	Độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation)
SERS	Tán xạ Raman tăng cường bề mặt (Surface- enhanced Raman spectroscopy)
S/N	Tín hiệu/nhiễu (Signal/noise)
SD	Độ lệch chuẩn (Standard Deviation)
SIL	Sildenafil citrat
SIM	Chế độ khảo sát ion được lựa chọn (Selected Ion Monitoring)
SRM	Chế độ khảo sát phản ứng được lựa chọn (Selected Reaction Monitoring)
SWGDRUG	Nhóm công tác khoa học cho các phân tích của thuốc bị thu giữ (Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs)
TAD	Tadalafil
TEM	Kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron microscopy)
TFA	Trifluoroacetic Acid
TLC	Sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography)
TLC-SERS	Sắc ký lớp mỏng kết hợp tán xạ Raman tăng cường bề mặt (Thin Layer Chromatography – Surface Enhanced Raman Spectroscopy)
TOF	Thời gian bay (Time Of Flight)
TPBVSK	Thực phẩm bảo vệ sức khỏe
TPCN	Thực phẩm chức năng
UV-Vis	Tử ngoại – Khả kiến (Ultra Violet - Visible)
VAR	Vardenafil hydrochlorid
VNKNTTW	Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương

DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU

Bảng 1.1. Cấu trúc hoá học, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc giảm đau, chống viêm phi steroid nghiên cứu 14

Bảng 1.2.Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc glucocorticoid 15

Bảng 1.3. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc nghiên cứu 17

Bảng 1.4. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc ức chế PDE-5 19

Bảng 1.5 So sánh một vài thông số giữa HPTLC và TLC 20

Bảng 1.6. Các nghiên cứu phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp TLC 23

Bảng 1.7.Phân loại kỹ thuật phân tích của SWGDRUG 28

Bảng 1.8 Các nghiên cứu phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp TLC-SERS 31

Bảng 1.9 Các nghiên cứu phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp LC-MS 35

Bảng 2.1. Các chất chuẩn dùng trong nghiên cứu 39

Bảng 3.1. Các thông số máy khối phổ 52

Bảng 3.2. Điều kiện khối phổ của nhóm giảm đau, chống viêm 53

Bảng 3.3. Điều kiện khảo sát pha động theo chế độ gradient của nhóm giảm đau, chống viêm 55

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát dung môi chiết 58

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm của nhóm giảm đau, chống viêm 59

Bảng 3.6. Kết quả đánh giá độ phù hợp của nhóm giảm đau chống viêm trên hệ thống LC-MS/MS 60

Bảng 3.7. Sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các chất nghiên cứu 64

Bảng 3.8. Kết quả LOD và LOQ trên nền mẫu của nhóm giảm đau, chống viêm 65

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm đau, chống viêm trên NX1 66

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm đau, chống viêm trên NX2 67

Bảng 3.11. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền nén 67

Bảng 3.12. Các điều kiện khối phổ để phân mảnh nhóm giảm glucose máu 69

Bảng 3.13. Điều kiện khảo sát pha động theo gradient nhóm giảm glucose máu 70

Bảng 3.14. Khảo sát hiệu suất chiết nhóm giảm glucose máu bằng LC-MS/MS 71

Bảng 3.15. Kết quả đánh giá độ phù hợp của nhóm giảm glucose máu trên LC-MS 73

Bảng 3.16. Kết quả xác định LOD và LOQ nhóm giảm glucose máu 75

Bảng 3.17. Kết quả xây dựng đường chuẩn nhóm giảm glucose máu của phương pháp LC-MS/MS 75

Bảng 3.18. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm glucose máu phương pháp LC-MS/MS 77

Bảng 3.19. Điều kiện khối phổ của nhóm ức chế PDE-5 78

Bảng 3.20. Chế độ gradient pha động phân tích nhóm ức chế PDE-5 79

Bảng 3.21. Kết quả khảo sát hiệu suất chiết nhóm ức chế PDE-5 của phương pháp 81

Bảng 3.22. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống trên nhóm ức chế PDE-5 82

Bảng 3.23. Kết quả xác định LOD, LOQ nhóm ức chế PDE-5 của phương pháp ... 84

Bảng 3.24. Kết quả đánh giá khoảng tuyến tính của nhóm ức chế PDE-5 84

Bảng 3.25. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày của nhóm ức chế PDE-5 85

Bảng 3.26. Kết quả LOD của nhóm corticoid 92

Bảng 3.27. Kết quả xác định LOD của nhóm NSAID 96

Bảng 3.28. Kết quả xác định LOD và LOQ của nhóm giảm glucose máu 101

Bảng 3.29. Kết quả xác định LOD, LOQ của nhóm ức chế PDE-5 105

Bảng 3.30. Kết quả định tính các mẫu dương tính với nhóm glucocorticoid 112

Bảng 3.31. Kết quả định tính các mẫu dương tính với nhóm NSAID 114

Bảng 3.32 Kết quả định tính các mẫu dương tính với nhóm giảm glucose máu 115

Bảng 3.33. Kết quả định tính các mẫu chế phẩm đông dược dương tính với dược chất nhóm ức chế PDE-5 117

Bảng 3.34. Kết quả các mẫu chế phẩm phát hiện có dược chất nghiên cứu 120

Bảng 3.35. Bảng các đỉnh đặc trưng và tỉ lệ cường độ SERS ở các đỉnh của các mẫu dương tính sildenafil 121

Bảng 4.1. Các đỉnh và dao động trên lý thuyết và thực nghiệm của sildenafil 137

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1.Biểu đồ phân bố số lượng công bố nghiên cứu theo từng năm theo.....5

Hình 1.2.Quy trình phân tích và các thiết bị trong HPTLC.....21

Hình 1.3.Sơ đồ nguyên lý của SERS 25

Hình 1.4.Quy trình phân tích mẫu theo phương pháp TLC-SERS 29

Hình 1.5. Số lượng phát minh kỹ thuật SERS cho lĩnh vực dược phẩm 30

Hình 1.6. Sơ đồ hệ thống LC-MS/MS 32

Hình 1.7. Sơ đồ tạo ion bằng nguồn ES.....33

Hình 1.8. Tứ cực chập ba gập cong trong hệ máy LC-MS/MS Bruke 34

Hình 3.1. Sắc ký đồ khảo sát cột sắc ký của nhóm giảm đau, chống viêm 54

Hình 3.2. Sắc ký đồ của nhóm giảm đau, chống viêm với pha động được lựa chọn56

Hình 3.3. Sắc ký đồ khảo sát tốc độ dòng của nhóm giảm đau, chống viêm 57

Hình 3.4. Sắc ký đồ khảo sát độ đặc hiệu của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền nang (NX1) bằng LC-MS/MS.....62

Hình 3.5. Sắc ký đồ khảo sát độ đặc hiệu của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền bột (NX2) bằng LC-MS/MS 62

Hình 3.6. Sắc ký đồ khảo sát độ đặc hiệu của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền nén (NX3) bằng LC-MS/MS.....63

Hình 3.7 Sắc ký đồ pha động nhóm giảm glucose máu bằng LC-MS/MS.....70

Hình 3.8. Sắc ký đồ của giảm glucose máu trên nền hoàn ND3 bằng LC-MS/MS..74

Hình 3.9. Sắc ký đồ của giảm glucose máu trên nền nén ND1 bằng LC-MS/MS....74

Hình 3.10. Sắc ký đồ của giảm glucose máu trên nền nang ND2 bằng LC-MS/MS 74

Hình 3.11. Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 bằng LC-MS/MS.....80

Hình 3.12 Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 trên nền cao NP3 bằng LC-MS/MS 83

Hình 3.13 Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 trên hoàn NP2 bằng LC-MS/MS.....83

Hình 3.14 Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 trên nang NP1 bằng LC-MS/MS.....83

Hình 3.15. Kết quả khảo sát thành phần dung môi pha động nhóm corticoid.....87

Hình 3.16. Kết quả khảo sát tỷ lệ hệ dung môi trên nhóm corticoid 88

Hình 3.17. Phổ hấp thụ UV của nhóm corticoid.....89

Hình 3.18.Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của nhóm glucocorticoid bằng HPTLC 90

Hình 3.19. Sắc ký đồ analog của nhóm corticoid trên nền nén NX3 bằng HPTLC .90

Hình 3.20. Sắc ký đồ analog của nhóm corticoid ở nền nang NX1 bằng HPTLC ...90

Hình 3.21. Sắc ký đồ analog của nhóm corticoid trên nền Bột NX2 bằng HPTLC .91

Hình 3.22. Kết quả khảo sát 4 hệ dung môi pha động nhóm NSAID với: 1-paracetamol, 2- piroxicam, 3- indomethacin, 4- hỗn hợp 5 chất phân tích, 5-ketoprofen, 6- ibuprofen.....92

Hình 3.23. Sắc ký đồ sắc ký với hệ pha động n-hexan: ethyl acetat: acid aceti (6:2,5:1,5) nhóm NSAID; Kết quả quét phổ UV của nhóm NSAID 93

Hình 3.24. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của nhóm NSAID bằng HPTLC 95

Hình 3.25.Sắc ký đồ analog của nhóm NSAID trên nền nén NX3 bằng HPTLC 95

Hình 3.26. Sắc ký đồ analog của nhóm NSAID trên nền bộ NX2t bằng HPTLC....95

Hình 3.27. Sắc ký đồ analog của nhóm NSAID trên nền nang NX1 bằng HPTLC .95

Hình 3.28.Kết quả khảo sát hệ dung môi pha động nhóm giảm glucose máu.....97

Hình 3.29. Kết quả khảo sát hệ dung môi n- butyl acetat chứa acid formic các tỷ lệ khác nhau với nhóm giảm glucose máu.....98

Hình 3.30. sắc kí đồ hệ n-butylacetat chứa 0,5% acid formic; Kết quả phổ UV của nhóm giảm glucose máu.....99

Hình 3.31. Sắc ký đồ về độ đặc hiệu của nhóm giảm glucose máu bằng HPTLC 100

Hình 3.32 Sắc ký đồ analog của nhóm giảm glucose máu trên nền nang ND2 bằng HPTLC 100

Hình 3.33. Sắc ký đồ analog của nhóm giảm glucose máu trên nền hoàn ND3 bằng HPTLC 100

Hình 3.34. Sắc ký đồ analog của nhóm giảm glucose máu trên nền nén ND1 bằng HPTLC 101

Hình 3.35. Kết quả khảo sát hệ dung môi pha động nhóm ức chế PDE-5, trong đó 1-Sildenafil; 2-Vardenafil; 3-hỗn hợp 3 chất phân tích; 4-Tadalafil.....102

Hình 3.36. Sắc ký đồ và phổ UV của nhóm ức chế PDE-5 103

Hình 3.37. Sắc ký đồ đanh giá độ đặc hiệu của nhóm ức chế PDE-5 bằng HPTLC 104

Hình 3.38. Sắc ký analog của nhóm ức chế PDE-5 trên nền cao NP3 bằng HPTLC 104

Hình 3.39. Sắc ký analog của nhóm ức chế PDE-5 trên nền hoàn NP2 bằng HPTLC 104

Hình 3.40. Sắc ký analog của nhóm ức chế PDE-5 trên nền nang NP1 bằng HPTLC 105

Hình 3.41. Kết quả (a) Phổ UV−vis, (b) Hình ảnh TEM của keo bạc.....106

Hình 3.42 . Phổ Raman của keo bạc (màu đen), bột sildenafil (màu xanh), và phổ SERS của dung dịch sildenafil (màu đỏ). 107

Hình 3.43. Phổ SERS của sildenafil với (a) phổ của sildenafil với nồng độ dung dịch tăng dần. Hình ảnh mở rộng tại các đỉnh đặc trưng: (b) 1232 cm^{-1}, (c) 2580 cm^{-1}, and (d) Mối tương quan giữa cường độ đỉnh với nồng độ sildenafil.....108

Hình 3.44. Phổ SERS của sildenafil với thể tích keo bạc khác nhau a); sự tương quan giữa cường độ các đỉnh 1232 và 1580 cm^{-1} với thể tích keo bạc b). 108

Hình 3.45. Sắc ký đồ của bản mỏng tại vị trí vết khi chưa nhỏ keo và sau khi nhỏ keo vị trí từ 1-9 tạo vòng cà phê trong đường kính của vết sildenafil (a), Phổ SERS của sildenafil tại các vị trí nhỏ keo khác nhau, (c) Mối tương quan giữa cường độ đỉnh 1232 và 1580 cm^{-1} với các vị trí 1-9 (b).....109

Hình 3.46. Sắc ký đồ của sildenafil trên 3 nền mẫu (a), và phổ SERS của 9 vết: (b) sildenafil (spot 1), sildenafil trong nền nang (spot 2), nền nang (spot 3), (c) sildenafil (spot 4), sildenafil trong nền hoàn (spot 5), nền hoàn (spot 6), d) sildenafil (spot 7), sildenafil trong nền cao.(spot 8), nền cao (spot 9).....110

Hình 3.47. Sắc ký đồ các mẫu thực phát hiện nhóm glucocorticoid với vị trị chuẩn 1-prednisolon, 2-betamethason, 3-prednison, 4-hydrocortison acetat, 5-dexamethason acetat.....111

Hình 3.48. Kết quả chồng phổ các mẫu dương tính dexamethason acetat 112

Hình 3.49. Sắc ký đồ phân tích các mẫu phát hiện nhóm NSAID với vị trí chuẩn 1-paracetamol, 2-piroxicam, 3-indomethacin, 4-ketoprofen.....113

Hình 3.50. Kết quả chồng phổ mẫu dương tính Paracetamol 113

Hình 3.51. Sắc kí đồ phân tích các mẫu phát hiện nhóm giảm glucose máu với vị trí chuẩn 1- glipizid, 2- glimepirid, 3-glibenclamid, 4-gliclazid 114

Hình 3.52. Kết quả chồng phổ UV quét tại vị trí có Rf (vết glibenclamid) của các mẫu dương tính với glibenclamid 115

Hình 3.53.Sắc kí đồ phân tích các mẫu phát hiện nhóm ức chế PDE-5 với vị trí chuẩn 1-sildenafil, 2-vardenafil, 3-tadalafil 116

Hình 3.54. Kết quả chồng phổ mẫu dương tính sildenafil.....117

Hình 3.55. Sắc ký đồ và phổ khối paracetamol trong mẫu VNN156 118

Hình 3.56. Sắc ký đồ và phổ khối glibenclamid trong mẫu dương tính HCD09....119

Hình 3.57. Sắc ký đồ và phổ khối sildenafil trong mẫu dương tính VNP03 119

Hình 3.58. Phổ SERS của (a) các mẫu dương tính với sildenafil;(b) mẫu nghi ngờ có sildenafil dựa vào R_f tương ứng 0,21 121

Hình 4.1. Phân loại các mẫu chế phẩm theo nhóm bệnh và cách thức thu thập; phân loại các mẫu chế phẩm theo nhóm bệnh với số đăng ký và không đăng ký 144

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế Thế giới có đến 80% người dân ở các nước đang phát triển sử dụng thường xuyên các thuốc thảo dược trong chăm sóc sức khỏe [69]. Ưu điểm của các chế phẩm này là hầu hết các vị thuốc trong y học cổ truyền đã được sử dụng lâu đời, không gây độc hại cho cơ thể và không xuất hiện hiện tượng kháng thuốc; không chỉ chữa bệnh mà còn giúp cân bằng âm dương, thay đổi cơ địa. Do vậy, doanh thu từ các chế phẩm đông dược ở Châu Âu lên đến hơn 3,7 tỷ Euro hàng năm [69]. Nhằm hấp dẫn khách hàng và gia tăng lợi nhuận, một số nhà sản xuất và cơ sở khám chữa bệnh tư nhân đã trộn trái phép một số hoạt chất tân dược có tác dụng tương đồng với chỉ định vào từng loại chế phẩm đông dược [67], [117], [121], [132]. Điển hình các nhóm thuốc tân dược thường được trộn trái phép là nhóm thuốc giảm glucose máu, thuốc chống viêm nhóm glucocorticoid, thuốc giảm đau, chống viêm không steroid, thuốc hạ huyết áp, thuốc giảm béo, thuốc ức chế phosphodiesterase-5 [132], [121] … chiếm tỷ lệ cao nhất là nhóm thuốc giảm đau chống viêm [60], [65]. Các trường hợp phát hiện tập trung phần lớn ở Trung Quốc [55], [98], Singapore [73], [75], Ấn Độ [67], [122]… Khi người bệnh sử dụng chế phẩm đông dược có trộn lẫn tân dược nhóm giảm đau chống viêm, sẽ bị xuất huyết dạ dày, hội chứng cushing …[4], [67], [119]; với nhóm giảm glucose máu, sẽ bị nhiễm toan lactic, tổn thương gan thận…. với nhóm ức chế PDE-5, sẽ bị đột ngột mất thị lực nghiêm trọng, mất thính giác, khó thở, dương vật cương cứng, đau đớn kéo dài hơn 4 giờ [129], [117], [121], [132].

Việc trộn hoạt chất tân dược vào chế phẩm đông dược là bất hợp pháp, gian lận thương mại, ngụy tạo tác dụng của chế phẩm đông dược nhằm tạo ra tác dụng nhanh và rõ rệt. Hậu quả là gây ra nhiều trường hợp biến chứng nghiêm trọng do không kiểm soát được liều lượng và thời gian tác dụng thuốc. Do đó, yêu cầu phát hiện tân dược trong chế phẩm đông dược hiện nay là phát hiện nhanh ở hàm lượng tân dược thấp và áp dụng được trên số lượng mẫu lớn và đa dạng, tích cực phát huy các hệ thống máy hiện đại như LC-MS hay quang phổ Raman [81], [58]. Đặc biệt, sự kết hợp sắc ký lớp mỏng với tán xạ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS) đang được phát triển mạnh mẽ để phát hiện tân dược trong đông dược nhằm tận dụng các ưu điểm sàng lọc mẫu, loại nhiễu nền huỳnh quang của bản mỏng và sự nhanh chóng, chính xác của thiết bị quang phổ Raman hiện đại [151], [63], [101].

Hiện nay, việc phát hiện các tân dược trộn trái phép vào các sản phẩm đông dược tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

[20], [26], [10], [13], [22], [33], [35]; chỉ một số nghiên cứu sàng lọc, phát hiện nhanh bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) [26], [34]; khẳng định bằng sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS) [25], [29], [34]. Như vậy, Việt Nam còn thiếu các nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) và sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LC-MS/MS) cho kết quả chính xác trên các nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu, ức chế PDE-5 trộn trái phép trong nền mẫu đông dược có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh lý cơ xương khớp, bệnh đái tháo đường và bệnh lý liệt dương. Bên cạnh đó, các nghiên cứu tại Việt Nam chỉ phát hiện các thuốc tân dược [23], [24] bằng Raman; mà chưa có nghiên cứu nào phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng TLC-SERS.

Từ các thực tế và lý do trên, đề tài **"Xây dựng quy trình xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược"** được tiến hành với các mục tiêu sau:

1. Xây dựng quy trình định tính và định lượng nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu, ức chế PDE-5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký hai lần khối phổ (LC-MS/MS).
2. Xây dựng quy trình phát hiện nhanh một số tân dược trên trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) và tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS).
3. Áp dụng các quy trình đã xây dựng để kiểm tra phát hiện một số tân dược trên trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược đang lưu hành tại Việt Nam.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan các tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

1.1.1. Khái niệm, phân loại chế phẩm đông dược

Trong phạm vi đề tài nghiên cứu, chế phẩm đông dược bao gồm thuốc dược liệu, thuốc cổ truyền và thực phẩm chức năng.

a. Theo Luật Dược năm 2016 [32], các khái niệm về thuốc dược liệu và thuốc cổ truyền như sau:

Thuốc dược liệu là thuốc có thành phần từ dược liệu và có tác dụng dựa trên bằng chứng khoa học, trừ thuốc cổ truyền quy định tại khoản 8 Điều này, Luật Dược 2016.

Thuốc cổ truyền (bao gồm cả vị thuốc cổ truyền) là thuốc có thành phần dược liệu được chế biến, bào chế hoặc phối ngũ theo lý luận và phương pháp của y học cổ truyền hoặc theo kinh nghiệm dân gian thành chế phẩm có dạng bào chế truyền thống hoặc hiện đại.

b. "**Thực phẩm chức năng**" là thuật ngữ dùng để chỉ các sản phẩm nằm ở ranh giới giữa thực phẩm truyền thống và thuốc, có tác dụng hoặc không có tác dụng dinh dưỡng, tạo cho cơ thể tình trạng thoải mái, tăng sức đề kháng và làm giảm bớt nguy cơ bệnh tật [14], .

Theo Luật An toàn thực phẩm, số 55/2010/QH12 của Quốc hội nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam ban hành ngày 17 tháng 06 năm 2010 [31] thì Thực phẩm chức năng (TPCN) là thực phẩm dùng để hỗ trợ chức năng của cơ thể con người, tạo cho cơ thể tình trạng thoải mái, tăng sức đề kháng, giảm bớt nguy cơ mắc bệnh, bao gồm thực phẩm bổ sung, thực phẩm bảo vệ sức khoẻ, thực phẩm dinh dưỡng y học.

Theo Thông tư số 43/2014/TT-BYT ngày 24/11/2014 Quy định về quản lý TPCN [7] thì TPCN chia làm 4 loại:

- *Thực phẩm bổ sung* (Supplemented Food) là thực phẩm thông thường được bổ sung vi chất và các yếu tố có lợi cho sức khỏe như vitamin, khoáng chất, axit amin, axit béo, enzym, probiotic, prebiotic và chất có hoạt tính sinh học khác.

- *Thực phẩm bảo vệ sức khỏe* (Health Supplement, Food Supplement, Dietary Supplement) là sản phẩm được chế biến dưới dạng viên nang, viên hoàn, viên nén, cao, cốm, bột, lỏng và các dạng chế biến khác có chứa một hoặc hỗn hợp của các chất sau đây:

+ Vitamin, khoáng chất, axit amin, axit béo, enzym, probiotic và chất có hoạt tính sinh học khác;

+ Hoạt chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên từ động vật, chất khoáng và nguồn gốc thực vật ở các dạng như chiết xuất, phân lập, cô đặc và chuyển hóa.

- *Thực phẩm dinh dưỡng y học* còn gọi là *thực phẩm dinh dưỡng dùng cho mục đích y tế đặc biệt* (Food for Special Medical Purposes, Medical Food) là loại thực phẩm có thể ăn bằng đường miệng hoặc bằng ống xông, được chỉ định để điều chỉnh chế độ ăn của người bệnh và chỉ được sử dụng dưới sự giám sát của nhân viên y tế.

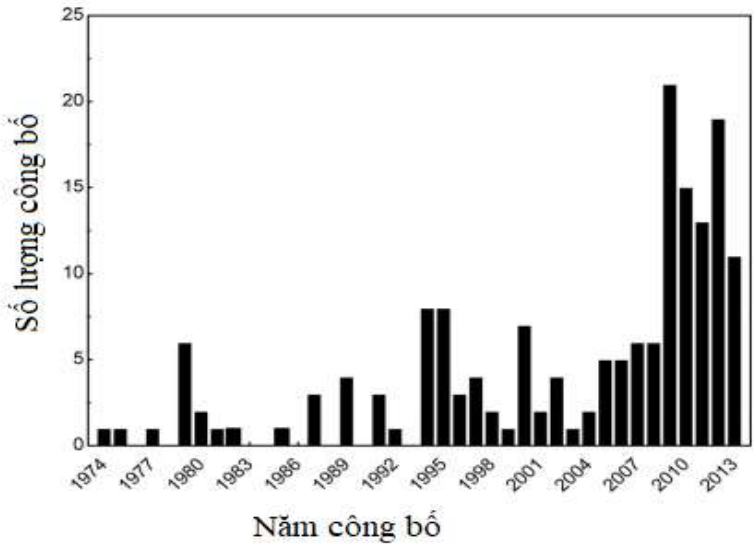
- *Thực phẩm dùng cho chế độ ăn đặc biệt* (Food for Special Dietary Uses) dùng cho người ăn kiêng, người già và các đối tượng đặc biệt khác theo quy định của Ủy ban tiêu chuẩn thực phẩm quốc tế (CODEX) là những thực phẩm được chế biến hoặc được phối trộn theo công thức đặc biệt nhằm đáp ứng các yêu cầu về chế độ ăn đặc thù theo thể trạng hoặc theo tình trạng bệnh lý và các rối loạn cụ thể của người sử dụng. Thành phần của thực phẩm này phải khác biệt rõ rệt với thành phần của những thực phẩm thông thường cùng bản chất, nếu có.

Từ các khái nhiệm trên, đề tài tập trung nghiên cứu các chế phẩm đông dược bao gồm thuốc dược liệu, thuốc cổ truyền và thực phẩm chức năng loại thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) có đến 80% người dân sống ở các nước đang phát triển vẫn dựa chủ yếu vào các loại thuốc truyền thống để chăm sóc sức khỏe, nhất là ở châu Phi và châu Á. Ví dụ, số lượng người dân sử dụng chế phẩm thảo dược để điều trị ban đầu chiếm 90% dân số của Ethiopia, chiếm 75% dân số của Mali, chiếm 70% ở Myannar, chiếm 70% ở Rawanda, chiếm 60% ở Tanzania, chiếm 60% ở Uganda [68]. Ngay tại các nước phát triển ở châu Âu, số lượng chế phẩm thảo dược bán ra cũng chiếm tỷ lệ đáng kể, ví dụ Đức 39%, Pháp 21% [68].

Trên thế giới, chế phẩm từ thảo dược chủ yếu được sản xuất và sử dụng dưới dạng thuốc cổ truyền (thuốc đông dược) hoặc dạng thực phẩm chức năng (TPCN). Thuốc đông dược được sản xuất dựa theo bài thuốc cổ truyền và được mặc định đã qua kiểm

chứng từ thực tiễn sử dụng trong khi TPCN mới được phát triển trong khoảng hơn 30 năm trở lại đây. Do TPCN được coi là thực phẩm nên sản phẩm không có yêu cầu đánh giá an toàn trước khi được đưa ra thị trường.

Tuy nhiên, có nhiều lo ngại cho rằng tình trạng thuốc hóa dược (tân dược) trộn lẫn trong các chế phẩm thảo dược đang ngày càng gia tăng, có thể gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của người sử dụng. Tình trạng này được phản ánh qua số lượng các nghiên cứu trên thế giới về vấn đề phát hiện tân dược trộn lẫn với chế phẩm thảo dược trên thế giới tăng mạnh từ năm 1974 đến nay *(Hình 1.1)* [110].



Hình 1.1.Biểu đồ phân bố số lượng công bố nghiên cứu theo từng năm theo [110]

Lý do mà việc trộn trái phép tân dược vào các chế phẩm đông dược được đặc biết quan tâm là vì các chế phẩm đông dược thường được sử dụng kéo dài, và thói quen sử dụng tùy ý của người bệnh. Do các chế phẩm thảo dược thường được quảng cáo ở dạng "tự nhiên" nên người sử dụng mặc định các chế phẩm này là "an toàn hơn" so với thuốc tân dược. Chính vì vậy người dùng có xu hướng sử dụng các chế phẩm thảo dược trong thời gian dài mà không nhận thức được các nguy cơ do các tác dụng phụ của các thành phần tân dược trộn lẫn trái phép gây ra. Các tác dụng phụ nguy hiểm có thể xảy ra giống như khi sử dụng thuốc tân dược lâu dài hoặc quá liều và trong một số trường hợp có thể gây nguy hiểm đến tính mạng của người sử dụng.

1.1.2. Tình hình tân dược trộn trái phép trong đông dược trên thế giới

Tình trạng trộn trái phép tân dược vào thuốc đông dược đang diễn ra phổ biến không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước trên thế giới. Các nhóm hóa dược hay được trộn vào là nhóm thuốc kháng viêm giảm đau glucocorticoid, thuốc giảm đau

không opioid, thuốc giảm glucose máu, thuốc hạ huyết áp, thuốc giảm béo, thuốc chống rối loạn cương dương (thuốc ức chế Phosphodiestarase-5). Trong đó, chiếm tỷ lệ cao nhất là nhóm thuốc giảm đau chống viêm như nhóm thuốc glucocorticoid và thuốc giảm đau không opioid [122]. Dưới đây là tóm tắt tình hình nghiên cứu về các nhóm thuốc này trong các chế phẩm đông dược trên thế giới.

1.1.2.1. Nhóm thuốc giảm đau, chống viêm steroid và phi steroid

Ở Anh đã phát hiện nhiều trường hợp người bệnh nhập viện điều trị do tác dụng phụ khi dùng kem dược liệu có trộn lẫn hydrocortison, clobetason butyrat, betamethason valerat, clobetason propopnat [119]. Tại Ả Rập, Bogusz M.J. và cộng sự đã phát hiện phenylbutazon và dipyrone trong bột dược liệu "Jamu Ragel" từ Indonesia với chỉ định giảm đau thấp khớp năm 2006 [46]. Tại Ấn Độ, Savaliya và cộng sự đã tiến hành định tính 25 dược chất gồm cả giảm đau, chống viêm steroid và phi steroid bằng LC-MS/TOF và phát hiện mẫu đông dược chứa diclofenac, dexamethason, piroxicam [122].

Tại Trung Quốc, Liang và cộng sự đã phân tích hóa dược trộn trái phép trong TPCN và các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu bằng phương pháp LC-MS/MS. Kết quả đã phát hiện 09 mẫu thuốc đông dược có ibuprofen, diazepam [98]. Tại Singapore, Lau và cộng sự cũng phát hiện phenylbutazon, oxyphenylbutazon trộn lẫn trong chế phẩm đông dược [92]. Từ năm 2007 đến nay, Ủy ban Khoa học Sức Khỏe Singapore (Health Science Authority) liên tục công bố các thuốc đông dược lưu hành trên thị trường Singapore có chứa thành phần hóa dược có tác dụng giảm đau chống viêm không được công bố trên nhãn. Nguồn gốc của các thuốc này phần lớn là thuốc bán trên mạng, thuốc gia truyền, hàng xách tay từ Trung Quốc, một số ít có nguồn gốc từ Malaysia. Thuốc được quảng cáo có tác dụng giảm đau chống viêm, hiệu quả trong điều trị viêm khớp và có thành phần hoàn toàn tự nhiên, nhưng thực tế phát hiện trong thuốc có trộn một số tân dược như paracetamol, piroxicam, indomethacin, diclofenac, dexamethason, prednison, prednisolone [71-72; 74].

Tại Thái Lan, Chutima L. và cộng sự đã phát hiện các thuốc nhóm glucocorticoid (dexamethason, prednisolon) trộn trong chế phẩm đông dược, với tỷ lệ chế phẩm phát hiện dương tính trong các năm 2007, 2008, 2011 và năm 2011 lần lượt là 28,57%; 10,39%; 3,33%; 4,41% và 6,95% [53].

Tại Indonesia, Wisnuwardhani và cộng sự đã phát hiện có paracetamol, piroxicam trộn trong chế phẩm đông dược Jamu Pegal Linu năm 2013 [142].

1.1.2.2. Nhóm thuốc hạ glucose máu

Đa số các nghiên cứu phát hiện tân dược để điều trị đái tháo đường thường phát hiện sulfonylurea thế hệ II và metformin được trộn trái phép. Lý do là 2 nhóm thuốc này thường được sử dụng phổ biến trong điều trị đái tháo đường nhờ tác dụng mạnh, giá thành rẻ.

Tại Trung Quốc, Cui và cộng sự tìm thấy 9 trong số 26 mẫu thuốc cổ truyền của Trung Quốc ở các dạng bào chế khác nhau (viên nén, viên nang, viên hoàn và dạng cốm) có chứa 7 loại thuốc chống đái tháo đường tổng hợp [55]. Trong một nghiên cứu tương tự, Li và cộng sự [97] sử dụng phương pháp LC-MS/MS và phát hiện 9 loại thuốc chống đái tháo đường tổng hợp có trong 14 mẫu trên tổng số 30 mẫu thu thập từ thị trường Trung Quốc.

1.1.2.3. Nhóm thuốc ức chế phosphodiesterase (PDE-5)

Chất ức chế PDE-5 là chất ức chế cạnh tranh và chọn lọc trên men PDE-5, làm gia tăng thời gian tác động cGMP trong thể hang dương vật vì vậy làm tăng đáp ứng cương dương bình thường. Các thuốc này có đáp ứng tốt trong điều trị rối loạn cương dương nhưng thuốc có nhiều tác dụng phụ nên việc kê đơn và sử dụng phải được sự giám sát chặt chẽ của bác sĩ điều trị. Mặc dù vậy, tình trạng trộn trái phép thuốc ức chế PDE-5 trong các chế phẩm đông dược ngày càng xảy ra phổ biến. Hơn nữa, các dẫn chất của nhóm cũng được trộn vào các chế phẩm đông dược và gây khó khăn cho việc phát hiện và định lượng [132], [59].

Ở Hàn Quốc, Lee J.H và cộng sự đã thu thập 164 mẫu TPCN được quảng cáo tăng cường sinh lý nam giới trong 4 năm (2009-2012) và phát hiện 77 mẫu có chứa chất ức chế PDE-5 gồm có 55 mẫu phát hiện tadalafil, 36 mẫu phát hiện sildenafil, 17 mẫu phát hiện đồng phân của tadalafil (aminotadalafil, chloropretadalafil, octylnortadalafil), 17 mẫu phát hiện đồng phân sildenafil (dimethylsildenafil, dimethylthiosildenafil, hydroxyhomosildenafil,…), một số mẫu phát hiện vardenafil cùng đồng phân (hydroxyvardenafil) và Icariin [94]. Trong một nghiên cứu khác của Lee E.S và cộng sự [93] đã phân tích đồng thời 38 hợp chất gồm sildenafil, tadalafil, vardenafil và các chất tương tự của chúng trong các chế phẩm thảo dược không đăng ký dùng để điều trị rối loạn cương dương bằng phương pháp LC – ESI – MS/MS. Nhóm nghiên cứu đã thu mua 52 mẫu sản phẩm TPCN chứa thành phần thảo dược được sản xuất bất hợp pháp và không có số đăng ký cùng các mẫu dược liệu được mua ở phía nam Hàn quốc và qua mạng internet. Kết quả cho

thấy 87% số mẫu TPCN chứa một trong các hợp chất nghiên cứu trong đó có 34% số mẫu có chứa sildenafil (0,01 - 77,48 mg/liều) và 81% có chứa tadalafil (0,3 – 52,65 mg/liều).

Tại Mỹ, từ năm 2007 đến nay Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm đã phát hiện ra 407 sản phẩm thực phẩm chức năng có chứa các chất ức chế PDE – 5, chiếm 48% trong tổng số 850 sản phẩm thực phẩm chức năng bất hợp pháp [153].

Tại Pháp, Gilard V. và cộng sự [65] tiến hành nghiên cứu bằng phương pháp ^{1}H NMR để định tính 150 thực phẩm chức năng trên thị trường để tăng cường khả năng sinh lý và khẳng định kết quả lại bằng LC-MS. Kết quả có 61% mẫu đã pha trộn với các chất ức chế PDE-5 (27% với thuốc nhóm ức chế PDE-5 gồm sildenafil, tadalafil, vardenafil và 34% với các dẫn chất của chúng). Trong số mẫu pha trộn đó, 64% chỉ chứa 1 thuốc nhóm ức chế PDE-5 và 36% mẫu có chứa hai, ba và thậm chí bốn thuốc hoặc dẫn chất nhóm PDE-5. Đặc biệt, 25% mẫu khảo sát có chứa thuốc nhóm ức chế PDE-5 cao hơn liều khuyến cáo tối đa.

Tại Yemen, Al-Tahami phát hiện 21 mẫu sản phẩm trên thị trường Yemen có chứa sildenafil trong đó có 1 sản phẩm chứa sildenafil và tadalafil và 1 sản phẩm chứa đồng thời cả ba chất sildenafil, tadanafil và vardenafil [40] .

Tại Thụy Sĩ, Do và cộng sự [60] đã sử dụng HPTLC và LC- ESI/MS để phát hiện các chất ức chế PDE -5 trong viên nén, viên nang, cà phê, kẹo cao su. Kết quả cho thấy 31 mẫu trong 45 mẫu được kiểm tra ở Thụy Sĩ có chứa ít nhất 1 trong các chất sildenafil, tadalafil, propoxyphenyl, dimethylsildenafil, hydroxyhomosildenafil.

Tại Czech, Jiru M. và cộng sự [85] đã xây dựng phương pháp LC-MS/MS để phân tích 59 hoạt chất và dẫn chất ức chế PDE-5. Kết quả, nghiên cứu đã phát hiện trong 64 mẫu sản phẩm thực phẩm chức năng thu thập từ 2009 đến 2015, có 10 mẫu dương tính. Điều đáng báo động là các mẫu này dương tính đồng thời với 4 đến 10 hoạt chất và dẫn chất ức chế PDE-5. Như vậy, các dẫn chất của nhóm này càng được sử dụng để trộn trái phép và ngày càng được phối hợp đồng thời trong cùng một chế phẩm đông dược.

1.1.2.4. Một số thuốc khác

Bên cạnh các nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu và ức chế PDE-5, một số nhóm thuốc khác cũng được phát hiện trộn trái phép trong chế phẩm đông dược như một số ví dụ dưới đây.

Tại Brasil, Moreira và cộng sự xây dựng phương pháp HPLC-ESI-MS/MS định lượng đồng thời 13 thuốc nhóm hạ huyết áp (β-block, angiotensin II, ức chế men chuyển angiotensin và lợi tiểu) và phát hiện được 5/34 mẫu chế phẩm thảo dược đang lưu hành tại Brazil có chứa các thuốc lợi tiểu hydrochlorothiazid và furosemide [111].

Tại Trung Quốc, 3 thuốc điều trị huyết áp (amlodipine, indapamin và valsartan) đã được phát hiện trong Gold Night, một thuốc thảo dược dạng nang mềm, với hàm lượng các thuốc trong viên lần lượt là 1,3 mg, 1,3 mg và 30,8 mg. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng một phần valsartan được hấp thu vào vỏ nang gelatin [87].

Lu và cộng sự sử dụng phương pháp LC/MS để xác định 18 loại thuốc điều trị cao huyết áp trong các TPCN và các thuốc cổ truyền Trung Quốc, Nhật Bản. Trong 35 mẫu được kiểm tra, clonidine (thuốc hạ huyết áp) và hydroclorothiazid (thuốc lợi tiểu) được tìm thấy trong 9 mẫu với tỷ lệ hydrochlorothiazid 1% - 1,3 % (kl/kl) và clonidine 0,11% - 6,5% (kl/kl) [99], .

Sử dụng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại (NIR), Zhang và cộng sự đã phát hiện nifedipin, diclofenac và metformin trong mẫu TPCN trên thị trường Trung Quốc với 38 mẫu có nifedipin (thuốc hạ huyết áp) dương tính, 13 mẫu có diclofenac (thuốc chống viêm) dương tính và 35 mẫu có thuốc hạ đường huyết metformin (thuốc hạ glucose máu) dương tính. Kết quả này cũng được khẳng định lại bằng HPLC [146].

Tại Hàn Quốc, Heo và cộng sự dụng phương pháp UPLC – UV để phát hiện đồng thời 25 chất có tác dụng điều trị cao huyết áp trong TPCN. Trong số 97 mẫu được kiểm tra phát hiện 2 mẫu chứa atenolol có hàm lượng 16,81 – 28,07 µg/kg [77].

1.1.3. Tình hình tân dược trộn trái phép trong đông dược tại Việt Nam

Tại Việt Nam, nhiều nhóm nghiên cứu đã xây dựng các phương pháp phát hiện thuốc giảm đau chống viêm trộn trái phép trong chế phẩm đông dược. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên chỉ dừng ở mức độ phát hiện định tính trong khi đó, việc xác định chính xác hàm lượng của các tân dược trộn lẫn trong đông dược có ý nghĩa quan trọng trong công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc. Phát hiện tân dược trộn trong chế phẩm đông dược cũng là một trong những định hướng cho mạng lưới kiểm nghiệm trong các năm tới, khi mà các trung tâm kiểm nghiệm bắt đầu được trang bị các công cụ phân tích mạnh như HPTLC, HPLC hay LC-MS [24]. Hiện nay đã có một số nghiên cứu tiến hành định tính, định lượng các thuốc giảm đau chống viêm trên hệ thống HPLC.

Với tính chất phổ biến, dễ trộn, cùng với các tác dụng phụ nguy hiểm tiềm ẩn khi dùng liều cao kéo dài, các chất thuộc nhóm giảm đau chống viêm đã được phát hiện trong chế phẩm đông dược từ sớm. Năm 2001, Nguyễn Thị Lâm và cộng sự đã tiến hành phân tích tìm tân dược trên một số mẫu thuốc đông dược bằng phương pháp TLC và HPLC, phát hiện mẫu thuốc "Ban nóng ho" của Việt Nam đông dược hãng có chứa paracetamol [22]. Theo báo cáo của Nguyễn Đăng Lâm, trong năm 2005 nang mềm "Tăng phì hoàn (Ceng Fui Yen)" do Công ty Dược phẩm WELIP, Malaysia sản xuất bị phát hiện có trộn dexamethason và cyproheptadin. Năm 2007 phát hiện chế phẩm "Dân tộc cứu nhân vật", sản xuất tại Campuchia có trộn 4 loại tân dược dexamethason, diazepam, paracetamol và cyproheptadin [21]. Năm 2009, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương phát hiện thuốc "Giải Biểu Hoàn" của một lương y ở Bắc Giang và thuốc "Chỉ Thống" của một lương y ở Bắc Ninh có trộn paracetamol [38]. Năm 2010 đã phát hiện cơ sở sản xuất thuốc Y học cổ truyền Hinh Hòa có mẫu "Khu Phong Tê Thấp Thủy" và "Truy Phong Tê Thấp Thủy" bị trộn betamethason. Một số mẫu thuốc đông dược điều trị gút cũng bị phát hiện có paracetamol, indomethacin hay dexamethason acetat [38].

Năm 2011, Lê Đào Khánh Long và cộng sự tiến hành định tính đồng thời một số glucocorticoid như dexamethason, betamethason, prednison, prednisolon và hydrocortison trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và phát hiện trong 26 mẫu đông dược lấy từ thị trường có 7 mẫu (22%) có dexamethason hoặc betamethason [26]. Năm 2011, Trần Thị Hoàng Chi và cộng sự tiến hành định tính, định lượng dexamethason acetat và betamethason acetat trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng HPLC, ứng dụng trên 8 mẫu thuốc đông dược và cho kết quả có 6 mẫu dương tính [10].

Năm 2013, nhiều công bố liên tục phát hiện thuốc giảm đau chống viêm trộn trái phép trong đông dược cho thấy tình hình đáng báo động. Ví dụ, Trịnh Thị Quy đã tiến hành phân tích 3 glucocorticoid (dexamethason, prednisolon acetat, dexamethason acetat) trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp HPLC với detector DAD. Trong 12 mẫu khảo sát phát hiện có 3 mẫu trộn trái phép dexamethason và dexamethason acetat [33]. Đặc biệt, Cao Công Khánh và cộng sự đã xây dựng được quy trình xác định đồng thời các chất giảm đau, chống viêm, lợi tiểu và giảm béo gồm sibutramin, furosemid, piroxicam và dexamethason trộn lẫn trong các TPCN bằng phương pháp HPLC, thời gian phân tích 15 phút. Đối tượng là các loại TPCN dạng viên nén, viên nang và dung dịch hỗ trợ điều trị giảm cân, hỗ trợ

điều trị các bệnh về xương khớp, gút được lấy ngẫu nhiên tại Hà Nội [12]. Tuy nhiên, kết quả chủ yếu phát hiện 5/20 mẫu dương tính với silbutramin. Trước tình hình đó, nhiều đơn vị tích cực xây dung các quy trình định tính và định lượng nhóm giảm đau như Đào Văn Đôn và cộng sự tại Học viên Quân y đã xây dựng quy trình định lượng đồng thời đồng thời dexamethason acetat, betamethason và prednisolon bằng phương pháp HPLC. Quy trình có thể ứng dụng để kiểm tra các chế phẩm đông dược trên thị trường tuy nhiên chỉ giới hạn với 3 chất dexamethason acetat, betamethason và prednisolon [10].

Đối với thuốc ức chế PDE-5, Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương đã phân tích 2 mẫu "Supai 99 Tongkat Ali Plus" và một số mẫu khác, kết quả 7 trong số 12 mẫu thử có trộn trái phép nhóm ức chế PDE-5 [25]. Năm 2010, đơn vị này cũng đã phát hiện TPCN "Viên Bổ Thận Hà Thành" với tác dụng bổ thận tráng dương, tăng cường sinh lý, có trộn trái phép Sildenafil hàm lượng lên tới 98 mg/ viên. Năm 2013, Cục Vệ sinh An toàn thực phẩm có Quyết định số160/QĐ-ATTP thu hồi hiệu lực giấy chứng nhận tiêu chuẩn cho sản phẩm "Thực phẩm bảo vệ sức khỏe Khải Việt Hương cảng Canh Công Phu" vì sản phẩm này có chứa hoạt chất sildenafil hàm lượng 4 mg/g, dù được quảng cáo là "100% từ thảo dược". Năm 2014, Cục Vệ sinh An toàn thực phẩm cũng có quyết định thu hồi và tiêu hủy toàn bộ sản phẩm "Kim thận bảo 1 New", một loại thực phẩm chức năng của Công ty TNHH Thương mại dược phẩm Nam Á do có chứa chất tadalafil (36 mg/viên) và sildenafil (123 mg/viên). Gần đây, sản phẩm "Avena plus" của công ty Việt Nam Canoves và sản phẩm "Uy Mãnh Nang" của Công ty Minh Bang Việt Nam đã bị Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia phát hiện có chứa sildenafil và Cục Vệ sinh An toàn thực phẩm đã có quyết định tạm dừng lưu thông, thu hồi lô 2 sản phẩm trên.

Trong những năm gần đây, bệnh đái tháo đường đang có xu hướng gia tăng nên số lượng người bệnh sử dụng chế phẩm đông dược giúp ổn định đường huyết tăng cao, kéo theo các phát hiện trộn trái phép các thuốc giảm glucose máu. Năm 2017, Vũ Ngọc Thắng và cộng sự [35] đã xây dựng phương pháp HPLC định lượng đồng thời 6 thuốc hóa dược glibenclamid, gliclazid, glimerpirid, glipizid, rosiglitazon, pioglitazon điều trị tiểu đường trên nền 2 nền mẫu viên nang cứng bào chế từ dược liệu có tác dụng hạ đường huyết kiểm tra không có chất nghiên cứu với cột C18, pha động là dung dịch đệm gồm triethylamin điều chỉnh về pH 3,4 bằng acid phosphoric, phát hiện ở bước sóng 230 nm. Nghiên cứu này mới dừng lại ở phần

thẩm định phương pháp, trong đó rosiglitizon, pioglitazon đã bị rút giấy phép đăng ký tại thị trường Việt Nam. Năm 2018, Phan Nguyễn Trường Thắng và cộng sự [34] đã tiến hành trên 10 mẫu chế phẩm đông dược trị bệnh tiểu đường tại Cần Thơ với các phép định tính trên TLC, HPLC và LC-MS đã phát hiện phenformin, metformin HCl trộn lẫn trái phép.

Như vậy có thể thấy tình hình chế phẩm thảo dược, TPCN bị trộn trái phép các tân dược thuộc nhiều nhóm thuốc có tác dụng dược lý khác nhau ở mức độ báo động trên phạm vi toàn thế giới. Trong đó, 16 tân dược bao gồm paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison, glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid, sildenafil, tadalafil và vardenafil được phát hiện trộn trái phép trong chế phẩm đông dược tại nhiều nước trên thế giới. Một số quốc gia đã có các nghiên cứu độc lập thu thập mẫu và đánh giá thực trạng một cách tổng quát. Còn ở Việt Nam, các mẫu phát hiện có trộn tân dược trong chế phẩm đông dược chủ yếu là do thanh tra lấy mẫu của cơ quan quản lý nên kết quả thu được mang tính chất sự vụ, lẻ tẻ chưa phản ánh đúng tình hình thực tiễn.

1.2. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu

Từ tổng quan tài liệu nghiên cứu cho thấy các dược chất hay bị trộn trái phép trong chế phẩm đông dược thuốc 4 nhóm giảm đau, chống viêm steroid và phi steroid, giảm glucose máu, ức chế PDE-5. Các dược chất được lựa chọn trong luận án này đều được chỉ định ban đầu trong phác đồ điều trị các bệnh xương khớp, bệnh đái tháo đường và bệnh lý liệt dương. Đây cũng là các bệnh lý thường gặp hiện nay và có nhiều chế phẩm đông dược tại Việt Nam hỗ trợ điều trị các bệnh lý này. Mặt khác, 16 dược chất nghiên cứu đều phổ biến, giá tương đối rẻ, dễ mua; hơn nữa đều có tỷ lệ trộn cao trong chế phẩm đông dược.

1.2.1. Nhóm giảm đau, chống viêm steroid và phi steroid

1.2.1.1. Tác dụng

Hormon vỏ thượng thận gồm 3 loại: Mineral corticoid (có tác dụng trao đổi chủ yếu lên chất khoáng), glucocorticoid (có tác dụng chủ yếu lên trao đổi hydrat carbon) và các steroid sinh dục. Glucocorticoid tự nhiên do vùng bó vỏ thượng thận sản xuất ra gồm 2 chất hydrocortison và cortison.

Glucocorticoid tổng hợp gồm rất nhiều chất khác nhau được nghiên cứu biến đổi công thức để cải thiện tác dụng, kéo dài thời gian tác dụng và giảm tác dụng phụ [6]. Ở nồng độ sinh lý các chất này cần cho cân bằng nội môi, tăng sức chống đỡ của cơ thể với stress và duy trì các chức năng khác của cơ thể như tác dụng trên chuyển hóa, trên các cơ quan và tuyến, ức chế miễn dịch … Trong đó tác dụng chống viêm, chống dị ứng được áp dụng trong điều trị một số bệnh mãn tính như thấp khớp, hen phế quản, viêm xoang,… [4], [6].

Các NSAID ức chế COX qua đó ức chế tổng hợp prostaglandin và thromboxan. Có hai dạng COX: COX-1 cần thiết để tổng hợp prostaglandin bảo vệ niêm mạc dạ dày và thromboxan cần thiết cho tiểu cầu kết dính, COX-2 tham gia tạo ra prostaglandin khi có viêm. Các thuốc chống viêm ức chế không chọn lọc cả hai loại COX-1và COX-2, bao gồm ibuprofen, indomethacin, naproxen, piroxicam, diclofenac, ketoprofen. Các thuốc ức chế chọn lọc COX-2 có thể gây các tác dụng phụ ở thận giống như các thuốc không chọn lọc. Các thuốc ức chế chọn lọc COX-2 không cải thiện tiến triển dài hạn của bệnh viêm khớp dạng thấp về phương diện biến đổi cấu trúc của bệnh khi so sánh với các thuốc NSAID thông thường [3].

Paracetamol có tác dụng giảm đau và ít có tác dụng chống viêm nên không dùng để điều trị lâu dài các bệnh có viêm gây đau. Tuy vậy, paracetamol có thể dùng để điều trị đau do thoái hóa khớp, một bệnh ít viêm. Paracetamol không tác dụng trên cyclooxygenase (COX) toàn thân, chỉ tác động COX của hệ thần kinh trung ương [3].

1.2.1.2. Tác dụng không mong muốn

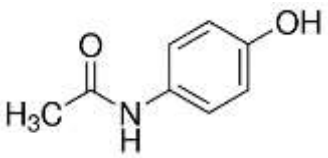
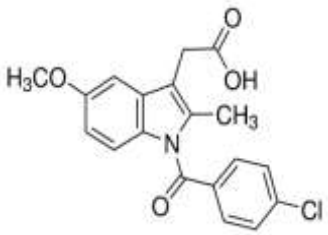
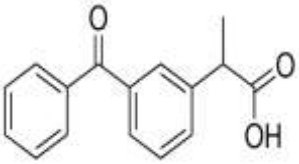
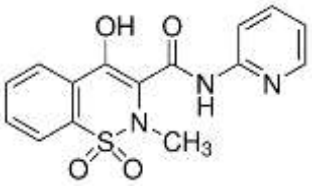
Những tác dụng này thường gặp ở những người dùng thuốc lâu dài hoặc dùng quá liều. *Tác dụng không mong muốn hay gặp*: Suy tuyến thượng thận do khi dùng thuốc, glucocorticoid từ ngoài vào cơ thể sẽ làm ức chế tuyến thượng thận bài tiết, dẫn đến tình trạng suy giảm khả năng bài tiết glucocorticoid của chính cơ thể người đó. Lúc đó cơ thể hay mệt mỏi, nôn ói, nặng hơn nữa có thể gây huyết áp thấp hay tụt huyết áp. Tăng cân do giữ muối nước, cơ thể bệnh nhân mập ra, bụng to, chân tay teo lại, da mỏng dễ bầm máu, nứt da bụng ... Loét dạ dày tá tràng, loãng xương. Gây hại cho thai nhi. Làm trẻ em chậm phát triển chiều cao [4]. **Đối với paracetamol**: Paracetamol là chất chuyển hóa có hoạt tính của phenacetin. Ở liều điều trị, paracetamol ít tác động đến hệ tim mạch và hô hấp, không làm thay đổi cân bằng acid–base, không gây kích ứng, xước hoặc chảy máu dạ dày như khi dùng salicylate. Paracetamol không tác dụng trên cyclooxygenase (COX) toàn thân, chỉ tác động đến

COX của hệ thần kinh trung ương. Tuy nhiên khi dùng quá liều paracetamol có thể gặp phản ứng dị ứng như ban đỏ, mày đay, trầm trọng hơn là phản ứng độc với gan do chính chất chuyển hóa của paracetamol là N-acetyl-benzoquinonimin gây ra [3].

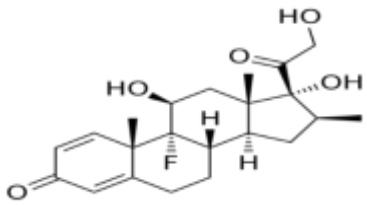
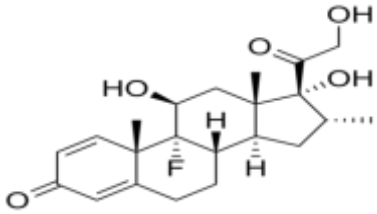
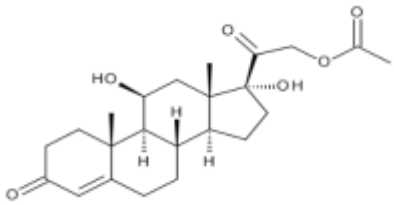
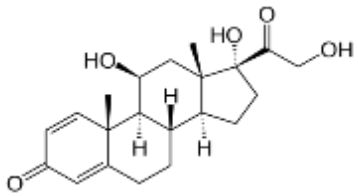
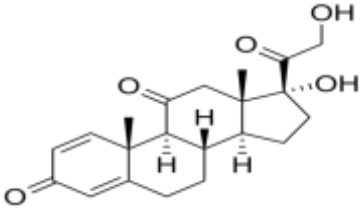
1.2.1.3. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng

Các hoạt chất tân dược giảm đau, chống viêm gồm paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison được trình bày Bảng 1.1 và Bảng 1.2.

Bảng 1.1. Cấu trúc hoá học, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc giảm đau, chống viêm phi steroid nghiên cứu

Tên chất	**Công thức hóa học, cấu trúc hóa học**	**Tính tan, liều dùng**
Paracetamol (PARA)	$C_8H_9NO_2$ (M= 151,2) 	*Tính tan:* Hơi tan trong nước, tan nhiều hơn trong nước sôi; rất khó tan trong cloroform, ether; dễ tan trong dung dịch kiềm, ethanol 96%, methylen clorid. *Liều dùng:* 325 – 650 mg, cứ 4 – 6 giờ một lần, không quá 4 g một ngày [4], [9].
Indomethacin (INDO)	$C_{19}H_{16}ClNO_4$ (M= 357,8) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, tan trong ethanol, aceton; vững bền trong môi trường trung tính hay acid yếu, phân hủy trong dung dịch kiềm mạnh. *Liều dùng:* 25 mg/lần, uống 2 – 3 lần/ngày, tối đa 150 – 200 mg/ngày [4], [9].
Ketoprofen (KETO)	$C_{16}H_{14}O_3$ (M=254,3) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, dễ tan trong aceton, ethanol, và methylen clorid. *Liều dùng:* 50 mg, dùng 3 lần/ngày, có thể tăng liều tới 100 mg, dùng 2 – 3 lần/ngày [4], [9].
Piroxicam (PIRO)	$C_{15}H_{13}N_3O_4S$ (M=331,4) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, methylen clorid ; hơi tan trong ethanol. *Liều dùng:* 20 – 40 mg/ngày [4], [9].

Bảng 1.2.Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc glucocorticoid

Tên chất	Công thức hóa học,cấu trúc hóa học	Tính tan, liều dùng
Betamethason (BETA)	$C_{22}H_{29}FO_5$ (M= 392,5) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, ít tan trong ethanol 96%, rất ít tan trong methylen clorid. Hấp thụ UV với λ_{max} = 238,5 nm/ethanol 96% *Liều dùng:* 0,5 – 5 mg/ngày [4], [9].
Dexamethason acetat (DEXA)	$C_{24}H_{31}FO_6$ (M= 434,5) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, tan tốt trong aceton, cồn, hơi tan trong methylen clorid. Hấp thụ UV với λ_{max} = 238,5 nm/ethanol 96% *Liều dùng:* 0,75 – 9 mg/ngày [4], [9].
Hydrocortison acetat (HYRO)	$C_{23}H_{32}O_6$ (M= 404,503) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, khó tan trong ethanol và methylen clorid. Hấp thụ UV với λ_{max} = 241,5 nm/ethanol 96% *Liều dùng:* 5 – 50 mg/ngày [4], [9].
Prednisolon (PREL)	$C_{21}H_{28}O_5$ (M= 360,45) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, hơi tan trong ethanol và methylen clorid. Hấp thụ UV với λ_{max} = 243,5 nm/ethanol 96% *Liều dùng:* 5 – 60 mg/ngày [4], [9].
Prednison (PREN)	$C_{21}H_{26}O_5$ (M= 358,43) 	*Tính tan:* Không tan trong nước, khó tan trong ethanol 96% và methylen clorid. Hấp thụ UV với λ_{max} = 238 nm/ethanol 96%. *Liều dùng:* 5 – 30 mg/ngày [4], [9].

1.2.2. Nhóm giảm glucose máu

1.2.2.1. Tác dụng

Đa số nghiên cứu phát hiện tân dược đái tháo đường được trộn trái phép là sulfonylurea thế hệ II. Sulfonylurea thế hệ II hay sử dụng gồm Glibenclamid, Gliclazid, Glimepirid, Glipizid đều có tác dụng nhanh, mạnh.

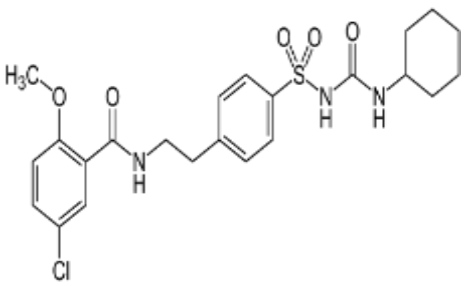
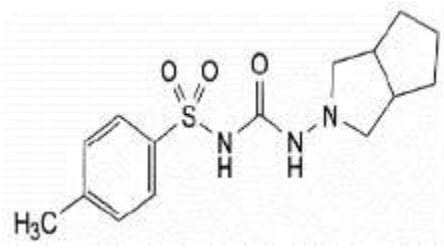
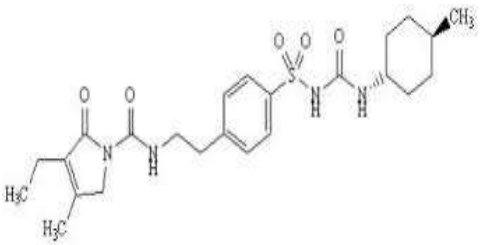
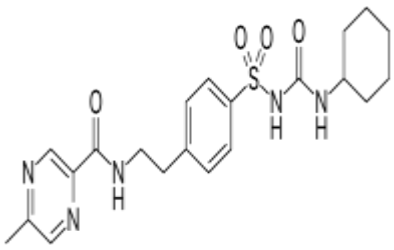
Cơ chế tác dụng: kích thích trực tiếp tế bào beta đảo Langerhan của tuyến tuỵ tăng sản xuất insulin làm giảm nồng độ glucose trong máu. Làm tăng số lượng receptor của insulin ở các tế bào, đặc biệt là các tế bào mỡ, hồng cầu, bạch cầu đơn nhân, do đó làm tăng tác dụng của insulin. Ức chế nhẹ tác dụng của glucagon. Thuốc không có tác dụng khi cơ thể không còn khả năng tiết insulin. [36]

1.2.2.2. Tác dụng không mong muốn

- Tác dụng không mong muốn: Hạ glucose huyết, rối loạn tiêu hoá, vàng da ứ mật, mỏi cơ, viêm mạch dị ứng, chóng mặt, rối loạn tâm thần, ban da, rối loạn tạo máu. [3], [36]

1.2.2.3. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng

Bảng 1.3. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc giảm glucose máu

Tên chất	**Công thức hóa học, cấu trúc hóa học**	**Tính tan, liều dùng**
Glibenclamid (GLIB)	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ (494,0) 	*Tính tan:* không tan trong nước và ether, hơi tan trong dicloromethan, khó tan trong methanol và ethanol 96%, tan trong dung dịch kiềm loãng *Liều dùng:* 2,5 - 5 mg/ngày. Tối đa 15 mg/ngày [4], [9].
Gliclazid (GLIC)	$C_{15}H_{21}N_3O_3S$ (323.4) 	*Tính tan:* Thực tế không tan trong nước, dễ tan trong dicloromethan, hơi tan trong aceton, khó tan trong ethanol. *Liều dùng:* 40 - 80 mg. Tối đa 320 mg/ngày [4], [9].
Glimepirid (GLIM)	$C_{24}H_{34}N_4O_5S$ (490.6) 	*Tính tan:* không tan trong nước, tan trong dimethylformamid, ít tan trong dicloromethan, rất ít tan trong methanol. *Liều dùng:* 1-4 mg/ngày. Tối đa 8 mg/ngày [4], [9].
Glipizid (GLIP)	$C_{21}H_{27}N_5O_4S$ (M = 445.5) 	*Tính tan:* gần như không tan trong nước, tan ít trong dicloromethan, aceton, ... Thực tế không tan trong ethanol 96%. Hòa tan tốt trong dung dịch kiềm *Liều dùng:* 5 mg/ngày. Duy trì 15mg/ ngày [4], [9].

1.2.3. Nhóm ức chế PDE-5

1.2.3.1. Tác dụng

Chất ức chế PDE-5 dùng trong điều trị rối loạn cương dương là chất ức chế cạnh tranh, chọn lọc trên PDE-5 (là men có nhiều ở thể hang dương vật). Khi có kích thích tình dục, nitric oxid từ các dây thần kinh, tế bào nội mô mạch máu, sẽ phóng thích vào thể hang làm giãn các mạch máu và thể hang dương vật gây hiện tương cương dương. Chất ức chế PDE-5 sẽ ngăn chặn quá trình phân hủy cGMP, từ đó làm tăng cường tác dụng giãn mạch của nitric oxid và khôi phục khả năng cương của dương vật ở những bệnh nhân bị rối loạn cương dương.[49]

Sildenafil, tadalafil và vardenafil là 3 hoạt chất có khả năng ức chế PDE-5 nên được sử dụng để điều trị rối loạn cương dương. Ngoài ra, sildenafil và tadalafil còn được sử dụng để cải thiện khả năng vận động ở người trưởng thành khi có triệu chứng tăng huyết áp động mạch phổi (pulmonary arterial hypertension – PAH: áp lực máu cao trong mạch máu đến phổi là gây ra khó thở, chóng mặt, mệt mỏi) Sildenafil và tadalafil điều trị chứng PAH bằng cách giãn mạch phổi và giúp máu lưu thông dễ dàng hơn

Dù ba chất này có cùng cơ chế hoạt động, nhưng do sự khác biệt về cấu trúc phân tử (sildenafil và vardenafil có cấu hóa học tương đối giống nhau nhưng tadalafil lại rất khác) dẫn đến sự khác nhau về dược động học và hiệu quả lâm sàng. Tadalafil có tác dụng kéo dài hơn, ít tác dụng phụ hơn và hấp thu không bị ảnh hưởng thức ăn.

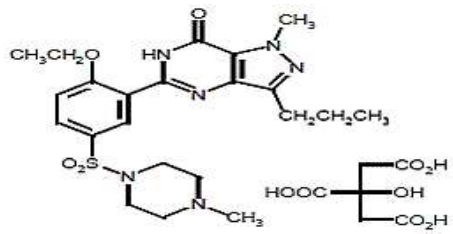
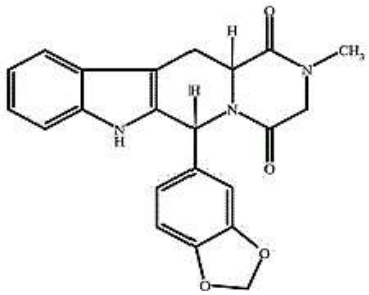
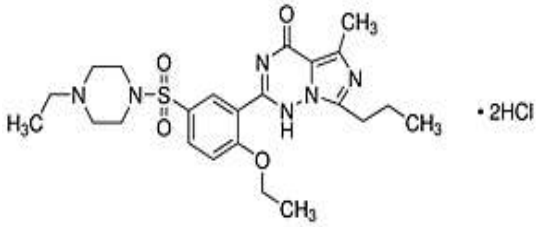
Ba chất này thuộc chung nhóm chất gọi là nhóm chất ức chế phosphodiesterase 5(PDE – 5), có nhiều tác dụng phụ và là những thuốc phải kê đơn và khi sử dụng phải được sự giám sát chặt chẽ của bác sĩ điều trị.

1.2.3.2. Tác dụng không mong muốn

Nhóm ức chế PDE-5 có thể gây ra tác dụng phụ như: đau đầu, ợ nóng, tiêu chảy, chảy máu cam, rối loạn giấc ngủ, tê, rát hoặc ngứa ran ở tay, bàn tay, bàn chân, hoặc cẳng chân, đau cơ, có vấn đề về tầm nhìn, nhạy cảm với ánh sáng. Một số tác dụng phụ có thể nghiêm trọng hơn như: đột ngột mất thị lực nghiêm trọng, mờ mắt, ù tai, giảm hoặc mất thính giác đột ngột, chóng mặt, đầu lâng lâng, ngất xỉu, tức ngực, khó thở, dương vật cương cứng, đau đớn kéo dài hơn 4 giờ, ngứa hoặc nóng rát khi tiểu, phát ban [129].

1.2.3.3. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng

Bảng 1.4. Cấu trúc, tính chất vật lý và liều dùng của các thuốc ức chế PDE-5

Tên chất	**Công thức hóa học, cấu trúc hóa học**	**Tính tan, liều dùng**
Sildenafil citrat	$C_{22}H_{30}N_6O_4S.C_6H_8O_7$ (M= 666,7) 	*Tính tan:* không tan trong nước và ethanol, tồn tại dưới dạng muối với acid citric. *Liều dùng:* 50 mg/ngày. Liều dao động từ 25 - 100 mg/ngày [129], [136].
Tadalafil	$C_{22}H_{19}N_3O_4$ (M = 389,4) 	*Tính tan:* hầu như không tan trong nước, tan không đáng kể trong methanol aceton và ethanol *Liều dùng:* 10 mg/ ngày. Liều có thể dao động từ 5-20 mg/ngày [129], [136].
Vardenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S \cdot 2HCl$ (M = 561,5) 	*Tính tan:* hầu như không tan trong nước, tan không đáng kể trong methanol aceton và ethanol *Liều dùng:* 10 mg/ ngày. Liều có thể dao động từ 5-20 mg/ngày [129], [136].

1.3. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu

1.3.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng (TLC) là một kỹ thuật sắc ký dùng để tách các chất trong hỗn hợp nhiều thành phần, được tiến hành khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh, trên đó đã có hỗn hợp các chất cần tách. Pha tĩnh của TLC là các hạt có kích thước 10 - 30 µm, được rải đều và kết dính thành lớp mỏng đồng nhất, dày khoảng 250 µm trên giá đỡ làm bằng thuỷ tinh, nhôm hoặc chất dẻo. Một số chất thường dùng

làm pha tĩnh là silica, dẫn chất siloxan, cellulose, nhôm oxyd, gel sephadex,... trong đó được dùng phổ biến nhất là silica (SiO_2) và nhôm oxyd.

Pha động thay đổi tuỳ thuộc vào cơ chế sắc ký. Cơ chế tách có thể là hấp phụ, phân bố, trao đổi ion, sàng lọc phân tử hay sự phối hợp đồng thời của nhiều cơ chế, tùy thuộc vào tính chất của hai pha. Để tăng cường sức rửa giải, thường kết hợp 2 - 3 dung môi. Pha động di chuyển qua pha tĩnh nhờ lực mao dẫn. Các chất phân tích sẽ di chuyển với tốc độ khác nhau tùy thuộc vào bản chất của chúng, kết quả là chúng được tách riêng, có vị trí khác nhau trên bản mỏng. Đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của các chất phân tích là hệ số lưu giữ R_f. Trị số này được tính bằng tỷ lệ giữa quãng đường di chuyển của chất phân tích và quãng đường di chuyển của pha động [2], [9], [56] .

$$R_f = d_R / d_M$$

d_R: Khoảng cách từ điểm xuất phát đến tâm vết phân tích (cm).

d_M: Khoảng cách từ điểm xuất phát đến mức dung môi pha động (đo trên cùng đường đi của vết, tính bằng cm).

R_f: có giá trị dao động giữa 0 và 1.

1.3.1.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC)

❖ Khái niệm

Sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) là một hình thức tiên tiến của TLC. HPTLC được điều khiển bởi phần mềm thích hợp, đảm bảo độ tin cậy, độ lặp lại cao nhất các số liệu đưa ra. Trong đó, các thông số của quá trình phân tích được ghi lại và kiểm soát chặt chẽ. Các bước của quá trình tiêm mẫu, khai triển, nhận diện vết được tiến hành bằng thiết bị tự động hoặc bán tự động, giảm thiểu tối đa sai số có thể gặp trong quá trình phân tích. Một vài thông số giữa HPTLC và TLC được so sánh trong Bảng 1.5, [42], [127].

Bảng 1.5 So sánh một vài thông số giữa HPTLC và TLC

Tham số	**HPTLC**	**TLC**
Kỹ thuật	Tự động/ Bán tự động	Thủ công
Kích thước hạt trung bình	5 - 6 µm	10 - 30 µm
Độ dày lớp pha tĩnh	100 µm	250 µm
Hiệu lực tách	Cao	Thấp hơn

Thời gian phân tích	Nhanh	Chậm hơn
Dụng cụ chấm vết	Kim chấm	Mao quản, pipet
Sai số chấm vết	0,5 - 2%	2 - 10%
Thể tích chấm vết	0,1 - 500 µL	1 - 10 µL
Kích thước vết	Kiểm soát được	Không kiểm soát được
Dải bước sóng phát hiện	200 - 800 nm	254 nm, 365 nm hoặc ánh sáng thường
Phân tích phổ	Có	Không
Giới hạn phát hiện	100 – 500 pg	1 – 5 ng

Quá trình phân tích bằng HPTLC



Hình 1.2.Quy trình phân tích và các thiết bị trong HPTLC [127]

Ưu, nhược điểm của HPTLC

✓ **Ưu điểm**

- Phù hợp với cả phân tích định tính và định lượng, do bộ phận scanner có thể ghi lại phổ hấp thụ của chất, nên định tính đặc hiệu hơn so với TLC thông thường, định lượng chính xác hơn so với chụp ảnh và đo mật độ màu của vết.

- Trong một lần khai triển sắc ký có thể phân tích đồng thời nhiều mẫu cùng lúc, tiết kiệm thời gian và chi phí cho hóa chất, vật tư tiêu hao. Thời gian và chi phí cho mỗi lần phân tích thấp.
- Các mẫu phân tích và các mẫu chuẩn được chấm trên cùng một bản mỏng sắc ký, khai triển cùng lúc trong cùng điều kiện dung môi, nhiệt độ, độ ẩm nên cho độ lặp lại cao, hạn chế sự tác động của môi trường giữa các lần phân tích.
- Chuẩn bị mẫu đơn giản, không cần xử lý trước như lọc và khử khí, lượng dung môi pha động tiêu thụ cho mỗi mẫu thấp.
- Về mặt kỹ thuật, rất đơn giản để tìm hiểu và vận hành.
- Pha tĩnh có độ chọn lọc cao để tách các thành phần trong hỗn hợp nhiều chất [127].

✓ **Nhược điểm**

Nền mẫu đông dược rất phức tạp, thành phần đa dạng, các thành phần trong dược liệu có thể xuất hiện tại vị trí phát hiện chất phân tích nên có thể xảy ra hiện tượng dương tính giả hoặc âm tính giả khi phương pháp không đáp ứng về độ nhạy [127].

1.3.1.2. Ứng dụng của TLC để phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược

HPTLC là một phương pháp kỹ thuật tiên tiến, đang có ứng dụng tích cực trong phân tích định tính và định lượng một loạt các hợp chất, đặc biệt với các thảo dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe có nguồn gốc thảo dược [127]. Phương pháp HPTLC có khả năng định tính và định lượng các thuốc tân dược trộn trái phép, nên nhiều nghiên cứu công bố trong những năm gần đây, theo Bảng 1.6.

Bảng 1.6. Các nghiên cứu phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp TLC

Nền mẫu	Hoạt chất	Phương pháp phân tích	Tài liệu
Thuốc hoàn, nang, nén, dung dịch đông dược	Dexamthason, Betamethason, Prednison, Prednisolon, Hydrocortison acetat, Dexamethason acetat	**TLC** Xây dựng được 5 hệ dung môi triển khai Phát hiện vết : đèn UV (254nm). Thuốc thử phát hiện : xanh tetrazolium, H_2SO_4/cồn có Formaldehyd. LOD từ 0,016 – 0,3 µg/vết	[26]
Viên nang, viên nén, bột, trà túi lọc	Dexamthason, Prednisolon	**TLC** Bản mỏng : silica gel 60 F254. Hệ dung môi triển khai : diclormethan-methanol (9 :1).Phát hiện vết : soi UV (254nm). LOD là 0,5 mg/ml	[53]
Thực phẩm chức năng	Paracetamol, Dexamethason, Prednison, Piroxicam Acid mefenanic	**TLC** Bản mỏng silica gel GF 254, và hệ dung môi triển khai gồm cloroform-methanol và bước sóng phát hiện vết UV (254 nm). Phương pháp xây dựng paracetamol có dãy nồng độ từ 0,04 đến 0,24 mg/ml.	[142]
Viên nén Viên nang Trà túi lọc Thuốc hạt	Tolbutamid, Acetohexamid, Chlorpropamid, Gliclazid, Glibenclamid, Glimepirid	**TLC** - Pha động: n-butyl acetat có chứa 0,4 % acid formic. Quan sát vết ở UV 254 nm - Thuốc thử phát hiện : Dragendoff, dung dịch acid phosphomolybdic 10%/methanol, dung dịch acid sulfuric 30%/methanol. LOD từ 0,25 – 2,0 µg/vết	[90]
Thực phẩm chức năng	Sibutramin	**TLC** -Bản thủy tinh HPTLC silcagel 60 F254 - Hệ dung môi triển khai n-hexan-aceton-ammonia (10:1:0,1, v/v/v). -Khoảng nồng độ sibutramin từ 250-2000 ng/vết. LOD là 1,71 µg/ml.	[44]
Thực phẩm chức năng (cafe, thức uống, viên nang, trà, gel)	Sibutramin	**TLC** -Bản thủy tinh TLC silcagel 60 F254 -Hệ dung môi triển khai toluene-n-hexane-diethylamine (9:1:0,3, v/v/v). -LOD, LOQ tương ứng 190 và 634 ng/vết.	[115]

1.3.2. Phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp với quang phổ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS)

1.3.2.1. Nguyên lý cơ bản của quang phổ Raman

Khi chiếu photon có tần số ν_0 tới một phân tử, photon bị tán xạ theo tất cả các hướng. Tán xạ này xảy ra do va chạm giữa các photon có tần số ν_0 và các phân tử. Tán xạ có thể là đàn hồi hoặc không đàn hồi. Trong trường hợp tán xạ đàn hồi, các photon bị tán xạ có cùng tần số ν_0 với photon tới (trường hợp này được gọi là tán xạ Rayleigh), xác suất xảy ra quá trình này là lớn. Một số lượng nhỏ của photon tới tương tác với liên kết của phân tử. Các tương tác này là không đàn hồi, sau va chạm có trao đổi năng lượng giữa photon và liên kết làm thay đổi trạng thái dao động liên kết. Các tán xạ này gọi chung là tán xạ Raman. Nếu phân tử nhận năng lượng từ photon tới thì tần số của photon tán xạ là $\nu_0 - \nu$ (tán xạ này gọi là tán xạ tán xạ Stokes). Ngược lại, khi photon tới nhận năng lượng từ phân tử thì tần số của photon tán xạ là $\nu_0 + \nu$ (tán xạ này gọi là tán xạ tán xạ đối Stokes).

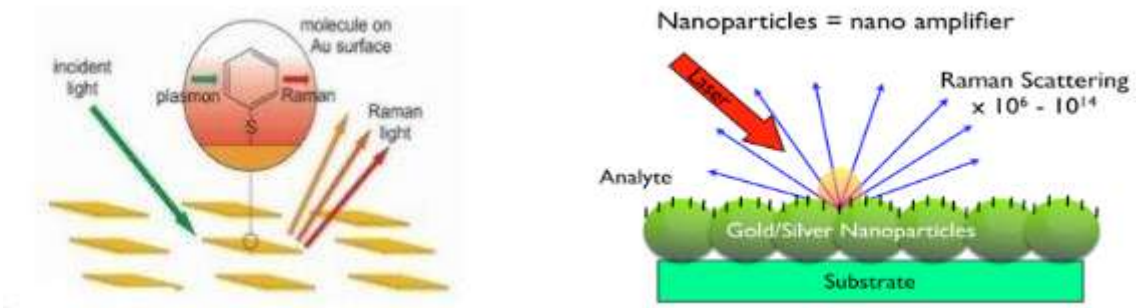
Tán xạ stokes xảy ra khi một photon tương tác với một phân tử ở trạng thái năng lượng cơ bản, còn tán xạ đối stokes xảy ra khi photon tương tác với phân tử ở trạng thái kích thích. Ở điều kiện thường, hầu hết các phân tử đều ở trạng thái cơ bản nên tán xạ stokes dễ xảy ra và chiếm đa số. Vì vậy, trong các phép đo phổ Raman, người ta thường đo tán xạ stokes.

1.3.2.2. Phổ Raman tăng cường bề mặt SERS (Surface enhanced Raman spectroscopy)

Quang phổ học Raman đã được phát triển từ thế kỷ XIX và trở thành một công cụ quan trọng trong các phòng thí nghiệm phân tích hóa học, khoa học vật liệu, y-dược, sinh học…Đối với mỗi một chất, phổ Raman là đặc trưng và duy nhất cho chất đó, đồng thời mỗi nhóm chức thì cho đỉnh phổ ở các số sóng đặc trưng khác nhau. Vì vậy, phổ Raman được xem là phổ vân tay để xác định chất phân tích. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là tín hiệu yếu và có hiện tượng phát huỳnh quang khi mẫu đo được kích thích bởi nguồn có bước sóng phù hợp, gây khó khăn khi phân tích mẫu ở nồng độ thấp. Hiệu ứng tán xạ Raman tăng cường bề mặt (SERS) được phát hiện vào năm 1970 nhờ đó tín hiệu Raman được tăng lên nhiều lần (10^6-10^8 lần). Từ đó đến nay SERS đã được nghiên cứu cả về lý thuyết và thực nghiệm để trở thành một phương pháp quang phổ học mới. Hiện nay, quang phổ Raman tăng cường bề mặt SERS đang được nghiên cứu, phát triển mạnh mẽ ở các phòng thí nghiệm tiên

tiến trên thế giới. Lý do là bên cạnh việc tìm hiểu cơ chế của hiệu ứng SERS còn nhiều tranh luận cần làm sáng tỏ, SERS có khả năng ứng dụng như là một cảm biến Raman cực nhạy để phân tích định tính, định lượng các phân tử hữu cơ, vô cơ trong các lĩnh vực hóa học, địa chất, y-sinh…[52],[78], [76]. Sự khác biệt chính giữa kỹ thuật đo phổ Raman và SERS là sự bổ sung của một lớp kim loại có kích thước nano, cho phép tăng cường độ tán xạ đến 10^6, do đó cải thiện được về độ nhạy. Một phổ SERS có thể nhận được một cách nhanh chóng và vẫn giữ nguyên tất cả những ưu điểm của quang phổ Raman bình thường. Phổ đồ là duy nhất đối với hợp chất duy nhất và do đó cho phép phương pháp này được sử dụng như một kỹ thuật để nhận dạng.

SERS đã được quan sát đối với các phân tử bám trên bề mặt thô ráp của một số kim loại với các môi trường vật lý và hình thái khác nhau. Sự tăng cường mạnh nhất quan sát được trên bề mặt kim loại có độ nhám vào cỡ thang nano (10 – 100nm) và phụ thuộc vào hình dạng hạt, theo *Hình 1.3.*



Hình 1.3.Sơ đồ nguyên lý của SERS

Hai cơ chế được cho là tạo ra sự tăng cường trong tín hiệu Raman đó là cơ chế tăng cường điện từ và cơ chế hoá học [89]

- ***Cơ chế tăng cường điện từ***

SERS sử dụng một bề mặt kim loại gồ ghề thường được làm bằng Ag, Au, Cu (các phân tử Ag … như là các phân tử keo dính). Các phân tử của mẫu cần đo được hấp phụ trên bề mặt kim loại này. Dưới sự kích thích của ánh sáng tới, các điện tử tự do trên bề mặt kim loại sẽ bị kích thích và dao động tập thể với các lõi ion kim loại. Tập hợp tất cả các dao động này sẽ phát ra một trường lưỡng cực. Khi các trường lưỡng cực này cộng hưởng với tần số của ánh sáng tới sẽ gây ra sự tăng cường trường điện từ cục bộ trên bề mặt kim loại và trường này nhanh chóng thoát ra khỏi bề mặt kim loại. Do đó, tín hiệu Raman của các chất phân tích hấp phụ trên bề mặt kim loại

hoặc nằm gần các bề mặt này cũng sẽ được tăng cường. Như vậy cơ chế tăng cường điện từ liên quan đến độ nhám bề mặt kim loại và khoảng cách giữa các chất phân tích với bề mặt kim loại. Sự tăng cường điện từ ở đây có thể lên đến 10^{12} [81], [120]

- ***Cơ chế tăng cường hóa học***

Gây ra do sự tương tác giữa các phân tử chất hấp phụ và các kim loại, thường liên quan đến hiệu ứng điện tử như sự truyền điện tích. Những hiệu ứng này có thể dẫn đến tăng cường phổ Raman cộng hưởng nếu sự hấp phụ của phân tử tới bề mặt thay đổi sự hấp thu quang học tối đa gần hơn với tia laser tới. Trong khi sự tăng cường điện từ áp dụng cho tất cả các chất phân tích thì sự tăng cường hóa học lại phụ thuộc vào chất phân tích và yêu cầu một số loại liên kết với bề mặt kim loại. Các hệ số tăng cường hóa học cũng khác nhau rất nhiều nhưng thường trong vùng từ 10 đến 100 [81].

Do việc tăng cường hóa học và tăng cường điện từ trường rất nhạy với một số biến bao gồm cả chất dùng làm đế (đế SERS), kích thước, hình dạng hạt kim loại, bước sóng laser, bản chất tương tác của đế SERS và chất hấp phụ nên đế SERS cần được thiết kế và tối ưu hóa. Các đế SERS được đề xuất để phân tích hóa học đều chú ý đến việc chuẩn bị, khả năng tăng cường, khả năng tái sinh và tính ổn định. Cho đến nay, gần như tất cả các vật liệu phân tích SERS được làm từ bạc hoặc vàng, với đa số được chế tạo từ bạc [107], [120].

1.3.2.3. Dung dịch keo sử dụng cho SERS.

Các đế SERS là các bề mặt kim loại quý (Au, Ag…) có độ ráp thích hợp ở kích thước nano, ví dụ tạo bởi các hạt nano, thanh nano, dây nano Au/Ag, các cấu trúc nano dạng lá, hoa…Tín hiệu phổ Raman của các chất phân tích hấp phụ trên bề mặt các đế SERS này sẽ được tăng cường nhờ tổ hợp của các hiệu ứng điện từ và hóa học. Đến nay đã có nhiều nghiên cứu chế tạo các đế SERS bằng các phương pháp khác nhau phục vụ cho phép đo phổ Raman như: Các bề mặt kim loại gồ ghề; huyền phù hạt kim loại nanô; hệ các hạt kim loại nanô nằm cố định trên bề mặt phẳng; hệ các hạt kim loại nanô nằm cố định trên bề mặt của một hệ dây nanô trật tự; hệ các hạt kim loại có hình dạng biến đổi (dạng lá, hoa, nhím, sao, ..). Trong số các loại đế SERS, các hạt kim loại nanô trong dung dịch huyền phù là đế SERS được sử dụng nhiều nhất. Điểm thu hút chính của các hạt nanô huyền phù là chế tạo chúng dễ dàng với chi phí thấp. Các đế huyền phù được báo cáo là có khả năng cung cấp sự tăng cường SERS lớn [95], [108], [62].

Các nghiên cứu đã cho thấy sử dụng cấu trúc nano của Ag cho độ tăng cường cao nhất tới 10^{14}, sử dụng các hạt nano Au cho độ thích ứng sinh học tốt nhất. Khi sử dụng cấu trúc nhánh cây của Ag để tăng cường tán xạ Raman đã cho phép nhận biết được thuốc kháng sinh ở nồng độ rất thấp (cỡ 20ppb) [76]. Nhược điểm của việc sử dụng các hạt keo kim loại là khó bảo quản (thường phải dùng ngay sau khi chế tạo), độ lặp lại không cao và mỗi một hoạt chất được phân tích bằng SERS thì cần có một loại keo kim loại phù hợp để ghi nhận phổ SERS đặc trưng cho chất đó. Vì vậy mà hiện nay keo kim loại dùng trong SERS vẫn thường được chuẩn bị sẵn trước khi sử dụng. Keo kim loại truyền thống nhất là keo bạc được tác giả Lee P.C [95] đưa ra đầu tiên vào năm 1982 và hiện nay nhiều tác giả đã tham khảo, cải tiến để điều chế ra keo phù hợp với máy Raman của từng phòng thí nghiệm và hoạt chất nghiên cứu. Tính chất của keo thường được xác định thông qua độ hấp thụ quang UV, kích thước hạt được xác định thông qua hình ảnh đo TEM. Tác giả Lee P.C đã đưa ra 3 loại keo bạc như sau :

(a) Ag_2S0_4 (80 mg) được hòa tan trong cốc 200 ml nước nóng và sau đó trộn với 5g của PVA (Polyvinyl alcohol) hòa tan trong cốc 200 ml nước nóng. Hỗn hợp này sau đó được sục với H_2 ở nhiệt độ sôi gần 3 giờ. Thể tích cuối cùng đã được điều chỉnh đến 500 mL.

(b) 100 ml dung dịch $AgNO_3$ 5 x $l0^{-3}$ M được thêm từng phần vào 300 mL $NaBH_4$ 2 x10^{-3} M được khuấy mạnh ở nhiệt độ thấp. 50 ml dung dịch PVA 1% đã được bổ sung trong thời gian phản ứng. Hỗn hợp này sau đó đã được đun sôi trong 1 h để phân hủy lượng $NaBH_4$ dư thừa. Thể tích cuối cùng đã được điều chỉnh đến 500 ml.

(c) $AgNO_3$ (90 mg) được hòa tan trong 500 ml H_2O, sau đó dung dịch được đun sôi. 10 ml dung dịch natri citrat 1% được thêm vào. Dung dịch cuối cùng được đun sôi trong 1 giờ.

Các keo Ag chuẩn bị bởi cách (a) và (b) là màu nâu và có cực đại hấp thụ ở 400 nm trong khi đó chuẩn bị bằng cách (c) là vàng lục và có cực đại hấp thụ ở 420 nm.

1.3.2.4. Phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp quang phổ Raman tăng cường bề mặt

Theo khuyến cáo của SWGDRUG khi nhận dạng một loại thuốc cần sử dụng một kỹ thuật từ loại A ghép nối với một kỹ thuật từ một trong hai loại B hoặc C. Khi

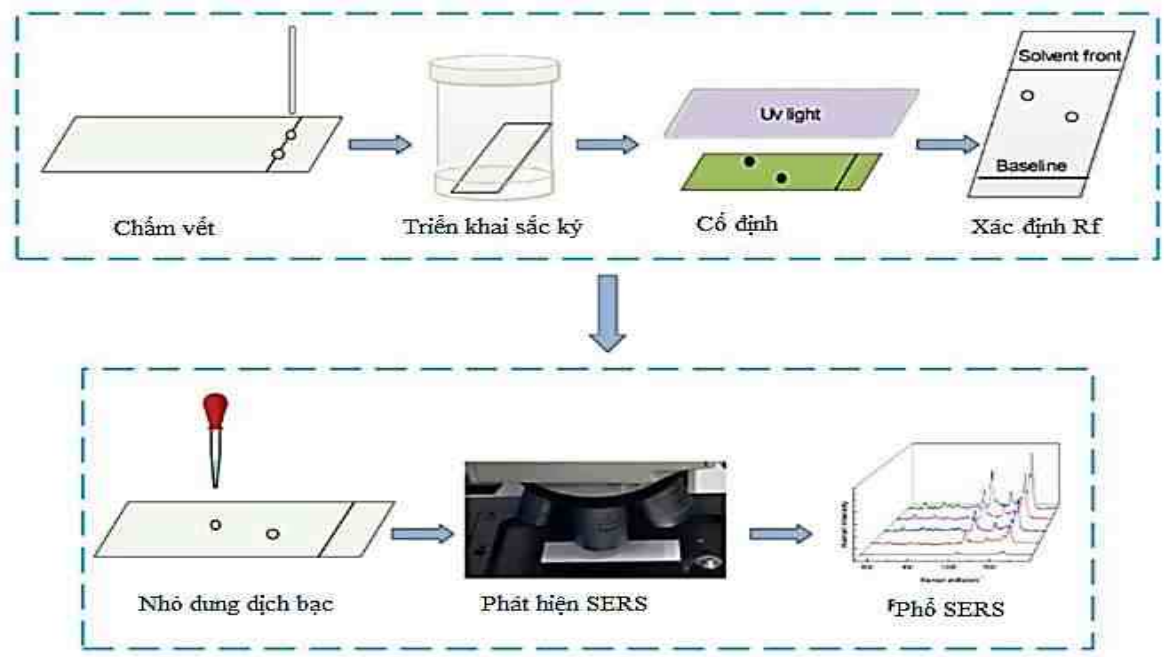
một kỹ thuật loại A không được sử dụng, ít nhất là ba phương pháp xác nhận khác nhau từ loại B hoặc C nên được thực hiện [135], theo Bảng 1.7.

Bảng 1.7.Phân loại kỹ thuật phân tích của SWGDRUG [135]

Loại A	**Loại B**	**Loại C**
Phổ hồng ngoại (IR)	Điện di mao quản (CE)	Phép nhuộm màu
Phổ khối (MS)	Sắc ký khí (GC)	Phổ huỳnh quang
Phổ cận hồng ngoại (NIR)	Phổ trao đổi ion (IM)	Miễn dịch
Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)	Sắc ký lỏng	Đo điểm nóng chảy
Phổ Raman	Kiểm tra vi tinh thể	Phổ UV
	Định danh thuốc	
	Sắc ký lớp mỏng (TLC)	
	Riêng cần sa : - Kiểm tra vĩ mô - Kiểm tra vi mô	

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được SWGDRUG phân loại là một kỹ thuật loại B và thường được sử dụng trong các phòng thí nghiệm pháp y như một công cụ sàng lọc trong việc kiểm tra các chất được kiểm soát với ưu điểm nhanh chóng, không tốn kém và hiệu quả khi tách và phân tích các thành phần của hỗn hợp. Đại lượng đặc trưng của TLC là R_f tuy nhiên giá trị R_f xác đinh sơ bộ một chất, nhưng không đặc trưng cho một hợp chất. Vì vậy không thể xác định được TLC một mình, đó là lý do tại sao nó phải được kết hợp với 1 phương pháp xác nhận loại A.

Quang phổ Raman tăng cường bề mặt (SERS), về cơ bản phản ánh quang phổ Raman (nhóm A). Một phổ SERS có thể thu được một cách nhanh chóng và đặc trưng cho từng chất nên được xem là phương pháp định danh các hợp chất. Do đó, sự kết hợp giữa sự kết hợp giữa TLC và SERS tuân thủ đúng theo khuyến cáo của SWGDRUG. Trong TLC-SERS, các chất phân tích được tách bằng TLC, các điểm phân tách được quan sát và đánh dấu trên một máy quét TLC ở bước sóng 254 nm. Hỗn dịch keo kim loại được nhỏ trực tiếp tới mỗi điểm được đánh dấu trên tấm TLC. Phổ SERS cho mỗi điểm phân tách được ghi lại bằng máy quang phổ Raman ngay sau khi nhỏ keo bạc *Hình 1.4.*

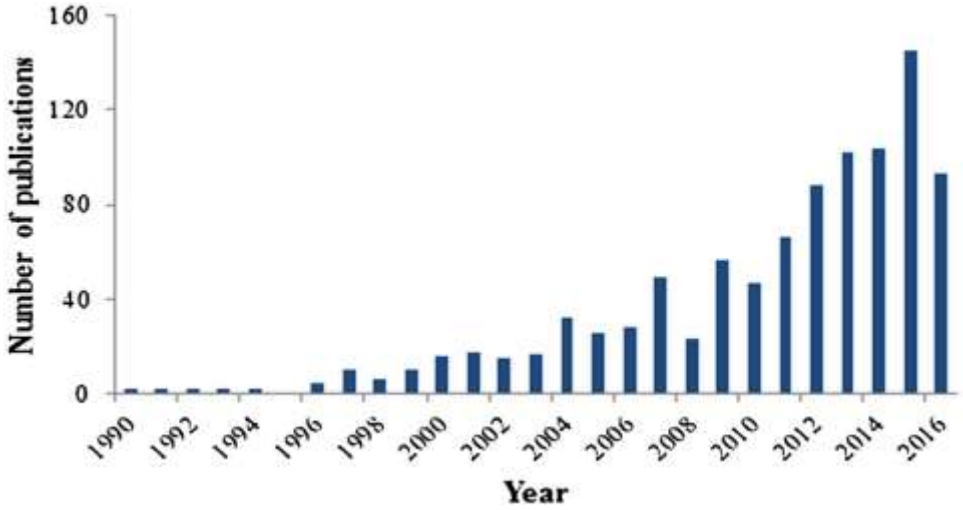


Hình 1.4.Quy trình phân tích mẫu theo phương pháp TLC-SERS

Yan Zhang và cộng sự đã phát triển một cơ sở dữ liệu dấu vân tay SERS cho các thuốc cổ truyền Trung Quốc được hấp phụ trên các hạt nano Ag. Phương pháp này có thể giúp người dùng tránh mua phải các sản phẩm có chứa các chất thêm vào không rõ ràng [147]. Bên cạnh đó, Zheng Lei và cộng sự đã sử dụng các hạt nano Au hoặc Ag để thiết lập một tương quan tuyến tính giữa phát hiện SERS và nồng độ aminopyrin. Giới hạn phát hiện (LOD) là 2.50×10^{-7} M trong dung dịch nước [150]. Những phương pháp này có thể giúp người dùng xác định sự hiện diện của các thành phần bất hợp pháp trong các chế phẩm thuốc cổ truyền.

1.3.2.5. Ứng dụng của TLC-SERS để phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược

SERS là kỹ thuật tương đối mới, đang được chú trọng phát triển vì có độ đặc hiệu và độ nhạy cao cần được phát triển để sàng lọc và phân tích nhanh các chất hóa dược [104], [105], [106], [130], [131], [138]. Nghiên cứu gần đây tổng kết số lượng tăng cao các nghiên cứu về SERS cho hóa dược trên thế giới. [50] theo Hình 1.5.



Hình 1.5. Số lượng phát minh kỹ thuật SERS cho lĩnh vực dược phẩm

Bên phát hiện thuốc tân dược trộn lẫn trái phép trong chế phẩm đông dược, phương pháp TLC-SERS còn phát huy trong phát hiện thuốc [100]; chất chỉ điểm ở dịch sinh học người [82], [124]; chất chỉ điểm trong thực phẩm [143]; hoạt chất chính trong dược liệu [64], [66], [80], [118]. Sử dụng SERS để phát hiện các chất ma túy đã được ứng dụng khá rộng rãi như phát hiện cocain trong nước bọt [57], tramadol trong nước tiểu [41], amphetamin and methamphetamine bằng cách tạo dẫn chất với acid 2-mercaptonicotinic [128], phát hiện hỗn hợp dihydrocodein, doxepin, citalopram, trimipramin, carbamazepin, methadone trong máu và nước tiểu bằng cách kết hợp sắc ký lỏng điều chế với SERS [134], silbutramin trong thực phẩm chức năng [103] … Tiếp nối những kết quả của SERS, một số nghiên cứu bằng TLC-SERS cũng đang khẳng định tính mới và ưu thế của phương pháp.

Bảng 1.8 đều có qui trình giống Hình 1.6 như sử dụng bản mỏng silicagel 60-F254 hoặc HP silicagel 60-F254, để phát hiện và đánh dấu vết phân tách trước khi chiếu Raman dưới đèn UV ở bước sóng 54 nm. Sự khác biệt chủ yếu là hệ dung môi khác nhau tùy thuộc vào dược chất nghiên cứu và hệ thống Raman tùy thuộc vào điều kiện phòng thí nghiệm.

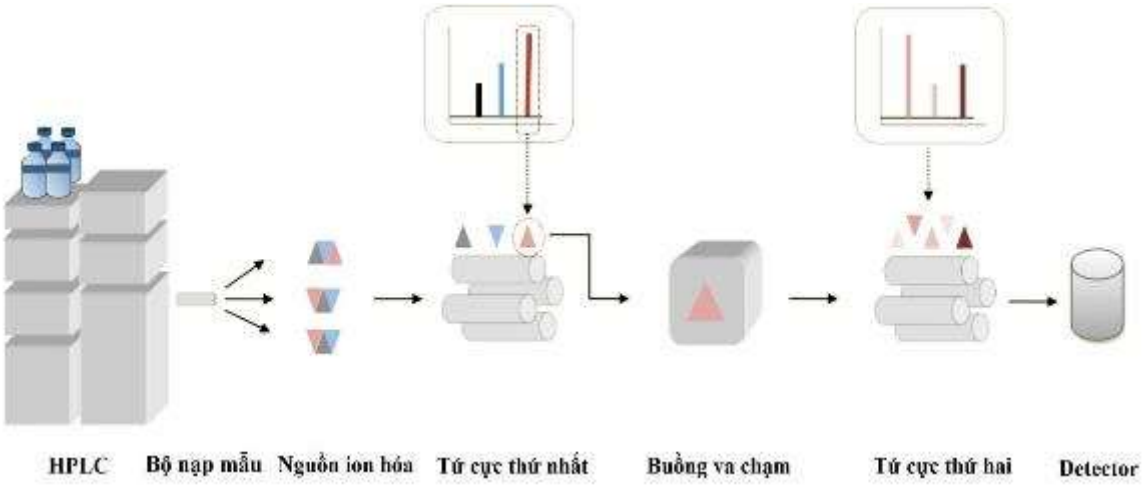
Như vậy, các nhóm thuốc trên là các nhóm thuốc thông dụng và hay được trộn lẫn trong các chế phẩm đông dược, thực phẩm chức năng nên cần phải phát hiện kịp thời và kiểm soát chặt chẽ bằng nhiều phương pháp như HPTLC, Raman, NMR, HPLC, LC-MS/MS, ... giúp cho người sử dụng tránh được các tác dụng phụ nghiêm trọng của thuốc.

Bảng 1.8 Các nghiên cứu phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp TLC-SERS

Nền mẫu	***Hoạt chất***	***Phương pháp, điều kiện phân tích và một số kết quả***	***Tài liệu***
Bột TPCN thêm 1% (kl/kl): Meformin Phenformin Rosiglitazon Pioglitazon	Phenformin Metformin Rosiglitazon Pioglitazon	**TLC-SERS** ***Điều kiện TLC*** - Hệ dung môi khai triển Dicloromethan-MeOH- nước (8: 2: 0,2), sau đó tiếp tục với hệ Dicloromethan- Cyclohexan: MeOH : Acid acetic (8: 8: 0,5: 1,5). ***Điều kiện SERS*** - Nhỏ trực tiếp 6 µl hỗn dịch keo bạc vào mỗi điểm được đánh dấu trên tấm TLC. - Phổ SERS cho mỗi điểm phân tách được phát hiện với điều kiện : bước sóng kích thích 785±1nm, độ phân giải 5 cm^{-1}, ghi phổ từ 175-3100 cm^{-1}	[151]
viên nén, bột thuốc, viên nang	Sildenafil, hydroxyhomo sildenafil, thioaildenafil, acetildenafil, vardenafil dihydrochlorid và pseudo vardenafil	**TLC-SERS** ***Điều kiện TLC*** -Hệ dung môi khai triển methanol-nước-ammonium hydroxid (75:25:1) ***Điều kiện SERS*** - Nhỏ trực tiếp 3 µl hỗn dịch keo bạc vào mỗi điểm được đánh dấu trên tấm TLC. - Phổ SERS cho mỗi điểm phân tách được phát hiện bằng máy Raman (Renishaw), tia laser 785 nm, CCD camera, vật kính 50.	[79]
Viên nang	Rosiglitazon Phenformin Metformin Pioglitazon Sibutramin	**SERS** - Sử dụng máy quang phổ Raman cầm tay (i-Raman, BWTEK, USA) với điều kiện đo: - Bước sóng kích thích : 785 ± 1mm - Ghi phổ từ 175- 3100 cm - Độ phân giải phổ là 5 cm, thời gian thu phổ 20 giây. - Sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM)(JEM-2010, JEOL Ltd, Nhật Bản) để thu được hình ảnh TEM.	[147]
Thực phẩm chức năng	Diphenhydramin hydrochlorid, benproperin phosphat, chlorphenamin maleat	***Điều kiện TLC*** -Hệ dung môi khai triển dichloromethane: methanol: water = 9:1:0.1 **SERS** - Sử dụng máy quang phổ Raman cầm tay (i-Raman, BWTEK, USA) với điều kiện đo: - Bước sóng kích thích : 785 ± 1mm - Ghi phổ từ 175- 3100 cm - Độ phân giải phổ là 5 cm, thời gian thu phổ 20 giây.	[63]

1.3.3. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)

Sắc ký lỏng khối phổ là kỹ thuật phân tích có sự kết hợp khả năng phân tách các chất trong hỗn hợp của bộ phận sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và khả năng phân tích số khối (m/z) của bộ phận khối phổ (MS), theo Hình 1.6. Sơ đồ hệ thống LC-MS/MS [133]



Hình 1.6. Sơ đồ hệ thống LC-MS/MS [133]

Phân tích khối phổ có tính chọn lọc, độ nhạy, độ đặc hiệu cao. Giới hạn phát hiện (LOD) có thể đến 10^{-14} g/kg. Do vậy, phân tích khối phổ càng được áp dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khoa học công nghệ như xác định các đồng vị, xác định công thức cấu tạo, định tính, định lượng các chất có trong dịch sinh học và trong các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên. Đặc biệt dùng để phân tích hàm lượng vết trong mẫu có thành phần phức tạp [1], [27].

1.3.3.1. Khối phổ

a. Khái niệm

Phương pháp khối phổ là phương pháp phân tích dựa trên cơ sở xác định khối lượng phân tử của các hợp chất bằng việc phân tách các ion phân tử theo tỷ số giữa khối lượng và điện tích (m/z) của chúng. Các ion có thể tạo ra bằng cách thêm hay bớt điện tích của chúng như loại bỏ electron, proton hóa… Các ion tạo thành này được tách theo tỷ số m/z và được phát hiện, từ đó có thể cho thông tin về khối lượng hoặc cấu trúc phân tử của hợp chất.

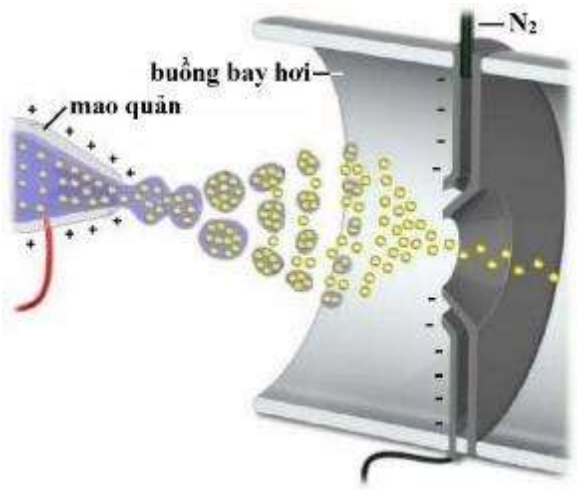
b. Thiết bị khối phổ

Một thiết bị khối phổ gồm các bộ phận sau:

- *Bộ nạp mẫu:* Chuyển mẫu cần phân tích vào nguồn ion hóa của thiết bị khối phổ. Trong sắc ký lỏng khối phổ, bộ phận nạp mẫu chính là đầu ra của cột sắc ký.

- *Bộ nguồn ion hóa:* Có nhiệm vụ ion hóa phân tử trung hòa thành các ion phân tử mang điện tích hoặc bắn phá, phân mảnh phân tử trung hòa thành các mảnh ion, các gốc mang điện tích bằng các phân tử mang năng lượng cao.

Có ba kiểu hình thành ion: Ion hóa phun điện tử (Electrospray Ionizaton – ESI), ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI), ion hóa bằng photon tại áp suất khí quyển (Atmospheric Pressure Photonization – APPI). Trong đó, kiểu ion hóa ESI được sử dụng phổ biến nhất, thực hiện ở áp suất khí quyển, theo Hình 1.1. Kỹ thuật này phù hợp cho các chất phân cực, không bền với nhiệt và nghiên cứu các phân tử sinh học có khối lượng tới 100000 Da [61].



Hình 1.7. Sơ đồ tạo ion bằng nguồn ESI [154]

- *Bộ phận phân tích khối:* Sau khi được tạo thành thì các ion sẽ được gia tốc và tách riêng theo tỷ số m/z nhờ tác dụng của điện trường và từ trường để đi đến bộ phận phát hiện.

Một số bộ phân tích khối thường dùng: Tứ cực (quadrupole), bẫy ion (ion trap), ống đo thời gian bay (time-of-flight tube) [27], [28]. Trong đó, bộ phân tích khối tứ cực có 4 thanh tích điện đặt song song, 2 thanh đối nhau có điện tích bằng nhau. Các ion phù hợp với tần số quét sẽ đi thẳng tới detector, những ion khác bị phá hủy do bị va đập vào tứ cực.



Hình 1.8. Tứ cực chập ba gập cong trong hệ máy LC-MS/MS Bruker [48]

Hiện nay, có loại thiết bị dùng bộ phân tích khối gồm ba tứ cực xếp nối tiếp nhau Q1, Q2, Q3 (gọi là bộ tứ cực chập ba) để ghi phổ, theo Hình 1.8. Tứ cực Q1, Q3 làm nhiệm vụ phân tích khối, tứ cực Q2 là ngăn để cho các ion va chạm, tạo ra các ion mảnh nhỏ hơn, khí dùng cho va chạm thường là khí argon. Kỹ thuật phân tích khối phổ kiểu này được gọi là khối phổ hai lần MS/MS và thường được dùng để khẳng định cấu trúc các chất hữu cơ và phân tích hỗn hợp nhiều thành phần.

- *Bộ phận phát hiện ion:* Có nhiệm vụ chuyển các ion đến thành tín hiệu điện đo bằng hệ điện tử của máy khối phổ.

- *Bộ phận ghi và xử lý số liệu:*

Là một hệ thống bao gồm hệ thống kết nối và thu nhận dữ liệu thô và phần mềm kiểm soát, điều khiển thiết bị, phân tích tính toán, xử lý, báo cáo, kết xuất dữ liệu thô vừa thu được. Một số kỹ thuật ghi phổ trong detector khối phổ bao gồm:

+ Chế độ quét toàn phổ (SCAN)

+ Chế độ khảo sát ion được lựa chọn (SIM)

+ Chế độ khảo sát phản ứng được lựa chọn (SRM) và Chế độ khảo sát đa phản ứng (MRM)

Đối với khối phổ ba tứ cực, là máy đo khối phổ hai lần liên tiếp MS/MS, 2 kỹ thuật ghi phổ có độ nhạy cao thường được sử dụng là SRM và MRM. Trong đó, SRM là Cô lập ion cần chọn, sau đó phân mảnh ion cô lập đó, trong các mảnh ion sinh ra, cô lập 1 mảnh ion con cần quan tâm và đưa vào đầu dò để phát hiện. Kỹ thuật ghi phổ MRM thông dụng hơn SRM; đầu tiên, cô lập ion cần chọn (ion mẹ) ở tứ cực thứ nhất, phân mảnh ion cô lập đó tại tứ cực thứ 2 (thực chất là buồng va

chạm) thu được các ion con, cô lập 2 (hoặc nhiều) ion con cần quan tâm ở tứ cực thứ 3 và đưa vào đầu dò để phát hiện [48].

1.3.3.2. . Ứng dụng của LC-MS/MS để phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược

Các thuốc tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược đã được phát hiện ở nhiều nước trên thế giới với nhiều phương pháp phân tích khác nhau, trong đó LC-MS/MS được xem là phương pháp đặc hiệu, có thể sử dụng để khảo sát trên một cỡ mẫu lớn với kết quả đáng tin [137], theo Bảng 1.9.

Bảng 1.9 Các nghiên cứu phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp LC-MS

Nền mẫu	Hoạt chất	Phương pháp phân tích	Tài liệu
Dược liệu	Prednison, Prednison acetat	**HPLC-MS** ***Điều kiện sắc ký*** chủ yếu dùng cột C18, với pha động ammonium format-methanol, tốc độ dòng 0,4 ml/phút. ***Kết quả nghiên cứu*** LOD từ 0,2-0,3 ng/ml	[116]
Thực phẩm chức năng	Indomethacin, Acetaminophen, Piroxicam, Ketoprofen	**LC-MS** Cột: HSS T3 (2,1mm × 100 mm; 1,8 µm). Pha động: 10 mM ammonium acetat trong nước cất (A) và ACN (B) (gradient). Detector: ESI- MS. ***Kết quả nghiên cứu*** LOD từ 0,25-100 ng/g	[88]
Thuốc đông dược	Paracetamol, Indomethacin	**LC-ESI-MS** ***Điều kiện sắc ký*** Cột Nucleodur Sphinx RP (150 mm × 4,6 mm; 5µm). Pha động: Nước (A) và acetonitril (B) đều có acid acetic 0,1% (gradient). Detector: ESI-MS. ***Kết quả nghiên cứu*** Khoảng nồng độ từ 15 – 120 ng/ml	[126]

Nền mẫu	Hoạt chất	Phương pháp phân tích	Tài liệu
Bột dược liệu	Paracetamol, Indomethacin, Ketoprofen, Phenylbutazon, Dipyrone, Dexamethason, Prednison, Prednisolon	**LC-ESI-MS-MS** ***Điều kiện sắc ký*** Cột: Superspher 100 RP-18 (125 mm × 3 mm, 4µm). Pha động: Đệm 10 mM ammonium format pH 3,0 (A): acetonitrile (B) (gradient). Thể tích tiêm : 25 µl. Detector: ESI-MS. ***Kết quả nghiên cứu:*** LOD từ 0,002-1 ng	[46]
Viên nang, viên nén	Indomethacin, Paracetamol, Piroxicam, Ketoprofen, Diclofenac, Dexamthason, Prednison, Betamethason, prednisolon, Hydrocortison	**LC-MS/TOF** ***Điều kiện sắc ký*** Cột C18 (250 mm × 4,6 mm; 5 µm). Pha động: Methanol (A) : 0,01 M Ammonium acetat (B) (gradient). Detector: APCI và ESI- MS ở bước sóng UV 230 nm và 330 nm cho NSAIDs. ***Kết quả nghiên cứu*** LOD từ 35-250 ng/ml	[122]
Thực phẩm chức năng	Ibuprofen	**LC-MS-MS** ***Điều kiện sắc ký*** Cột C18. Pha động : Methanol : Nước : Trifluoacetic. Thể tích tiêm : 20 µl. ***Kết quả nghiên cứu*** LOD từ 0,05 – 1,5 ng/ml	[98]
Bột dược liệu	Phenylbutazon Oxyphenbutazon	**LC-MS-MS** ***Điều kiện sắc ký*** Cột: Phenomenex Luna C18 (50 mm x 2 mm, 5 µm) Pha động : Kênh A (nước chứa amoni format 2mM và acid formic 50 mM) : Kênh B (dung dịch có 95% acetonitril, 5% nước, amoni format 2mM, acid formic 50 mM) (gradient). ***Điều kiện sắc ký*** LOD từ 0,84-3,69 ng/ml.	[92]

Nền mẫu	Hoạt chất	Phương pháp phân tích	Tài liệu
Viên nén Viên nang Thuốc viên Thuốc hạt	Glibenclamid Metformin Rosiglitazon Glimepirid Phenformin, Gliclazid Chlorpropamid Nateglinid Mitiglinid	**UPLC-MS/MS** ***Điều kiện sắc ký*** - Cột C18. Pha động: Acetonitril chứa 0,1% acid formic và nước chứa 0,1% acid formic (gradient nồng độ). Tốc độ dòng: 0,20 ml/phút. Thể tích tiêm 10 µl ***Điều kiện MS*** - Chế độ phát hiện MRM ***Kết quả nghiên cứu*** - LOD dao động 0,03-5,45 ng/ml	[97]
Viên nén Viên nang	Glibenclamid Gliclazid Phenformin Glimepiride Metformin	**LC-MS-MS** ***Điều kiện sắc ký*** - Cột Xterra MS C18, tiền cột C18 - Tỷ lệ pha động acetonitril : nước (60:40). Tốc độ dòng 0,2 ml/phút . Thể tích tiêm 10 µl ***Điều kiện MS*** -Nguồn ion hóa ESI(+), APCI -Chế độ phát hiện MRM ***Kết quả nghiên cứu*** -LOQ: GLB (2ng/ml), GLIC (1,2ng/ml), GLIM (3ng/ml), MET (5ng/ml), Phenformin (2ng/ml).	[113]
Thực phẩm chức năng	Atenolol, metoprolol tartrat, nadolol, captopril, enalapril maleate, losartan and valsartan, furosemide, hydrochlorothiazide, chlorthalidone, amiloride, spironolactone	**UPLC-MS-MS** ***Điều kiện sắc ký:*** Cột Zorbax SB-C18 Pha động methanol và acetic acid 0.1%. ***Điều kiện MS*** -Nguồn ion hóa ESI(+) -Chế độ phát hiện MRM ***Kết quả nghiên cứu*** -LOD từ 0,02 - 2.51 µg/L -Phát hiện 5 mẫu dương tính với hydrochlorothiazid và furosemid	[111]
Nền mẫu	**Hoạt chất**	**Phương pháp phân tích**	**Tài liệu**

Nền mẫu	Hoạt chất	Phương pháp phân tích	Tài liệu
Thuốc bột, viên nang, trà	Sibutramin N-Di-desmethylsibutramin	**HPLC-UV-ESI-MS** ***Điều kiện sắc ký:*** Cột Spherisorb-C8. Pha động acetonitril và acid formic 0,2%. **Điều kiện UV**: bước sóng 223 nm ***Điều kiện MS*** -Nguồn ion hóa ESI(+) -Chế độ phát hiện SIM ***Kết quả nghiên cứu*** -Khoảng nồng độ 0,025 – 1,0 mg/ml	[83]

Như vậy, tình trạng trộn trái phép các thuốc hóa dược nhóm ức chế PDE – 5 trong chế phẩm thảo dược vẫn đang diễn ra ở nhiều nơi, điều này ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của người sử dụng. Nhiều phương pháp phát hiện các tân dược trong chế phẩm đông dược được phát triển như HPTLC, TLC-SERS, LC-MS/MS.. Trong đó, HPTLC với ưu thế là sàng lọc nhanh các hoạt chất hóa dược trong số lượng chế phẩm đông dược lớn. Phương pháp LC-MS/MS được xem là phương pháp đặc hiệu, vừa định tính và định lượng với kết quả đáng tin cậy. Hiện nay, Phương pháp TLC – SERS là một phương pháp kết hợp một kỹ thuật phân tích loại A và một kỹ thuật loại B sẽ giúp cho việc phát hiện nhanh và đặc hiệu các chất phân tích với độ nhạy cao là để phát triển và triển khai ứng dụng phân tích thuốc hóa dược trộn trái phép trong chế phẩm thảo dược bảo vệ sức khỏe cho người dùng.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, trang thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu

Các chất chuẩn dùng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các chất chuẩn dùng trong nghiên cứu

STT	Chất chuẩn	Tiêu chuẩn	Nguồn gốc
1	Betamethason	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0214124.01 HL: 100,42% Độ ẩm: 0,52%
2	Dexamethason acetat	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0200014 HL: 99,6%
3	Hydrocortison acetat	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0198038 HL: 99,5%. Độ ẩm: 0,1%
4	Indomethacin	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0203094 HL: 99,7%. Độ ẩm: 0,06%
5	Ketoprofen	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: QT048 040813 HL: 99,54%
6	Paracetamol	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0415019.04 HL: 100,04%
7	Piroxicam	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0102132 HL: 99,49%. Độ ẩm : 0,07%
8	Prednisolon	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: 0296024 HL: 99,94%. Độ ẩm: 0,2%
9	Prednison	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW SKS: WS.0217235.02 HL: 99,19%
10	Glibenclamid	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW. SKS: 0103129, HL: 100,10% (HPLC), 99,70% (UV- VIS). Độ ẩm: 0,09%
11	Gliclazid	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW. SKS: WS.0215187.01, HL: 99,53%
12	Glimepirid	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW. SKS: 0115320.01, HL: 99,49%
13	Glipizid	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW. SKS: 0107207, HL: 99,17%, Độ ẩm: 0,10%
14	Sildenafil citrat	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW. SKS: WS.0316265.03. HL: 98,28%
15	Tadalafil hydroclorid	Chuẩn DĐVN	Chuẩn VKNTTW. SKS: WS. 0215264.02, HL: 97,65%
16	Vardenafil hydroclorid	Chuẩn E.P	Hội đồng Dược Điển Châu Âu CAS Number: 330808-88-3. HL:100,0%

-Các dược liệu bào chế nền mẫu gồm: Bạch chỉ, bạch linh, bạch thược, bạch truật, cam thảo, độc hoạt, đương quy, hoàng cầm, khương hoạt, phòng phong, sinh

địa, tần giao, tế tân, thạch cao, thục địa, xuyên khung, Độc hoạt, tang ký sinh, đẳng sâm, phục linh, ngưu tất, đỗ trọng, quế chi, sinh địa, cam thảo, phụ tử, hoàng kỳ, nhân sâm, sinh địa, tục đoạn, Diệp hạ châu, cây chè vằng, quả nhàu, lá hoàn ngọc, mướp đắng, dây thìa canh, cao giảo cổ lam, bằng lăng nước, chi mẫu, đảng sâm, khổ qua, nấm linh chi, kê cốt thảo, mạch môn, đinh lăng, hải mã, ba kích, hà thủ ô chế, bách hợp, nhục thung dung, nhung hươu, hạt sen, cao ban long, thỏ ty tử, câu kỷ tử, cẩu tích, trạch tả, củ mài, tục đoạn, viễn chí, cúc hoa, đại táo, dâm dương hoắc, xa tiền tử, táo nhân, hoài sơn, nhục thung dung, xà sàng tử, viễn chí, ngũ vị tử, phá cố chỉ, thỏ ty tử, phá cố có nguồn gốc Việt Nam.

-Tá dược độn (tinh bột), tá dược dính (hồ tinh bột), tá dược trơn (talc, magnesi stearat) và than hoạt có nguồn gốc Việt Nam hoặc Trung Quốc.

-Dung môi, hóa chất: methanol, acetonitrl, acid formic (Merck, Đức) đạt tiêu chuẩn LC-MS. Dung môi hữu cơ khác như n-hexan, ethyl acetat, acid acetic, cloroform, n-butyl acetat, ammoniac (Trung Quốc)… đạt tiêu chuẩn tinh khiết để phân tích. Hóa chất vô cơ như bạc nitrat, natri citrat (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn tinh khiết để phân tích.

2.1.2. Trang thiết bị

- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS BRUKER EVOQ Qube – Mỹ; cột sắc kí Ultra C18 (100 x 2,1 mm; 1,9µm), cột bảo vệ (10 x 4mm, 3 µm).

- Hệ thống quang phổ Raman, LabRam, Horiba Jobin Yvon, camera CCD, tia laser 632,8 nm (Pháp).

- Hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao HPTLC CAMAG, CAT No 027.6200 (Thuỵ Sỹ): bộ phận chấm bán tự động, bộ phận khai triển tự động, máy chụp ảnh. Phần mềm điều khiển winCAT và phần mềm video Scan của Camag: quét bản mỏng, thu nhận hình ảnh vết sắc ký, xử lý dữ liệu hình ảnh trên máy tính.
- Bản mỏng HPTLC Silica gel 60 F254 của Merck (Đức).
- Cân phân tích Sartorius TE 214S (d=0,1 mg) (Đức).
- Máy lắc xoáy Labinco BV L46 (Hà Lan).
- Máy siêu âm D-78224 Singen/Htw (Đức).
- Máy ly tâm Kubota 6500 (Nhật Bản).
- Tủ sấy WiseVen WOF-105 (Hàn Quốc).
- Máy đo quang phổ tử ngoại khả kiến Shimadzu UV-1800 (Nhật Bản).

- Các dụng cụ thủy tinh: bình định mức, pipet, phễu thủy tinh ...

Các trang thiết bị, dụng cụ của phòng thí nghiệm tại trường Đại học Dược Hà Nội; Trung tâm giám định ma túy, Viện khoa học hình sự, Bộ Công an và Trung tâm Khoa học Vật liệu, Khoa Vật Lý, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Mẫu thử

Số lượng mẫu thử là 184 chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe gồm: 119 chế phẩm được sử dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp; 41 chế phẩm được sử dụng hỗ trợ điều trị các bệnh tiểu đường, giúp ổn định đường huyết; 24 chế phẩm được sử dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lý đang lưu hành tại Việt Nam; các chế phẩm này được mua tại các nhà thuốc, qua internet, của lương y và người dùng nghi ngờ gửi đến.

2.2.2. Mẫu placebo

Xây dựng 9 nền mẫu có thành phần dựa trên các bài thuốc cổ truyền. Nền mẫu được bổ sung thêm tá dược và bào chế tại phòng nghiên cứu phát triển sản phẩm công ty cổ phần Traphaco. Công thức các bài thuốc làm nền mẫu và hình ảnh các nền mẫu được trình bày ở Phụ lục 1.

Nền mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp: Dựa trên các bài thuốc cổ truyền: Độc hoạt ký sinh thang, Đại tần giao thang và Tam tý thang với các dược liệu đa dạng, có tác dụng trừ phong thấp, giảm đau, dưỡng can thận, bổ khí huyết; dùng điều trị, hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp, giảm đau, chống viêm [9]. Nền mẫu được bào chế tại phòng nghiên cứu và phát triển, công ty cổ phần Traphaco, trình bày ở Phụ lục 1.1.

+Nền viên nang (NX1): Dựa vào bài thuốc cổ truyền Độc hoạt tang ký sinh thang trong Dược điển Việt Nam IV, gồm 15 loại dược liệu: Độc hoạt, phòng phong, tang ký sinh, tế tân, tần giao, đương quy, đẳng sâm, phục linh, ngưu tất, đỗ trọng, quế chi, sinh địa, bạch thược, cam thảo, phụ tử [9]. Bổ sung thêm tá dược trơn (aerosil) tỷ lệ 1% và bào chế dưới dạng viên nang.

***+Nền bột (NX2)*:** Dựa vào bài thuốc cổ truyền Tam tý thang trong sách Phụ nhân lương phương, gồm 16 loại dược liệu: Bạch linh, bạch thược, cam thảo, đỗ

trọng, độc hoạt, đương quy, hoàng kỳ, ngưu tất, nhân sâm, phòng phong, quế tâm, sinh địa, tần giao, tế tân, tục đoạn, xuyên khung [9]. Nền mẫu được bào chế ở dạng thuốc bột.

+Nền viên nén (NX3): Dựa vào bài thuốc cổ truyền Đại tần giao thang trong sách Tố Vấn bệnh cơ khí nghi Bảo mệnh tập, gồm 16 loại dược liệu: Bạch chỉ, bạch linh, bạch thược, bạch truật, cam thảo, độc hoạt, đương quy, hoàng cầm, khương hoạt, phòng phong, sinh địa, tần giao, tế tân, thạch cao, thục địa, xuyên khung. Bổ sung thêm tá dược độn (tinh bột), tá dược dính (hồ tinh bột), tá dược trơn (talc, magnesi stearat) với tỷ lệ 1% và bào chế dưới dạng viên nén.

Nền mẫu hỗ trợ điều trị các bệnh tiểu đường, giúp ổn định đường huyết*:* 3 nền mẫu tự tạo chứa các thành phần dược liệu có tác dụng giảm đường huyết, ổn định lượng đường trong máu gồm 3 dạng bào chế là viên nén, viên nang và viên hoàn, trình bày ở Phụ lục 1.2.

+***Nền Viên nén (ND1)*** gồm Diệp hạ châu, cây chè vằng, quả nhàu, lá hoàn ngọc, mướp đắng, dây thìa canh nấu thành cao và bổ sung thêm tá dược độn (tinh bột), tá dược dính (hồ tinh bột), tá dược trơn (talc, magnesi stearat) với tỷ lệ 1% và bào chế dưới dạng viên nén [11], [12], [16], [18], [37], [114], .

+***Nền viên nang (ND2)*** gồm cao giảo cổ lam, bằng lăng nước, chi mẫu và bổ sung thêm tá dược trơn (aerosil) tỷ lệ 1% và bào chế dưới dạng viên nang [17], [11], [12], [91].

+***Nền viên hoàn (ND3)*** gồm đảng sâm, dây thìa canh, khổ qua, quế nhục, nấm linh chi, kê cốt thảo, mạch môn, đinh lăng nấu thành cao, bột hải mã và tá dược, bao than hoạt bào chế dưới dạng viên hoàn [11], [12], [19] .

Nền mẫu hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lý: Dựa trên các bài thuốc cổ truyền: Minh mạng thang, Hoàn sâm nhung bổ thận và Điều nguyên cứu bản thang với các dược liệu đa dạng, có tác dụng bổ thận, cố tinh, bổ tỳ thận dương; chỉ định thận hư, phòng sự yếu, di mộng tinh, tỳ thận dương hư, đau đỉnh đầu, trình bày ở Phụ lục 1.3.

+Nền Viên nang (NP1)*:* dựa trên bài thuốc *Hoàn sâm nhung bổ thận* trong Dược điển Việt Nam V [9] gồm 23 vị dược liệu: ba kích, hà thủ ô chế, bách hợp, nhân sâm, bạch linh, nhục thung dung, bạch truật, nhung hươu, cam thảo, hạt sen, cao ban long, đương quy, thỏ ty tử, câu kỷ tử, thục địa, cẩu tích, trạch tả, củ mài, tục đoạn,

đảng sâm, xuyên khung, đỗ trọng, viễn chí. Bổ sung thêm tá dược trơn (aerosil) tỷ lệ 1% và bào chế dưới dạng viên nang.

+Nền viên hoàn (NP2): dựa trên bài thuốc *Minh mạng thang* [15] gồm 20 vị dược liệu : thục địa, nhân sâm, ba kích, đương quy, đỗ trọng, kỷ tử, hoàng kỳ, cúc hoa, đại táo, dâm dương hoắc, cam thảo, xa tiền tử, táo nhân, hoài sơn, nhục thung dung, xà sàng tử, viễn chí, ngũ vị tử, phá cố chỉ, liên nhục. Bổ sung thêm tá dược, bao than hoạt và bào chế dưới dạng viên hoàn.

+Nền cao thuốc (NP3): dựa trên bài thuốc *Điều nguyên cứu bản thang* trong Hải Thượng Y tông tâm lĩnh [30] gồm 6 vị dược liệu: bạch truật, hoài sơn, thục địa, thỏ ty tử, phá cố chỉ, nhục quế. Chiết xuất và cô đặc thành cao thuốc.

2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS

2.3.1.1. Xây dựng quy trình chiết xuất một số thuốc tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược

Trong giai đoạn chiết chất phân tích, tiến hành khảo sát lựa chọn dung môi chiết cho hiệu suất cao nhất như sau:

-Nhóm giảm đau, chống viêm: dựa vào khả năng hòa tan của các chất nghiên cứu trong dung môi và các kết quả của các nghiên cứu đã công bố [46], [88], [141], [51], [92], tiến hành khảo sát chiết với các dung môi ethanol 96% (QT1.1), hỗn hợp methanol : nước (30:70) (QT1.2), hỗn hợp methanol : nước (50:50) (QT1.3), hỗn hợp methanol : nước (70:30) (QT1.4) và methanol (QT1.5).

Dựa theo các tài liệu [46], [98], [55], quy trình xử lý mẫu cho đối tượng phân tích là 3 mẫu nền chế phẩm đông dược, TPBVSK viên nang, viên nén, bột thuốc có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp dự kiến là: Xác định khối lượng trung bình đơn vị mẫu, làm đồng nhất mẫu. Cân chính xác một lượng tương ứng ½ liều vào ống falcon, thêm dung môi chiết, lắc xoáy. Siêu âm 15-30 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Pha loãng chính xác dịch trong phía trên 50 lần với dung môi chiết, lọc qua màng lọc 0,22 µm. Tiến hành sắc ký.

-Nhóm giảm glucose máu: dựa vào khả năng hòa tan của các chất nghiên cứu trong dung môi [5], [126] và căn cứ vào kết quả của các nghiên cứu đã công bố [97],

tiến hành khảo sát khả năng chiết các thuốc tân dược từ nền mẫu bằng các dung môi với nhiều tỉ lệ khác nhau và lựa chọn dung môi chiết hiệu suất cao. Các dung môi khảo sát bao gồm: methanol ; methanol: nước (20 :5) ; acetonitril ; ethanol.

Dựa theo các tài liệu [46], [98], [55], quy trình xử lý mẫu cho đối tượng phân tích là 3 mẫu nền chế phẩm đông dược, TPBVSK viên nang, viên nén, viên hoàn có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường dự kiến là: Xác định khối lượng trung bình đơn vị mẫu, làm đồng nhất mẫu. Cân chính xác một lượng mẫu nền tương ứng ½ liều vào ống falcon. Thêm chính xác 25 ml dung môi chiết, lắc xoáy, siêu âm 15-30 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Pha loãng chính xác dịch trong phía trên 50 lần với dung môi chiết, lọc qua màng lọc 0,22 µm. Tiến hành sắc ký.

-Nhóm ức chế PDE-5: dựa vào khả năng hòa tan của các chất nghiên cứu trong dung môi [86] căn cứ vào kết quả của các nghiên cứu đã công bố [79], [145], [123] tiến hành khảo sát khả năng chiết các chất phân tích từ nền mẫu bằng các dung môi với nhiều tỉ lệ khác nhau và lựa chọn dung môi chiết hiệu suất cao. Các dung môi khảo sát bao gồm: methanol ; methanol-nước =70 : 30 ; methanol-nước-amoniac = 75 : 25 :1 ; acetonitril.

Dựa theo các tài liệu [40], [60], [46], [98], [55], quy trình xử lý mẫu cho đối tượng phân tích là 3 mẫu nền chế phẩm đông dược, TPBVSK viên nang, viên hoàn, cao thuốc có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương dự kiến là: Xác định khối lượng trung bình đơn vị mẫu, làm đồng nhất mẫu. Cân chính xác một lượng mẫu tương ứng ½ liều vào ống falcon. Thêm chính xác 25 ml dung môi chiết, lắc xoáy, siêu âm 15-30 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Pha loãng chính xác dịch trong phía trên 50 lần với dung môi chiết. Lọc dung dịch qua màng lọc 0,22 µm. Tiến hành sắc ký.

2.3.1.2. Xây dựng quy trình xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS

Tiến hành khảo sát theo các nội dung sau:

- Khảo sát điều kiện khối phổ: Tiến hành phân tích trên thiết bị có bộ phân tích khối dạng tứ cực chập ba. Lựa chọn nguồn ion, năng lượng bắn phá, điều kiện phân mảnh ion mẹ và các ion con để phân tích được chất nghiên cứu trong hỗn hợp. Yêu cầu hiện nay đối với phương pháp phân tích bằng LC-MS/MS theo quy định của Châu Âu

(2002/657/EC) với số điểm nhận dạng (IP) là 4 (1 ion mẹ – 1 điểm và 2 ion con – mỗi ion 1,5 điểm) [54].

- Khảo sát điều kiện sắc ký: Lựa chọn pha động, cột sắc ký, tốc độ dòng để có thể tách và phát hiện các chất nghiên cứu ở nồng độ ppb, sắc đồ rõ ràng, thời gian phân tích không quá dài.

2.3.1.3. Thẩm định phương pháp phân tích đã xây dựng

Tiến hành thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của AOAC 2016 [43] và ICH 2005 [84] trên 9 nền mẫu tự tạo. Trong đó, nhóm giảm đau, chống viêm thẩm định trên 3 nền mẫu placcebo hỗ trợ điều trị xương khớp NX1, NX2 và NX3 ; nhóm giảm glucose máu thẩm định trên 3 nền mẫu placcebo hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường ND1, ND2 và ND3*;* nhóm ức chế PDE-5 thẩm định trên 3 nền hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương NP1, NP2 và NP3. Các chỉ tiêu thẩm định gồm:

- Độ phù hợp của hệ thống: Phân tích lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp chất phân tích trên hệ thống LC-MS/MS với các điều kiện đã lựa chọn. Yêu cầu: diện tích pic thu được của 6 lần sắc ký lặp lại mẫu chuẩn của chất phân tích đạt yêu cầu RSD (%) < 5%.

- Độ đặc hiệu: Thực hiện phân tích trên 3 nền mẫu, mỗi nền mẫu bao gồm 3 mẫu như sau: Mẫu dung dịch hỗn hợp chuẩn của 5 chất phân tích, mẫu nền và mẫu nền có thêm hỗn hợp chuẩn của 5 chất phân tích. Yêu cầu: Theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) [54], phương pháp đạt yêu cầu khi có ít nhất 4 điểm IP tức là phải có 1 ion mẹ và 2 ion con với mỗi chất. So sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỉ lệ cường độ hai mảnh con của chất phân tích của mẫu nền thêm chuẩn so với mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu nền phải có có pic tại vị trí tương ứng với chất phân tích.

- Xây dựng đường chuẩn: Pha riêng dãy các dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp nghiên cứu rồi tiến hành phân tích trên hệ thống LC-MS/MS. Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic tương ứng. Yêu cầu: Các đường tuyến tính có hệ số tương quan $r \geq 0, 995$ trong khoảng nồng độ khảo sát.

- Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng (LOD, LOQ): giới hạn phát hiện là nồng độ thấp nhất có S/N khoảng 3 (tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 3 lần đường nhiễu nền), giới hạn định lượng là nồng độ thấp nhất có S/N khoảng 10 (tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 10 lần nhiều đường nền).

- Độ đúng, độ chính xác:

+Thực hiện trên 3 nền mẫu tùy thuộc vào từng nhóm dược chất. Đối với mỗi nền mẫu, nghiền mịn và làm đồng đều mẫu nền. Cân một lượng mẫu nền chính xác khoảng lần lượt là 1,00g NX1; 1,20 g nền NX2; 1,00 g NX3; 0,50 g ND1; 0,50g ND2; 1,50 g ND3; 1,00g NP1; 1,10 g NP2; 1,00 g NP3. Thêm vào mẫu nền chính xác một lượng chuẩn hỗn hợp của từng nhóm chất phân tích ở các mức nồng độ thấp, trung bình và cao. Lắc nhẹ. Sau đó tiến hành xử lý mẫu theo điều kiện đã chọn. Ở mỗi mức nồng độ làm lặp lại 7 lần song song.

- Độ đúng (độ thu hồi) được xác định dựa vào tỉ lệ % của lượng chuẩn tìm lại của mỗi chất phân tích so với lượng chuẩn thêm vào. Yêu cầu: Độ đúng phải đạt theo yêu cầu của AOAC 2016 ở mức nồng độ thử nghiệm.
- Độ chính xác của mỗi mức nồng độ được xác định thông qua đại lượng RSD của kết quả thu được 7 lần làm lặp lại ở mỗi mức nồng độ. Yêu cầu: Độ lặp lại phải đạt theo yêu cầu của AOAC 2016 ở mức nồng độ thử nghiệm.

2.3.2. Xây dựng quy trình định tính một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC

2.3.2.1. Khảo sát quy trình chiết xuất

-Quy trình xử lý mẫu cho đối tượng phân tích là 3 mẫu nền chế phẩm đông dược, TPBVSK viên nang, viên nén, bột thuốc có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp dự kiến là: Xác định khối lượng trung bình đơn vị mẫu, làm đồng nhất mẫu. Cân chính xác một lượng tương ứng ½ liều vào ống falcon, thêm dung môi chiết, lắc xoáy. Siêu âm 15-30 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Cô cạn hoặc pha loãng chính xác dịch trong phía trên với dung môi chiết, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành chấm sắc ký.

-Quy trình xử lý mẫu cho đối tượng phân tích là 3 mẫu nền chế phẩm đông dược, TPBVSK viên nang, viên nén, viên hoàn có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường dự kiến là: Xác định khối lượng trung bình đơn vị mẫu, làm đồng nhất mẫu. Cân chính xác một lượng mẫu nền tương ứng ½ liều vào ống falcon. Thêm chính xác 25 ml dung môi chiết, lắc xoáy, siêu âm 15-30 phút ở nhiệt độ phòng, ly

tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành chấm sắc ký.

-Quy trình xử lý mẫu cho đối tượng phân tích là 3 mẫu nền chế phẩm đông dược, TPBVSK viên nang, viên hoàn, cao thuốc có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương dự kiến là: Xác định khối lượng trung bình đơn vị mẫu, làm đồng nhất mẫu. Cân chính xác một lượng mẫu tương ứng ½ liều vào ống falcon. Thêm chính xác 25 ml dung môi chiết, lắc xoáy, siêu âm 15-30 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 phút. Lọc dung dịch qua màng lọc 0,45 µm. Tiến hành chấm sắc ký.

Quá trình lựa chọn các dung môi chiết của phương pháp HPTLC dựa vào sự lựa chọn dung môi chiết của phương pháp LC-MS để hiệu suất chiết cao. Riêng độ pha loãng dịch chiết cuối cùng thay đổi do khả năng phát hiện của phương pháp HPTLC khác biệt

2.3.2.2. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Pha tĩnh: Sử dụng bản mỏng silica gel 60 F_{254} với kích thước khác nhau.

Pha động : Tùy thuộc vào từng nhóm hoạt chất [9], [136] như sau:

-Nhóm glucocorticoid: dựa trên điều kiện của các tác giả [39] , [60], [40], [123], [79] tiến hành khảo sát bằng thực nghiệm các hệ dung môi pha động sau: cloroform – methanol - amoniac 25% (90 :1 :5) ; cloroform – methanol –diethylamin (90 : 10 : 1) ; terbutyl methyl ether –methanol–amoniac 25% (20 : 2 : 1) ; ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:1) ; ethanol- n-hexan- amoniac (70:30:1) theo thể tích.

-Nhóm NSAID : Dựa vào độ tan của các chất phân tích trong dung môi và tham khảo công bố của các tác giả [142], [109], ta tiến hành khảo sát trên 4 hệ pha động gồm: Hệ 1: $CHCl_3$: MeOH: NH_3 25% (18:15:5); Hệ 2: Toluen: n-propanol: acid formic (5:4:1); Hệ 3: $CHCl_3$: MeOH(9:1); Hệ 4: n-hexan: ethyl acetat: acid acetic (7:2,5:0,5) theo thể tích.

-Nhóm giảm glucose máu: Dựa trên điều kiện của các tác giả [90], , [70], tiến hành khảo sát bằng thực nghiệm các hệ dung môi pha động sau: Hệ 1: MeOH - nước - acid acetic băng (6:4:0,25); Hệ 2: n-butanol - acid acetic - nước (11:2:2); Hệ 3: n-butyl acetat chứa 0,4% acid formic; Hệ 4: n-butyl acetat - MeOH - acid formic (11:2,5:1,5); Hệ 5: toluen - ethyl acetat - MeOH (8,5:1:8,5) theo thể tích.

-Nhóm ức chế PDE-5*:* Dựa trên điều kiện của các tác giả [40], [60], [123] , tiến hành khảo sát bằng thực nghiệm các hệ dung môi pha động sau: cloroform – methanol - amoniac 25% (90 :1 :5) ; cloroform – methanol –diethylamin (90 : 10 : 1) ; terbutyl methyl ether –methanol–amoniac 25% (20 : 2 : 1) ; ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:1); ethanol- n-hexan- amoniac (70:30:1) theo thể tích.

Thể tích chấm sắc ký: 5µl. Phát hiện: Khảo sát điều kiện phát hiện với các bước sóng khác nhau bằng đèn tử ngoại. Lựa chọn điều kiện tách riêng các chất, các vết gọn, rõ nét, phổ trùng với phổ chuẩn để định tính. Sử dụng phần mềm chuyên dụng lấy kết quả tích phân của các vết chất phân tích trên sắc ký đồ để xác định mật độ và kích thước vết chất phân tích. Dựa vào đáp ứng của chất phân tích trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu thử và lượng chất phân tích trong mẫu chuẩn tính lượng chất phân tích trong mẫu thử.

2.3.2.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp trên mẫu tự tạo chứa các chất nghiên cứu với các chỉ tiêu theo AOAC và ICH:

- Độ đặc hiệu: Phân tích đồng thời 3 mẫu: dung dịch hỗn hợp chuẩn chất phân tích, mẫu placebo và mẫu placebo thêm chuẩn trên hệ thống HPTLC. Thực hiện trên 3 nền mẫu placebo tùy thuộc từng nhóm hoạt chất. Yêu cầu: trên sắc ký đồ của mẫu placebo thêm chuẩn có các vết chính có cùng màu sắc, giá trị R_f với các vết chính trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn; hệ số tinh khiết pic và hệ số chồng phổ của mẫu thử so với mẫu chuẩn lớn hơn 0,99. Sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện các vết tương ứng với các vết chính trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu placebo thêm chuẩn.

- Giới hạn phát hiện (LOD): giới hạn phát hiện là nồng độ thấp nhất có S/N khoảng 3 (tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 3 lần nhiễu nền).

2.3.3. Phát triển quy trình định tính sildenafil trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp với tán xạ Raman tăng cường bề mặt (TLC – SERS)

2.3.3.1. Khảo sát các điều kiện SERS

- Chuẩn bị hỗn dịch keo bạc: tham khảo tài liệu [95], [108] chuẩn bị hỗn dịch keo bạc trong nước. Trước tiên, lấy 194 ml nước cất được đun nóng đến 100^{o}C

rõ ràng và có S/N các đỉnh đặc trưng của sildenafil khoảng 3 (tín hiệu đáp ứng của cường độ đỉnh gấp khoảng 3 lần nhiễu nền).

2.3.4. Ứng dụng của các phương pháp phân tích

2.3.4.1. Ứng dụng phương pháp LC-MS/MS trong phân tích các mẫu thực

Tiến hành khảo sát 119 mẫu chế phẩm chế phẩm điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp; 41 chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường; 24 chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lực.

Xử lý mẫu theo quy trình đã xây dựng.

Sắc ký mẫu thử, phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép trong mẫu đông dược dựa vào thời gian lưu, mảnh khối và tỷ lệ ion con định tính định lượng so với chất chuẩn.

Xác định nồng độ thuốc tân dược trong mẫu dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng của chất nghiên cứu được thiết lập trong ngày, từ đó tính được lượng thuốc tân dược trộn trái phép (nếu có) trong mẫu đông dược ban đầu.

2.3.4.2. Ứng dụng phương pháp HPTLC trong phân tích mẫu thực

Áp dụng phương pháp HPTLC vừa xây dựng được để định tính các tân dược được trộn trái phép trong các mẫu chế phẩm (gồm viên nang, viên hoàn, cao thuốc, thuốc bột, trà túi lọc, dung dịch) thu thập được trên thị trường (nếu có). Tiến hành trên 119 mẫu chế phẩm chế phẩm điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp; 41 chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường; 24 chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lực.

Xử lý mẫu theo quy trình đã xây dựng.

Sắc ký mẫu thử, phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép trong mẫu đông dược dựa vào quãng đường di chuyển (R_f), hình dạng vết, hệ số tính khiết pic và hệ số chồng phổ UV của mẫu thử so với chất chuẩn lớn hơn 0,99 để kết luận mẫu dương tính.

2.3.4.3. Ứng dụng phương pháp TLC – SERS trong phân tích mẫu thực

Áp dụng phương pháp TLC – SERS vừa xây dựng được để phát hiện sildenafil được trộn lẫn trong trong 24 chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lực trên thị trường dựa trên việc so sánh phổ của chất chuẩn và phổ của các mẫu thực dựa vào: hệ số R_f; phổ SERS với các đỉnh đặc trưng trên mẫu; đặc biệt đánh giá tỷ lệ dao động của các đỉnh đặc trưng theo tham khảo [23].

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả thu được trong quá trình tiến hành nghiên cứu bằng phương pháp LC-MS/MS được xử lý bằng phần mềm MSDR5 có sẵn trong thiết bị LC-MS/MS. Phần mềm có các chức năng tối ưu hóa điều kiện khối phổ điều kiện các chất phân tích; xuất ra các kết quả diện tích pic. Đặc biệt, phần mềm có khả năng chồng khối phổ mẫu thực và mẫu chuẩn trong thư viện, thời gian lưu, mảnh ion mẹ, so sánh tỷ lệ mảnh ion định lượng và định tính, kết luận mẫu dương tính với dược chất nghiên cứu.

Các kết quả thu được trong quá trình tiến hành nghiên cứu bằng phương pháp HPTLC đều được xử lý bằng phần mềm điều khiển winCAT có sẵn trong thiết bị HPTLC. Trên phần mềm WinCats để đánh giá so sánh mẫu thử với mẫu chuẩn, kết luận mẫu thử thì có 2 cách để chồng phổ. Cách 1 tiến hành chồng phổ 2 vết mẫu thử và mẫu chuẩn tại R_f tương đương trong thư viện phổ của máy, xuất hiện hệ số chồng phổ (correlation). Cách 2 tiến hành chồng phổ vết của mẫu thử và 2 mẫu chuẩn tại R_f tương đương ngay trên cùng 1 bản mỏng và xuất hiện 2 hệ số chồng phổ của chuẩn với chuẩn, và thử với chuẩn; hệ thống máy sẽ xuất pass và fail, kết luận rõ ràng cho mẫu thử. Mẫu thử được kết luận là dương tính với chất hóa dược khi hệ số chồng phổ đều đạt trên 0,99.

Các kết quả thu được trong quá trình tiến hành nghiên cứu bằng phương pháp TLC-SERS đều được xử lý bằng phần mềm điều khiển Labspec 5 có sẵn trong thiết bị Raman và xử lý dữ liệu phổ SERS thu được bằng phần mềm OriginPro 8.5.

Sử dụng các phương pháp xử lý thống kê trong phân tích nhờ các hàm toán học, thống kê có sẵn trong phần mềm Microsoft Office Excel 2013 để tính kết quả trung bình, độ lệch chuẩn (SD), độ lệch chuẩn tương đối (RSD khi xử lý các kết quả thực nghiệm và đánh giá thẩm định phương pháp.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS

3.1.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số thuốc nhóm giảm đau, chống viêm trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

3.1.1.1. Khảo sát điều kiện khối phổ và sắc ký

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc đơn (100 µg/ml): Cân chính xác khoảng 10 mg mỗi chất paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon và prednison cho vào các bình định mức 100 ml, hòa tan bằng dung môi methanol thu được dung dịch chuẩn đơn mỗi chất nồng độ chính xác khoảng 100 µg/ml. Từ chuẩn gốc 100 µg/ml pha bằng methanol thành dung dịch chuẩn thứ cấp 1 µg/ml (1000 ng/ml).

a. Khảo sát điều kiện khối phổ

Để phân tích các tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS cần phải xác định được ion phân tử (ion mẹ) và ion sản phẩm (ion con) đối với từng hoạt chất. Với kỹ thuật ion hóa ESI ở chế độ ion dương, các ion phân tử thường được tạo thành bằng cách thêm một proton $[M+H]^+$. Từ ion mẹ đã xác định được, tiến hành bắn phá để lựa chọn các ion con dùng trong định tính và định lượng.

Sử dụng các dung dịch chuẩn đơn nồng độ 1000 ng/ml tiêm không qua cột vào hệ thống MS để xác định ion mẹ và các ion con. Các điều kiện phân mảnh ion, năng lượng bắn phá phân mảnh (CE) được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ. Từ kết quả tối ưu hóa, lựa chọn 2 ion con có tín hiệu lớn, trong đó ion con có tín hiệu lớn và ổn định hơn làm ion định lượng, ion con còn lại dùng để định tính. Điều kiện khối phổ lựa chọn và phổ đồ các chất phân tích được trình bày trong các hình và bảng sau:

Bảng 3.1. Các thông số máy khối phổ

Thông số	**Giá trị tối ưu (đơn vị)**
Điện áp đầu phun	3500 V
Khí chắn	20 psi
Nhiệt độ nón	250°C
Khí ion hóa 1	40 psi
Nhiệt độ ion hóa	250°C
Khí ion hóa 2	45 psi
CID gas	Ar 1.5 mTorr

Bảng 3.2. Điều kiện khối phổ của nhóm giảm đau, chống viêm

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	CE (eV)	Tỷ lệ (%)
PARA	152,1	**110,1**	**13**	**80,4**
		93,2	20	19,6
PIRO	332,1	**95,2**	**15**	**67,5**
		121,1	19	32,5
KETO	255,1	**209,0**	**10**	**61,3**
		105,1	19	38,7
INDO	358,1	**139,0**	**16**	**78,8**
		111,1	42	21,2
DEXA	435,2	**337,1**	**9**	**52,8**
		397,1	6	47,2
BETA	393,2	**373,1**	**5**	**71,5**
		355,1	8	28,5
HYRO	405,2	**327,1**	**13**	**70,1**
		241,1	18	29,9
PREL	361,2	**343,1**	**6**	**82,8**
		173,0	20	17,2
PREN	359,2	**341,1**	**7**	**62,9**
		313,1	8	37,1

Nhận xét: Các điều kiện ion hóa và điều kiện phân mảnh ở *Bảng 3.1* và *Bảng 3.2* đã xác định được điều kiện MS/MS để phân tích các hoạt chất nghiên cứu. Kết quả khảo sát cho thấy ion mẹ của 9 chất phân tích đều ở dạng $[M+H]^+$ có số khối lớn hơn khối lượng phân tử một đơn vị (m/z=M+1) cho cường độ tín hiệu lớn nhất. Từ đó, mỗi chất phân tích được xác định bằng một ion mẹ và hai ion con dùng để định lượng và định tính.

b. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Một số thông số chạy sắc ký sau:

- Thể tích tiêm: 2 µl.

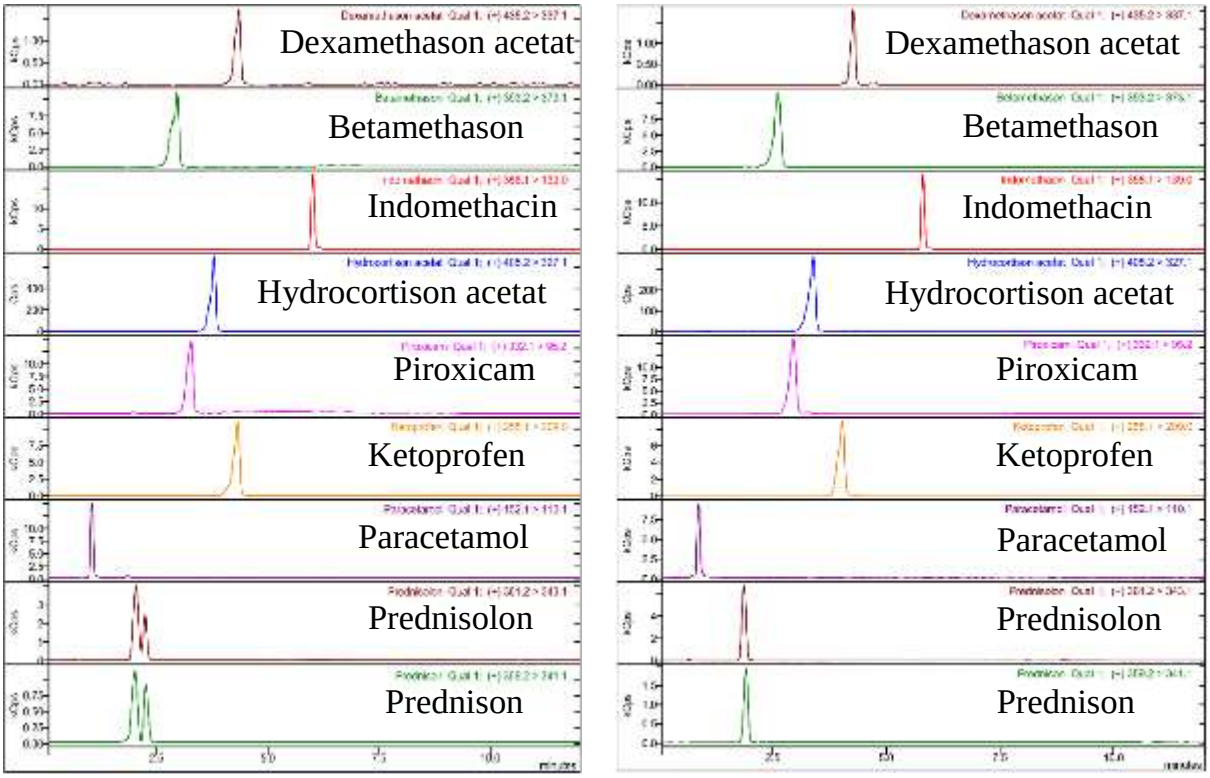
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ).

- Nhiệt độ cột: 40^{o}C.

Tiêm vào hệ thống sắc ký hỗn hợp 9 chất nghiên cứu nồng độ 100 ng/ml và khảo sát các thông số khác:

❖ ***Cột sắc ký***

Tiến hành khảo sát trên hai cột là: cột InertSustain Swift C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Hình a) và cột Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Hình b). Sử dụng cùng hệ pha động gồm acetonitril và nước (thêm acid formic 0,1%). Sắc ký đồ tổng hợp của các chất nghiên cứu sử dụng hai loại cột trên được trình bày ở *Hình 3.1*.



(a) Cột InertSustain Swift C18 *(b) Cột Restek Ultra II C18*

Hình 3.1. Sắc ký đồ khảo sát cột sắc ký của nhóm giảm đau, chống viêm

<u>*Nhận xét:*</u> Từ kết quả sắc ký đồ của các chất phân tích cho thấy: Đồng thời với cùng một thể tích tiêm, cột InertSustain Swift C18 cho pic dexamethason acetat và betamethason không cân xứng, đổ đầu, đồng thời prednisolon và prednison bị chẻ pic. Vì vậy, cột Restek Ultra II C18 được lựa chọn để tiến hành phân tích.

❖ ***Pha động***

Pha động trong sắc ký lỏng khối phổ được sử dụng với hai mục đích: tách các chất trong hỗn hợp và tác động vào quá trình ion hóa của các chất phân tích.

Khảo sát thành phần pha động

Tiến hành khảo sát các chất ở nồng độ 100 ng/ml với 2 pha động như sau:

MP 1: Acid formic 0,1%/H_2O (A) và ACN (B)

MP 2: Acid formic 0,1%/H_2O (A) và acid formic 0,1%/ACN (B)

Kết quả tín hiệu của các chất thu được lớn hơn với hệ pha động MP2: acid formic 0,1%/H_2O (A) và acid formic 0,1%/ACN (B).

Khảo sát tỷ lệ pha động

Sử dụng hệ pha động MP2 với kênh A: acid formic 0,1%/H_2O và kênh B: acid formic 0,1%/ACN, khảo sát chế độ pha động đẳng dòng 40:60 và các chế độ gradient sau:

Bảng 3.3. Điều kiện khảo sát pha động theo chế độ gradient của nhóm giảm đau, chống viêm

Gradient 1			**Gradient 2**			**Gradient 3**		
Thời gian (Phút)	**%A**	**%B**	**Thời gian (Phút)**	**%A**	**%B**	**Thời gian (Phút)**	**%A**	**%B**
0 - 7	70→40	30→60	0 - 7	70→20	30→80	0 - 7	70→30	30→70
7 - 8	40	60	7 - 8	20	80	7 - 8,5	30→70	70→30
8 - 8,5	40→70	60→30	8 - 8,5	20→70	80→30	8,5 - 12	70	30
8,5 - 12	70	30	8,5 - 12	70	30			

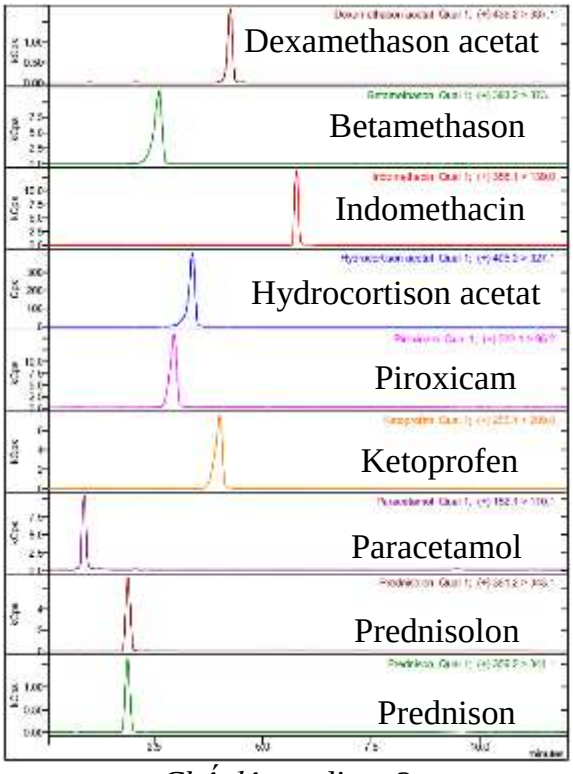
Nhận xét: Kết quả ở cho thấy:

- *Chương trình đẳng dòng A:B = 40:60*: Các pic ra sớm và nhanh, thời gian lưu từ 0,7 phút đến 2,8 phút. Pic indomethacin và piroxicam doãng chân. Paracetamol, prednison và prednisolon không tách được pic rõ ràng.

- *Chương trình gradient 1*: Thời gian lưu các chất từ 0,8 phút đến 6,8 phút, dài hơn so với gradient 2 và gradient 3. Betamethason và hydrocortison acetat chẻ pic, paracetamol cho tín hiệu nhiễu nền cao, pic prednisolon và prednison kéo đuôi đồng thời trên sắc ký đồ của prednison có xuất hiện pic phụ.

- *Chương trình gradient 2*: Thời gian lưu các chất từ 0,8 phút đến 5,3 phút, ngắn hơn gradient 3 nhưng không đáng kể. Tuy nhiên, chương trình gradient 2 có betamethason chẻ pic, đồng thời trên sắc ký đồ của piroxicam có xuất hiện pic phụ.

- *Chương trình gradient 3*: Thời gian lưu các chất tương đối ngắn, từ 0,9 phút đến 5,7 phút. Trên sắc ký đồ của các chất phân tích thu được pic gọn, sắc nét, cường độ tín hiệu pic phù hợp xem *Hình 3.2*.



Chế độ gradient 3

Hình 3.2. Sắc ký đồ của nhóm giảm đau, chống viêm với pha động được lựa chọn

Do đó, pha động gồm acetonitril chứa acid formic 0,1% và nước chứa acid formic 0,1% chạy theo chế độ gradient 3 được lựa chọn để phân tích các chất nghiên cứu.

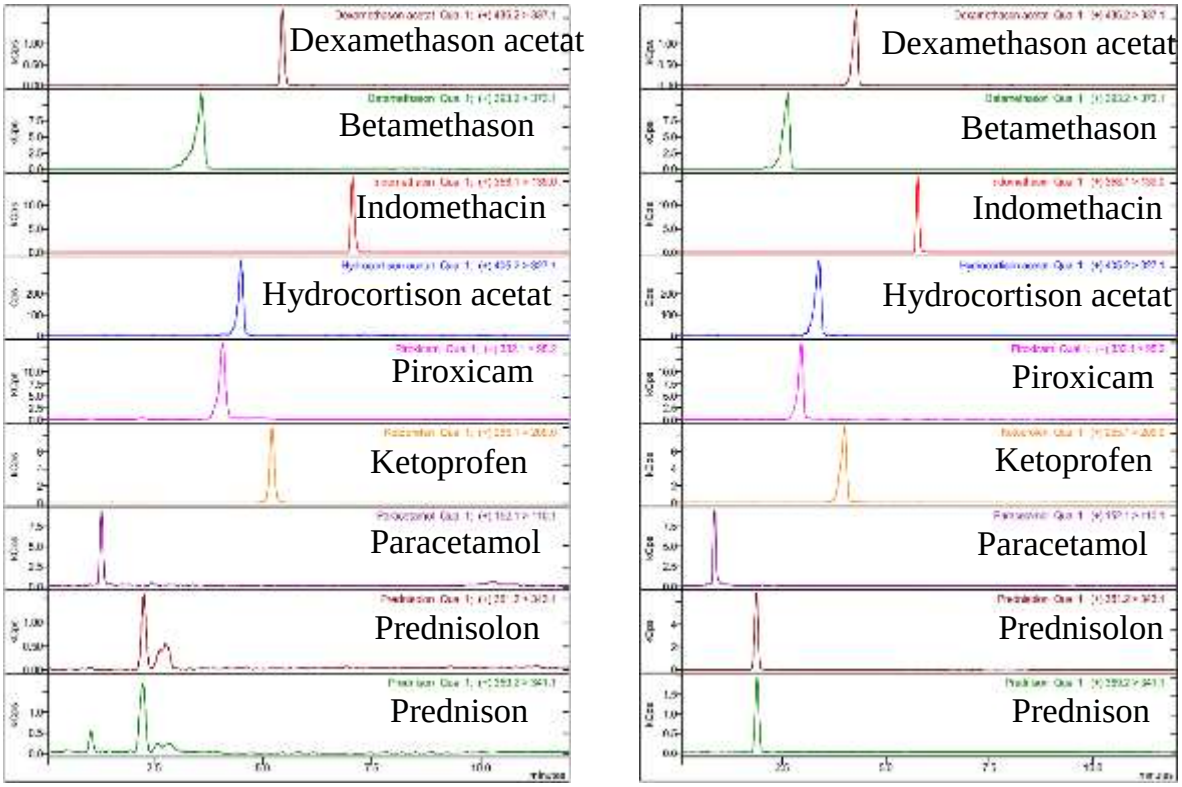
❖ *Tốc độ dòng*

Khảo sát với hai tốc độ dòng 0,2 ml/phút và 0,3ml/phút. Kết quả sắc ký đồ các chất khi phân tích với tốc độ dòng khác nhau ở *Hình 3.3* cho thấy:

- *Tốc độ dòng 0,2 ml/phút (a)* cho các pic có thời gian lưu từ 1,3 đến 7,1 phút, độ rộng chân pic lớn hơn so với tốc độ dòng 0,3 ml/phút. Các pic prednisolon và prednison bị kéo đuôi, prednison còn xuất hiện pic phụ.

- *Tốc độ dòng 0,3 ml/phút (b)* cho các pic có thời gian lưu từ 0,8 đến 5,8 phút, độ rộng chân pic hẹp, các pic tách rõ ràng.

Do đó, chọn tốc độ dòng 0,3 ml/phút để có sắc ký đồ cho pic có thời gian lưu phù hợp, các pic tách rõ ràng, độ rộng chân pic hẹp, cường độ tín hiệu pic phù hợp đồng thời vẫn duy trì được áp suất cột ổn định và đảm bảo độ bền của cột sắc ký.



(a) Tốc độ dòng 0,2 ml/phút *(b) Tốc độ dòng 0,3 ml/phút*

Hình 3.3. Sắc ký đồ khảo sát tốc độ dòng của nhóm giảm đau, chống viêm

c. Khảo sát và lựa chọn điều kiện xử lý mẫu

❖ *Khảo sát dung môi chiết*

Khảo sát với các dung môi ethanol 96% (QT1.1), hỗn hợp methanol: nước (30:70) (QT1.2), hỗn hợp methanol : nước (50:50) (QT1.3), hỗn hợp methanol : nước (70:30) (QT1.4) và methanol (QT1.5) để lựa chọn dung môi cho hiệu suất chiết cao nhất.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích DEXA và BETA là 37,5 µg/ml; HYRO, PREL và PREN là 125 µg/ml trong methanol.

Chuẩn bị mẫu: Cân 1 lượng nền mẫu tương đương ½ liều (0,5 g nền N1; 0,6 g nền N2 và 0,3 g nền N3). Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp. Lắc nhẹ. Để khô ở điều kiện phòng. Sau đó, tiến hành chiết với các dung môi khác nhau theo quy trình dự kiến ở phần phương pháp và phân tích trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả hiệu suất chiết của các chất nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát dung môi chiết

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	QT1.1		QT1.2		QT1.3		QT1.4		QT1.5	
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)
Nền nang											
DEXA	31,0	28,5	91,9	28,6	92,3	29,5	95,1	31,0	100,1	29,9	96,5
BETA	30,0	27,1	90,3	27,4	91,2	28,6	95,5	30,4	101,5	28,9	96,3
INDO	100,0	99,9	99,9	84,8	84,8	87,2	87,2	103,3	103,3	99,3	99,3
HYRO	99,9	79,2	79,3	82,2	82,3	86,5	86,5	88,2	88,3	95,4	95,5
PIRO	20,1	17,5	87,0	17,9	89,1	18,5	92,1	19,9	99,0	18,8	93,5
KETO	100,6	102,1	101,5	85,9	85,4	100,7	100,1	108,7	108,1	95,9	95,3
PARA	100,8	92,8	92,1	102,9	102,1	102,1	101,3	101,4	100,6	99,2	98,4
PREL	103,8	84,4	81,3	78,1	75,2	82,0	79,0	87,7	84,5	96,9	93,4
PREN	102,0	91,8	90,0	87,0	85,3	89,3	87,5	90,4	88,6	99,4	97,4
Nền bột											
DEXA	31,0	28,7	92,5	28,7	92,5	29,6	95,5	31,4	101,4	30,1	97,1
BETA	30,0	27,4	91,2	27,5	91,5	28,7	95,6	30,5	101,6	29,3	97,6
INDO	100,0	98,9	98,9	84,2	84,2	87,7	87,7	101,2	101,2	98,6	98,6
HYRO	99,9	81,7	81,8	82,5	82,5	86,2	86,3	89,3	89,4	97,2	97,3
PIRO	20,1	17,9	89,2	17,9	88,9	18,6	92,7	20,4	101,6	19,5	96,8
KETO	100,6	102,7	102,1	86,1	85,6	101,4	100,8	108,4	107,7	98,4	97,8
PARA	100,8	92,3	91,5	102,4	101,5	102,3	101,5	102,0	101,2	99,7	98,9
PREL	103,8	86,6	83,5	78,2	75,4	82,1	79,1	90,1	86,8	100,3	96,6
PREN	102,0	92,9	91,1	87,1	85,4	89,4	87,6	92,2	90,4	100,1	98,2
Nền nén											
DEXA	31,0	29,0	93,6	28,8	92,8	29,7	95,8	31,5	101,7	30,6	98,7
BETA	30,0	27,3	91,0	27,5	91,6	28,5	94,9	30,7	102,2	29,1	97,1
INDO	100,0	100,2	100,2	85,7	85,7	87,9	87,9	102,6	102,6	100,6	100,6
HYRO	99,9	81,4	81,5	82,7	82,7	87,0	87,1	91,0	91,1	98,0	98,1
PIRO	20,1	18,2	90,3	17,8	88,7	18,5	91,9	20,6	102,3	20,2	100,3
KETO	100,6	103,5	102,8	86,0	85,5	101,0	100,4	109,2	108,6	97,2	96,7
PARA	100,8	93,4	92,6	103,2	102,4	101,4	100,6	102,0	101,2	99,8	99,0
PREL	103,8	85,3	82,2	78,7	75,8	82,3	79,2	88,5	85,3	97,9	94,3
PREN	102,0	96,3	94,4	87,3	85,6	89,5	87,8	91,9	90,1	100,9	98,9

**: lượng chuẩn trong 1 ml mẫu phân tích.*

Nhận xét: Kết quả cho thấy quy trình 1.5 (dung môi chiết là methanol), hiệu suất các chất thu được khá đồng đều nhau từ 93,4 – 100,6%. Do đó, chọn dung môi chiết là methanol.

❖ *Khảo sát thời gian siêu âm*

Tiến hành giai đoạn 1 và 2 của quy trình chung, sử dụng dung môi chiết là methanol. Khảo sát thời gian siêu âm lần lượt là 5 phút (QT1.5.1), 10 phút (QT1.5.2) và 15 phút (QT1.5.3). Dịch chiết được pha loãng bằng methanol, lọc qua màng lọc 0,22 µm và tiến hành phân tích trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả hiệu suất chiết của các chất nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm của nhóm giảm đau, chống viêm

Hoạt chất	$m_{thêm\ vào}$ (ng)	QT1.5.1		QT1.5.2		QT1.5.3	
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)
Nền nang							
DEXA	31,0	26,5	85,4	29,9	96,5	29,9	96,3
BETA	30,0	26,5	88,4	28,9	96,3	29,0	96,8
INDO	100,0	75,8	75,8	99,3	99,3	100,3	100,3
HYRO	99,9	72,5	72,5	95,4	95,5	95,3	95,4
PIRO	20,1	16,0	79,8	18,8	93,5	18,8	93,5
KETO	100,6	88,4	87,8	95,9	95,3	96,6	96,1
PARA	100,8	93,6	92,8	99,2	98,4	98,8	98,0
PREL	103,8	85,6	82,5	96,9	93,4	96,8	93,2
PREN	102,0	84,9	83,2	99,4	97,4	99,3	97,4
Nền bột							
DEXA	31,0	26,7	86,2	30,1	97,1	30,2	97,5
BETA	30,0	26,3	87,7	29,3	97,6	29,1	96,9
INDO	100,0	74,4	74,4	98,6	98,6	98,1	98,1
HYRO	99,9	72,3	72,4	97,2	97,3	97,1	97,2
PIRO	20,1	16,0	79,6	19,5	96,8	19,5	96,9
KETO	100,6	88,1	87,6	98,4	97,8	97,8	97,2
PARA	100,8	93,1	92,4	99,7	98,9	99,4	98,7
PREL	103,8	85,1	82,0	100,3	96,6	99,9	96,3
PREN	102,0	85,7	84,0	100,1	98,2	100,2	98,3
Nền nén							
DEXA	31,0	26,6	85,9	30,6	98,7	30,3	97,9
BETA	30,0	26,6	88,7	29,1	97,1	29,3	97,5
INDO	100,0	75,0	75,0	100,6	100,6	99,9	99,9
HYRO	99,9	71,9	72,0	98,0	98,1	98,2	98,3
PIRO	20,1	16,0	79,6	20,2	100,3	20,0	99,5
KETO	100,6	87,4	86,9	97,2	96,7	97,0	96,4
PARA	100,8	93,7	93,0	99,8	99,0	101,9	99,1
PREL	103,8	85,8	82,7	97,9	94,3	98,7	95,1
PREN	102,0	85,2	83,6	100,9	98,9	102,9	99,1

Từ kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện phân tích như sau:

Xử lý mẫu

Cân lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Pha loãng lớp dịch trong phía trên 50 lần bằng methanol. Lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ);
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ)
- Nhiệt độ buồng cột: 40^{o}C; Thể tích tiêm mẫu: 2 µl; Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1%/H_2O; kênh B: HCOOH 0,1%/ACN
- Chương trình pha động: chế độ gradient 3. Thời gian phân tích: 12 phút

Điều kiện khối phổ:

- Các Thông số máy MS: Bảng 3.1
- Điều kiện MS của 9 dược chất: Bảng 3.2, xem thêm Phụ lục 5.1

3.1.1.2. Thẩm định quy trình phân tích

a. Độ phù hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại sáu lần dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm paracetamol, ketoprofen, indomethacin, hydrocortison acetat, prednisolon và prednison nồng độ 100 ng/ml; piroxicam nồng độ 20 ng/ml; betamethason và dexamethason acetat nồng độ 30 ng/ml vào hệ thống LC-MS/MS. Kết quả phân tích được trình bày ở *Bảng 3.6.*

Bảng 3.6. Kết quả đánh giá độ phù hợp của nhóm giảm đau chống viêm trên hệ thống LC-MS/MS

Hoạt chất	L1	L2	L3	L4	L5	L6	TB	RSD
	Thời gian lưu (phút)							
BETA	2,646	2,645	2,626	2,652	2,657	2,652	**2,646**	**0,4**
DEXA	4,210	4,218	4,203	4,235	4,222	4,211	**4,217**	**0,3**
PREL	1,839	1,843	1,834	1,863	1,857	1,852	**1,848**	**0,6**
HYRO	3,403	3,416	3,397	3,425	3,397	3,378	**3,403**	**0,5**
PREN	1,848	1,850	1,845	1,874	1,866	1,864	**1,858**	**0,6**
INDO	5,738	5,740	5,737	5,756	5,759	5,744	**5,746**	**0,2**
PARA	0,888	0,885	0,882	0,892	0,882	0,893	**0,887**	**0,5**
PIRO	2,903	2,911	2,882	2,922	2,921	2,901	**2,907**	**0,5**
KETO	4,004	4,018	3,998	4,041	4,029	4,026	**4,019**	**0,4**

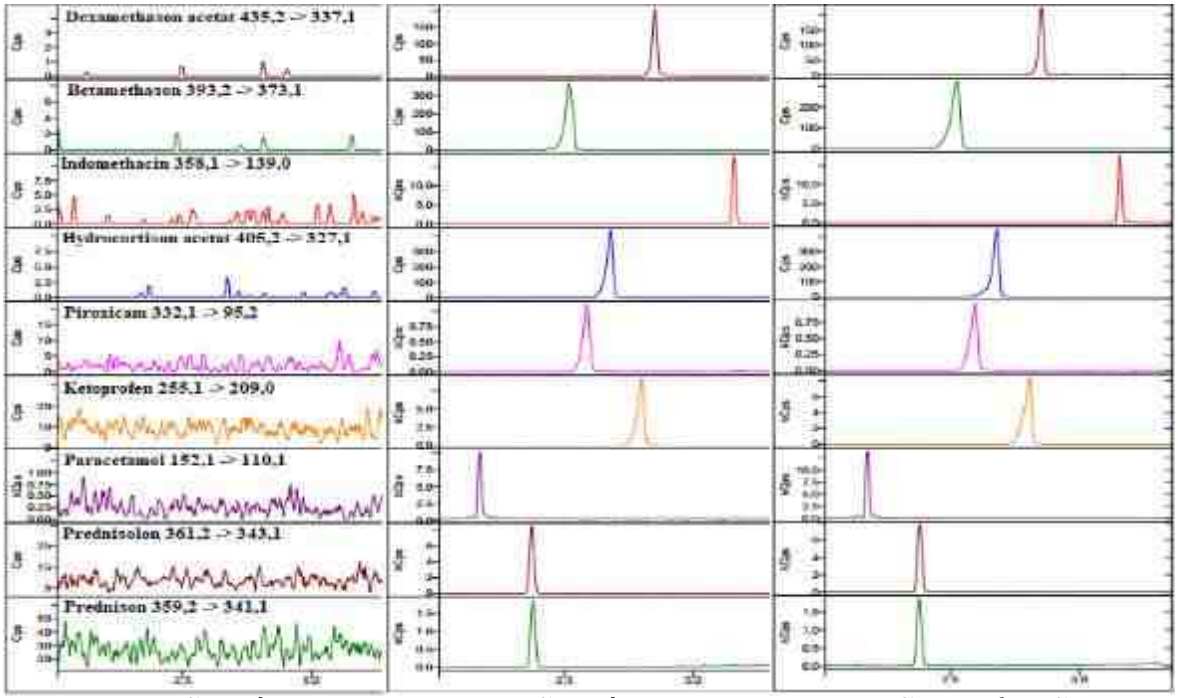
	Diện tích pic (Counts)							
BETA	4319	4600	4203	4330	4224	4044	**4287**	**4,3**
DEXA	1524	1435	1454	1601	1527	1496	**1506**	**4,0**
PREL	53562	55969	49847	51986	51265	50042	**52112**	**4,5**
HYRO	4734	4937	4539	4731	4446	4601	**4665**	**3,7**
PREN	12819	12898	12028	12844	12804	12709	**12684**	**2,6**
INDO	90194	89517	93257	94480	89385	92482	**91553**	**2,3**
PARA	62875	61704	59596	66988	61496	59218	**61980**	**4,5**
PIRO	10927	10569	10750	10371	11286	9824	**10621**	**4,7**
KETO	94862	101443	94473	93807	92180	89854	**94437**	**4,1**

Nhận xét: Kết quả cho thấy RSD của thời gian lưu thấp (< 1%) và RSD của diện tích pic dao động trong khoảng 2,3 – 4,7%. Như vậy hệ thống đáp ứng yêu cầu phân tích.

b. Độ đặc hiệu

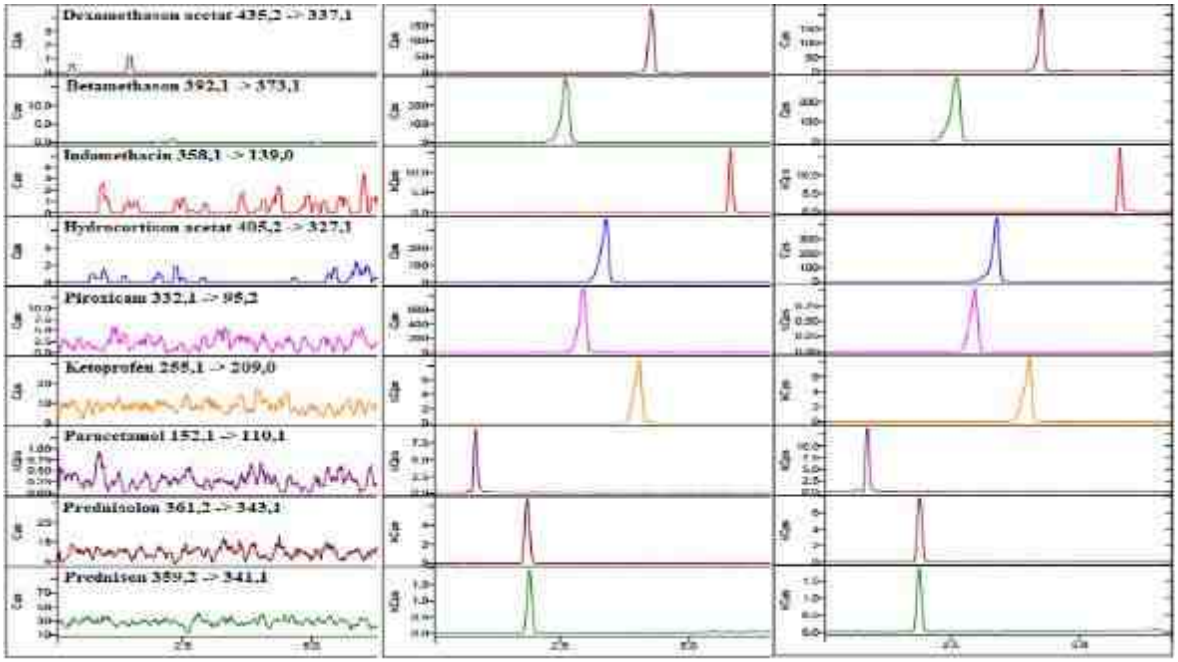
Theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) phương pháp đạt yêu cầu khi có ít nhất 4 điểm IP. Ở phương pháp LC-MS này, khi tiến hành phân tích, phải có 1 ion mẹ và 2 ion con với mỗi chất. Như vậy, phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu có 1 ion mẹ và 2 ion con định tính và định lượng. Sử dụng phần mềm so sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỉ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của mẫu thử so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) hoặc nghi ngờ (fail) sự có mặt của các chất phân tích trong mẫu thử.

Chuẩn bị mẫu trắng, mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu chuẩn như sau: Mẫu trắng: Xử lý mẫu nền theo quy trình xử lý mẫu. Mẫu chuẩn: Từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng bằng methanol thành dung dịch hỗn hợp gồm paracetamol, ketoprofen, indomethacin, hydrocortison acetat, prednisolon và prednison nồng độ 100 ng/ml; piroxicam nồng độ 20 ng/ml; betamethason và dexamethason acetat nồng độ 30 ng/ml. Mẫu trắng thêm chuẩn: Từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng với dung môi là dịch chiết mẫu trắng thành dung dịch hỗn hợp với các chất có nồng độ như trên. Độ đặc hiệu thể hiện khả năng phân biệt chất phân tích và nền mẫu. Tiến hành lần lượt trên 3 nền nang, bột, nén, phân tích mẫu trắng, mẫu trắng thêm chuẩn và mẫu chuẩn. Sắc ký đồ của các mẫu trình bày ở các hình dưới đây:



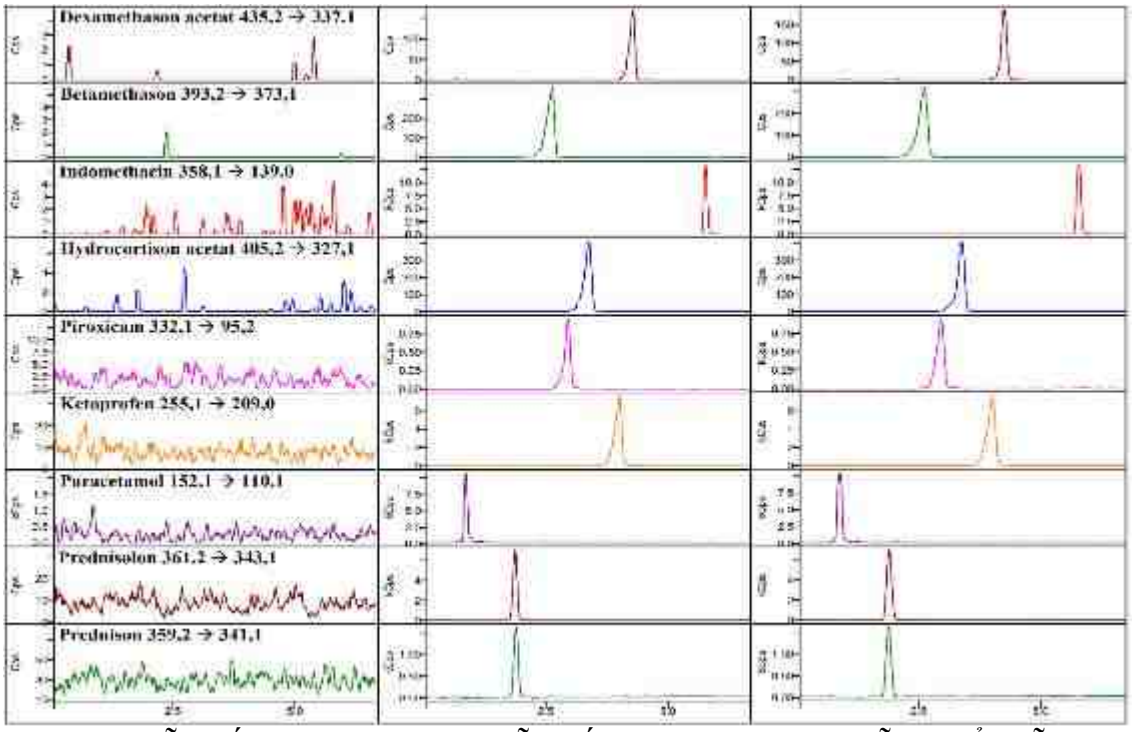
(a) Mẫu trắng *(b) Mẫu trắng thêm chuẩn* *(c) Mẫu chuẩn hỗn hợp*

Hình 3.4. Sắc ký đồ khảo sát độ đặc hiệu của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền nang (NX1) bằng LC-MS/MS



(a) Mẫu trắng *(b) Mẫu trắng thêm chuẩn* *(c) Mẫu chuẩn hỗn hợp*

Hình 3.5. Sắc ký đồ khảo sát độ đặc hiệu của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền bột (NX2) bằng LC-MS/MS



(a) Mẫu trắng *(b) Mẫu trắng thêm chuẩn* *(c) Mẫu chuẩn hỗn hợp*

Hình 3.6. Sắc ký đồ khảo sát độ đặc hiệu của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền nén (NX3) bằng LC-MS/MS

Nhận xét: Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trùng với thời gian của 9 chất phân tích. Trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, các pic xuất hiện trùng thời gian lưu với mẫu trắng thêm chuẩn, các pic đều gọn, cân đối. Đặc biệt, tỷ lệ ion con định tính, định lượng của các chất chuẩn tương đương với tỷ lệ ion con định tính, định lượng của các nền mẫu thêm chuẩn, độ chênh lệch nhỏ hơn 20%. Phần mềm của hệ thống EVOQ đã so sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỉ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của nền mẫu thêm chuẩn so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) khẳng định sự có mặt của các chất phân tích trong nền mẫu. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu trên các nền mẫu NX1, NX2, NX3.

c. *Xây dựng đường chuẩn*

Từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng thành dãy chuẩn hỗn hợp các chất bằng methanol. Xây dựng đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic các chất với nồng độ các chất được thể hiện trong Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các chất nghiên cứu

Hoạt chất		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
BETA	C (ppb)	7,5	15	22,5	30	37,5	45	52,5
	S_{pic} (Counts)	280	1283	3192	4072	6137	7406	9220
	Đường chuẩn	**y = 200,05x – 1488,7; r = 0,9967**						
DEXA	C (ppb)	7,5	15	22,5	30	37,5	45	52,5
	S_{pic} (Counts)	196	527	1154	1687	2254	2789	3489
	Đường chuẩn	**y = 73,824x – 486,71; r = 0,9976**						
PREL	C (ppb)	25	50	75	100	125	150	175
	S_{pic} (Counts)	11705	25305	39750	49804	63994	77286	92856
	Đường chuẩn	**y = 530,94x – 1565,6; r = 0,9991**						
HYRO	C (ppb)	25	50	75	100	125	150	175
	S_{pic} (Counts)	496	1355	3250	4473	6123	8164	9776
	Đường chuẩn	**y = 63,33x – 1527,7; r = 0,9961**						
PREN	C (ppb)	25	50	75	100	125	150	175
	S_{pic} (Counts)	2652	5636	9846	12718	17290	20898	24591
	Đường chuẩn	**y = 148,26x – 1450,6; r = 0,9989**						
INDO	C (ppb)	25	50	75	100	125	150	175
	S_{pic} (Counts)	23187	44570	65752	89555	107697	134321	158055
	Đường chuẩn	**y = 894,36x – 416,29; r = 0,9992**						
PARA	C (ppb)	25	50	75	100	125	150	175
	S_{pic} (Counts)	11652	24023	35981	45780	56018	73982	85963
	Đường chuẩn	**y = 489,84x – 1355,6; r = 0,9969**						
PIRO	C (ppb)	5	10	15	20	25	30	35
	S_{pic} (Counts)	1579	3648	8069	11285	14310	17668	20920
	Đường chuẩn	**y = 659,31x – 2117,9; r = 0,9984**						
KETO	C (ppb)	25	50	75	100	125	150	175
	S_{pic} (Counts)	17506	44933	72013	93243	119033	143644	171338
	Đường chuẩn	**y = 1008,5x – 6318,3; r = 0,9996**						

Nhận xét: Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic (r > 0,995) trong khoảng nồng độ.

d. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Xác định LOD và LOQ của phương pháp bằng cách phân tích các chất ở nồng độ thấp và xác định giá trị tỷ số tín hiệu/nhiễu (S/N). LOD được xác định tại nồng độ có S/N khoảng bằng 3 và LOQ được xác định ở nồng độ có S/N khoảng bằng 10 [23].

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp của 5 chất phân tích có nồng độ chính xác khoảng 0,125; 0,25; 0,50; 1,0; 1,50; 2,0; 2,5 µg/ml.

Thêm vào bột nền mẫu placebo 1,00 g nền NX1 và NX3; 1,20 g nền NX2 chính xác 1,00 ml dung dịch chuẩn đã chuẩn bị ở trên, lắc nhẹ và để khô ở nhiệt độ phòng. Tiến hành xử lý mẫu và phân tích với các điều kiện đã chọn. Kết quả xem *Bảng 3.8*:

Bảng 3.8. Kết quả LOD và LOQ trên nền mẫu của nhóm giảm đau, chống viêm

Hoạt chất	Nền nang(NX1)			Nền bột (NX2)			Nền nén (NX3)		
	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
DEXA	3,2	0,455	1,50	2,7	0,379	1,25	2,8	0,455	1,50
BETA	3,5	0,227	0,75	3,1	0,227	0,75	2,7	0,227	0,75
INDO	2,9	0,076	0,25	2,9	0,076	0,25	3,5	0,076	0,25
HYRO	2,9	0,606	2,00	2,8	0,606	2,00	3,8	0,606	2,00
PIRO	3,1	0,076	0,25	3,3	0,152	0,50	3,6	0,152	0,50
KETO	3,2	0,152	0,50	3,1	0,152	0,50	2,9	0,152	0,50
PARA	2,8	0,455	1,50	3,6	0,530	1,75	2,8	0,379	1,25
PREL	3,0	0,303	1,00	3,3	0,303	1,00	3,6	0,303	1,00
PREN	3,3	0,227	0,75	3,2	0,227	0,75	3,5	0,227	0,75

Nhận xét: Kết quả cho thấy LOD và LOQ nhỏ hơn nồng độ nhỏ nhất trong đường tuyến tính đã xây dựng.

e. Độ đúng và độ chính xác

Tiến hành trên 3 nền mẫu. Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp của 5 chất phân tích ở 3 mức nồng độ:

Mức nồng độ thấp: Dung dịch có nồng độ mỗi chất PARA, INDO, KETO, HYRO, PREL và PREN là 62,5 µg/ml; PIRO là 12,5 µg/ml; DEXA và BETA là 18,75 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là PARA, INDO, KETO, HYRO, PREL và PREN 50 ng/ml; PIRO 10 ng/ml; DEXA và BETA 15 ng/ml.

Mức nồng độ trung bình: Dung dịch có nồng độ mỗi chất PARA, INDO, KETO, HYRO, PREL và PREN là 125 µg/ml; PIRO là 25 µg/ml; DEXA và BETA là 37,5 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là PARA,

INDO, KETO, HYRO, PREL và PREN 100 ng/ml; PIRO 20 ng/ml; DEXA và BETA là 30 ng/ml.

Mức nồng độ cao: Dung dịch có nồng độ PARA, INDO, KETO, HYRO, PREL và PREN là 187,5 μg/ml; PIRO là 37,5 μg/ml; DEXA và BETA là 56,25 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là PARA, INDO, KETO, HYRO, PREL và PREN 150 ng/ml; PIRO 30 ng/ml; DEXA và BETA là 35 ng/ml.

Sau khi cho dung dịch chuẩn, lắc nhẹ và để khô ở nhiệt độ phòng. Tiến hành xử lý mẫu như quy trình đã xây dựng và phân tích bằng LC-MS/MS. Ở mỗi mức nồng độ tiến hành lặp lại 7 lần, tiến hành song song. Độ đúng và độ lặp lại khác ngày được tiến hành tương tự như vào một ngày khác. Kết quả thu được ở Bảng 3.9, 3.10,3.11.

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm đau, chống viêm trên NX1

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	Ngày 1			Khác ngày		
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (%)	RSD (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (%)	RSD (%)
DEXA	15,2	15,1	99,7	5,1	15,2	100,1	3,1
	30,4	29,9	98,8	4,1	29,3	96,4	4,5
	45,5	42,9	94,4	2,5	45,1	99,1	3,3
BETA	14,9	14,3	95,7	2,2	15,2	101,6	3,4
	29,9	29,1	97,1	3,4	28,9	96,5	3,9
	44,9	44,3	98,6	2,6	44,8	99,7	2,8
INDO	50,1	45,7	91,3	3,7	50,6	101,1	4,5
	100,2	99,8	99,6	4,1	102,0	101,8	4,6
	150,3	153,2	101,9	4,7	146,1	97,2	6,1
HYRO	50,1	49,7	99,2	4,2	102,8	102,8	3,4
	100,2	94,9	94,8	2,7	95,2	95,2	3,1
	150,2	145,4	96,8	2,0	102,7	102,7	4,0
PIRO	9,9	9,3	93,6	4,9	10,2	102,5	5,1
	19,9	18,7	93,9	3,3	18,5	92,6	3,3
	29,9	30,5	101,9	4,7	30,3	101,3	5,0
KETO	49,9	48,4	96,8	4,7	49,9	99,8	3,2
	99,9	97,1	97,2	3,6	95,4	95,4	3,9
	149,9	152,4	101,6	4,2	152,6	101,5	5,0
PARA	50,0	50,1	100,1	5,9	51,2	102,3	6,1
	100,1	98,5	98,4	3,14	102,7	102,6	4,7
	150,1	152,9	101,9	2,77	152,9	101,8	3,3
PREL	50,6	48,9	96,8	3,5	49,7	98,3	5,1
	101,1	93,1	92,1	2,4	97,5	96,5	4,3
	151,7	147,0	96,9	2,4	154,6	101,9	3,3
PREN	49,9	50,6	101,4	2,4	50,9	102,0	4,1
	99,8	99,5	99,7	4,1	96,3	96,5	5,1
	149,7	150,2	100,3	2,7	152,4	101,8	3,9

**: lượng chuẩn trong 1 ml mẫu phân tích.*

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm đau, chống viêm trên NX2

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	Trong ngày			Khác ngày		
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (%)	RSD (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (%)	RSD (%)
DEXA	15,1	14,8	98,3	4,8	15,0	99,6	4,9
	30,2	29,8	98,7	3,9	29,5	97,7	3,6
	45,3	43,6	96,2	3,3	44,8	98,9	4,2
BETA	15,1	14,5	96,1	3,4	15,2	100,4	2,8
	30,2	29,3	97,1	3,2	29,8	98,7	3,4
	45,3	45,1	99,6	2,7	44,6	98,4	2,1
INDO	49,9	46,3	92,6	4,1	50,1	100,3	3,5
	99,9	98,9	98,9	2,9	101,6	101,7	2,6
	149,9	148,6	99,1	4,7	147,2	98,2	4,0
HYRO	50,1	50,7	101,1	2,5	50,7	101,1	3,9
	100,3	95,4	95,1	2,8	99,9	99,6	2,5
	150,4	147,8	98,3	4,4	151,9	100,9	2,6
PIRO	10,1	9,6	94,9	5,1	10,1	100,1	2,9
	20,2	19,2	95,0	4,9	19,4	95,8	4,6
	30,3	30,2	99,6	5,3	30,7	101,1	2,2
KETO	50,1	48,0	95,8	3,9	49,3	98,4	3,3
	100,2	97,4	97,2	3,3	96,2	96,1	3,6
	150,3	150,8	100,4	2,6	150,7	100,1	2,9
PARA	49,9	49,7	99,5	4,1	50,1	100,4	2,4
	99,8	98,2	98,4	4,1	99,7	99,9	3,6
	149,7	148,9	99,5	2,2	150,3	100,4	2,1
PREL	50,9	49,3	96,8	5,1	150,3	97,0	3,5
	101,8	99,3	97,5	2,9	49,4	97,1	3,0
	152,7	147,5	96,6	2,9	98,9	100,8	2,4
PREN	49,9	49,9	100,2	2,0	50,4	101,1	2,6
	99,8	98,9	99,2	4,1	97,8	98,0	5,8
	149,7	149,1	99,6	3,7	152,9	102,2	2,9

**: lượng chuẩn trong 1 ml mẫu phân tích.*

Bảng 3.11. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm đau, chống viêm trên nền nén

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	Trong ngày			Khác ngày		
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (%)	RSD (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (%)	RSD (%)
DEXA	14,9	14,8	98,9	4,8	14,8	98,9	3,9
	29,9	30,2	100,7	3,1	29,9	99,9	4,6
	44,9	43,5	96,6	2,3	44,1	98,1	2,4
BETA	15,0	14,6	97,3	3,3	14,9	99,1	2,4
	30,1	29,5	98,2	2,8	29,5	97,9	2,7
	45,1	44,7	98,9	2,9	44,2	97,8	2,2
INDO	50,1	50,4	100,6	3,6	50,8	101,4	3,6

	100,2	100,5	100,3	2,6	101,9	101,7	2,3
	150,3	149,5	99,5	2,1	149,9	99,8	4,9
HYRO	50,4	50,7	100,5	3,2	50,8	100,8	3,1
	100,9	100,5	99,6	2,3	100,9	100,0	2,6
	151,3	1505	99,5	2,6	152,6	100,9	2,2
PIRO	9,9	10,0	100,5	2,6	10,0	100,3	2,9
	19,9	20,5	102,4	5,2	20,2	101,1	4,9
	29,9	30,1	100,5	2,6	30,7	102,3	3,0
KETO	50,1	47,9	95,7	4,0	49,6	98,9	3,2
	100,2	97,4	97,2	3,3	96,4	96,2	3,1
	150,3	154,5	102,8	3,5	150,2	99,9	2,1
PARA	50,1	50,4	100,7	4,2	50,4	100,6	3,2
	100,2	99,4	99,2	3,2	101,4	101,2	2,4
	150,3	151,4	100,7	2,5	149,8	99,7	2,5
PREL	49,9	48,7	97,7	4,6	48,6	97,5	4,2
	99,8	92,6	92,8	2,3	97,3	97,5	3,1
	149,7	147,1	98,3	3,1	151,5	101,2	2,4
PREN	50,1	49,2	98,3	3,8	50,6	101,0	2,4
	100,2	98,7	98,5	4,3	98,6	98,5	3,4
	150,3	149,6	99,6	3,6	151,7	100,9	4,2

**: lượng chuẩn trong 1 ml mẫu phân tích.*

Nhận xét: Kết quả từ Bảng 3.9, Bảng 3.10, Bảng 3.11 cho thấy trên cả 3 nền NX1, NX2 và NX3, phương pháp đã xây dựng cho độ thu hồi và độ lặp lại đáp ứng theo hướng dẫn của AOAC 2016 là với mức nồng độ 100 ppm - <0,1%, độ thu hồi 90-107%, độ lặp lại có RSD < 5,3%; với mức nồng độ 10 ppm - <100 ppm, độ thu hồi 80-110%, độ lặp lại có RSD < 7,3%.

Như vậy, quy trình đã xây dựng có LOD thấp (từ 0,076 đến 0,606 ng/ml tính trên dịch phân tích) ở cả 3 nền, các chất nghiên cứu có tương quan chặt chẽ giữa tín hiệu thu được và nồng độ chất phân tích (r > 0,995), độ đặc hiệu, độ chính xác và độ thu hồi đáp ứng yêu cầu AOAC 2016.

3.1.2. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số thuốc nhóm giảm glucose máu trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

Chuẩn bị các dung dịch

- Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 25 mg mỗi chất phân tích (GLIB, GLIC, GLIP, GLIM) cho vào từng bình định mức 25 ml, hòa tan vừa đủ thể tích bằng MeOH thu được dung dịch chuẩn của mỗi chất phân tích có nồng độ chính xác khoảng 1mg/ml. Bảo quản ở 2 – 8^{o}C, dùng trong 30 ngày.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp (10 µg/ml): Lấy chính xác 1 ml dung dịch chuẩn gốc của mỗi chất, cho vào 1 bình định mức 100 ml, thêm MeOH vừa đủ thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa 5 chất nồng độ mỗi chất chính xác khoảng 10 µg/ml.

3.1.2.1. Khảo sát điều kiện khối phổ và sắc ký

a. . Điều kiện khối phổ

Từ dung dịch chuẩn hỗn hợp 10 µg/ml, tiến hành pha loãng chính xác 5 lần bằng MeOH thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 2 µg/ml. Tiêm dung dịch này vào hệ thống LC-MS/MS với hệ dung môi acetonitril - 0,1% acid formic /nước (1 : 1) để xác định ion mẹ và hai ion con đối với mỗi chất phân tích. Để phát hiện được đúng chất phân tích, việc lựa chọn được ion con là rất quan trọng. Để thu được mảnh ion con có tín hiệu cao cần phải chọn được mức năng lượng bắn phá thích hợp. Dùng ion con có tín hiệu lớn và ổn định hơn làm ion định lượng, ion con còn lại dùng để định tính. Kết quả khảo sát các điều kiện của nguồn ion hóa theo *Bảng 3.1* và điều kiện phân mảnh được trình bày trong bảng 3.12 sau :

Bảng 3.12. Các điều kiện khối phổ để phân mảnh nhóm giảm glucose máu

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con	CE (EV)	Tỷ lệ (%)
GLIB	494,1	**368,9**	9	63,27
		169,0	28	36,73
GLIC	324,1	**127,2**	14	52,08
		110,2	19	47,92
GLIM	491,1	**352,0**	10	69,11
		126,2	25	30,89
GLIP	446,2	**321,0**	20	78,94
		167,0	25	21,06

Nhận xét: Phương pháp đã đáp ứng được yêu cầu của Châu Âu 2002/657/EC. Chọn mảnh ion con có cường độ lớn nhất (in đậm) dùng để định lượng, mảnh con thứ 2 có cường độ thấp hơn dùng để xác nhận chất phân tích.

b. . Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Để khảo sát điều kiện sắc ký, từ dung dịch chuẩn hỗn hợp 10 µg/ml, hút chính xác 1 ml cho vào bình định mức 10 ml, thêm MeOH vừa đủ thể tích thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp 4 chất phân tích nồng độ 1µg/ml. Tiến hành tiêm 2 µl dung dịch này vào hệ thống sắc ký và khảo sát với các thông số khác như sau:

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm)

- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút

- Các điều kiện khối phổ theo và 4.

Với kênh A: Acid formic 0,1% trong nước;

kênh B: Acid formic 0,1% trong Acetonitril.

Chương trình pha động khảo sát :

- *Chế độ đẳng dòng :* A: B = 50: 50; A: B = 60: 40

- *Chế độ gradient*

Bảng 3.13. Điều kiện khảo sát pha động theo gradient nhóm giảm glucose máu

Thời gian (phút)	**Gradient 1**		**Thời gian (phút)**	**Gradient 2**	
	Kênh A	***Kênh B***		***Kênh A***	***Kênh B***
0– 7	70→ 30	30→ 70	0– 0,5	90	10
7– 8,5	30→ 70	70→ 30	0,5- 7	90→ 5	10→ 95
8,5– 12	70→ 70	30→ 30	7- 9	5	95
			9- 12	5→ 10	95→ 90

Kết quả cho thấy:

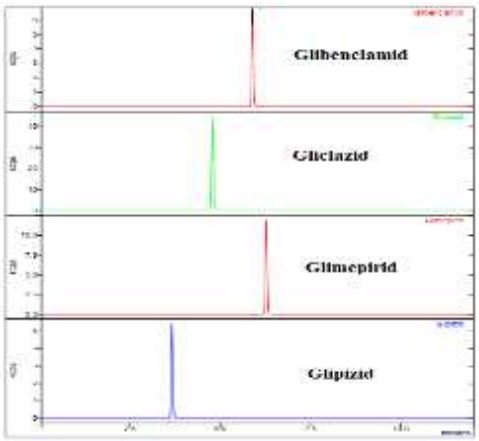
- Với chế độ đẳng dòng A – B = 50:50 : Pic gọn, sắc nét. Tuy nhiên trong quá trình chạy thời gian lưu các chất ra quá sớm (0,2 phút).

- Với chế độ đẳng dòng A – B = 60:40: thời gian phân tích dài, ở thời điểm 9 phút pic GLIB và GLIM vẫn chưa xuất hiện.

- Với chế độ gradient 2: trên sắc ký đồ của GLIB và GLIM xuất hiện pic phụ.

- Chế độ gradient 1: các pic tách nhau rõ ràng, pic gọn, sắc nét, tín hiệu cao hơn ở 3 chế độ trên, thời gian phân tích 12 phút.

=> Vì vậy chúng tôi chọn chế độ gradient 1 để tiếp tục tiến hành nghiên cứu.



Hình 3.7 Sắc ký đồ pha động nhóm giảm glucose máu bằng LC-MS/MS

❖ ***Thể tích tiêm***

Thể tích tiêm mẫu quyết định lượng mẫu được đưa vào cột. Vì vậy, cần chọn thể tích tiêm mẫu phù hợp để thu được các pic cân xứng và có giới hạn phát hiện phù hợp. Khảo sát thể tích tiêm 2 µl, chúng tôi thấy trên sắc ký đồ pic nhọn, gọn, tín hiệu tốt. Hơn nữa, nền đông dược có thành phần rất phức tạp, để giảm thiểu tạp đi vào cột gây giảm hiệu lực cột và nhiễu nền cao, chọn thể tích tiêm 2 µl.

3.1.2.2. Khảo sát và lựa chọn điều kiện xử lý mẫu

Dựa vào điều kiện tham khảo trong các công bố và kết quả khảo sát, lựa chọn các hệ dung môi như methanol (QT2.1), methanol-nước (20:5) (QT2.2), ethanol (QT2.3), acetonitril (QT2.4) làm dung môi chiết. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích GLIP, GLIM, GLIB là 25 µg/ml; GLIC là 200 µg/ml trong methanol. Chuẩn bị mẫu: Cân 1 lượng nền mẫu 0,50 g nền ND1 và ND3; 1,50 g nền ND2. Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp. Lắc nhẹ. Để khô ở điều kiện phòng. Sau đó, tiến hành chiết với các dung môi khác nhau theo quy trình dự kiến ở phần phương pháp và phân tích trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả hiệu suất chiết của các chất nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.14.

Bảng 3.14. Khảo sát hiệu suất chiết nhóm giảm glucose máu bằng LC-MS/MS

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	QT2.1		QT2.2		QT2.3		QT2.4	
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)
Nền nang									
GLIP	20,0	19,8	99,0	18,2	91,0	18,2	91,0	9,8	49,0
GLIM	20,2	19,8	98,0	18,4	91,0	18,2	90,0	9,5	47,0
GLIB	20,2	19,8	98,0	18,2	90,0	18,2	90,0	7,7	38,0
GLIC	160,0	155,2	97,0	136,0	85,0	112,0	70,0	32,0	20,0
Nền hoàn									
GLIP	20,0	19,6	98,0	19,2	96,0	14,4	72,0	7,0	35,0
GLIM	20,0	19,6	98,0	18,4	92,0	13,4	67,0	12,6	63,0
GLIB	20,0	19,4	97,0	18,0	90,0	17,8	89,0	8,2	41,0
GLIC	160,0	153,6	96,0	132,8	83,0	94,4	59,0	30,4	19,0
Nền Nén									
GLIP	20,0	19,8	99,0	18,8	94,0	18,8	94,0	10,2	51,0
GLIM	20,0	19,4	97,0	18,6	93,0	18,4	92,0	9,0	45,0
GLIB	20,0	19,4	97,0	19,2	96,0	18,6	93,0	7,0	35,0
GLIC	160,0	152,0	95,0	147,2	92,0	78,4	49,0	32,0	20,0

Nhận xét: Kết quả ở Bảng 3.14 cho thấy: Đối với cả 3 dạng nền mẫu placebo gồm viên nang, viên hoàn và cao thuốc thì khi sử dụng dung môi chiết là methanol sẽ cho hiệu suất chiết cao nhất. Do đó, nghiên cứu lựa chọn dung môi methanol để chiết đồng thời 3 chất phân tích từ chế phẩm đông dược.

Từ kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện phân tích như sau:

a. Xử lý mẫu

Cân lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Pha loãng lớp dịch trong phía trên 50 lần bằng methanol. Lọc qua màng lọc 0,22 µm.

b. Lựa chọn điều kiện chạy LC-MS như sau:

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ)
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ)
- Nhiệt độ buồng cột: 40^{o}C
- Thể tích tiêm mẫu: 2 µl
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Thời gian phân tích: 12 phút
- Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1%/H_2O
  Kênh B: HCOOH 0,1%/ACN
- Chương trình pha động: Chế độ gradient 1 (Bảng 3.13) giống chế độ của nhóm giảm đau, chống viêm.
- Các điều kiện khối phổ theo Bảng 3.1 và Bảng 3.12, cụ thể ở Phụ lục 5.2.

3.1.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích

a. Độ phù hợp của hệ thống

Từ các dung dịch đơn chất, tiến hành pha loãng bằng methanol thu dung dịch chuẩn 4 chất phân tích với gliclazid 160 ng/ml; glibenclamid, glimepirid và glipizid đều 20 ng/ml. Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch này vào hệ thống LC-MS/MS, đánh giá độ biến thiên của diện tích pic và thời gian lưu. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.15.

Nhận xét: Kết quả cho thấy hệ số biến thiên RSD của thời gian lưu rất thấp, dao động

từ 0,2 -0,4% và RSD của diện tích pic dao động từ 1,9-3,3%. Như vậy hệ thống đáp ứng yêu cầu phân tích.

Bảng 3.15. Kết quả đánh giá độ phù hợp của nhóm giảm glucose máu trên LC-MS

Thông số		***GLIP***	***GLIC***	***GLIB***	***GLIM***
Thời gian lưu	***TB***	3,595	4,691	5,792	6,182
	RSD(%)	0,4	**0,3**	**0,20**	**0,20**
Diện tích pic	***TB***	10479	66437	8334	19290
	RSD(%)	2,9	2,6	1,9	3,3

b. Độ đặc hiệu

Theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) phương pháp đạt yêu cầu khi có ít nhất 4 điểm IP. Ở phương pháp LC-MS này, khi tiến hành phân tích, phải có 1 ion mẹ và 2 ion con với mỗi chất. Như vậy, phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu có 1 ion mẹ và 2 ion con định tính và định lượng. Sử dụng phần mềm so sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỉ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của mẫu thử so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) hoặc nghi ngờ (fail) sự có mặt của các chất phân tích trong mẫu thử.

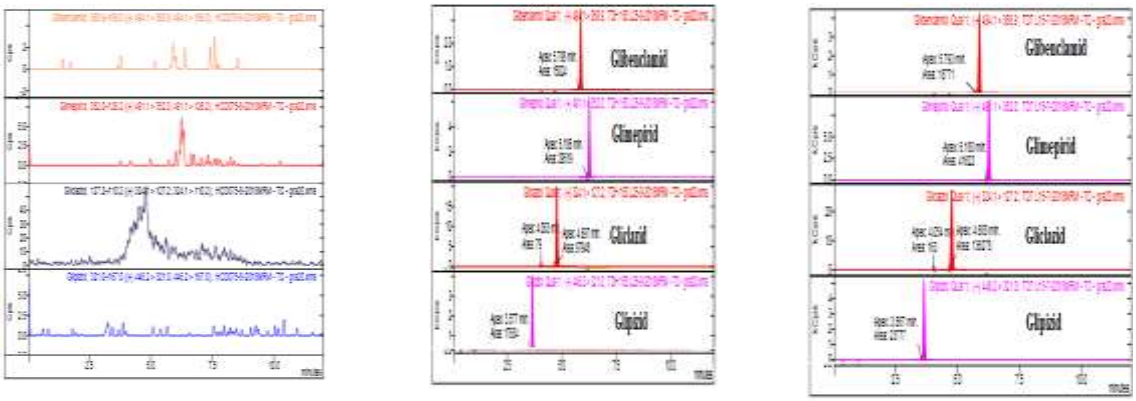
Chuẩn bị mẫu nền, mẫu nền thêm chuẩn và mẫu chuẩn như sau:

- Mẫu nền: Xử lý mẫu nền theo quy trình xử lí mẫu.
- Mẫu chuẩn: Mẫu hỗn hợp chuẩn của GLIP, GLIM, GLIB là 20 ng/ml; GLIC là 160 ng/ml trong methanol.
- Mẫu nền tự tạo có thêm hỗn hợp chuẩn của 4 chất phân tích có nồng độ tương đương nồng độ của mỗi chất trong mẫu hỗn hợp chuẩn.

Phân tích đồng thời 3 mẫu trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả được trình bày ở Hình 3.8, Hình 3.9, Hình 3.10.

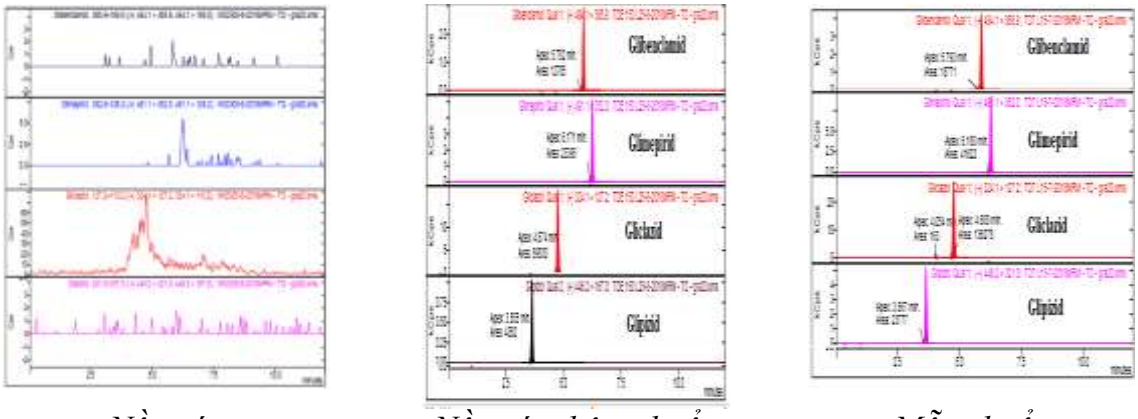
Nhận xét: Trên sắc ký đồ mẫu trắng (nền hoàn, nang, nén) không xuất hiện pic trùng với thời gian lưu của các chất phân tích. Trên sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn, các pic xuất hiện trùng với thời gian lưu của chuẩn, các pic đều có hình dạng cân đối, sắc nét. Đặc biệt, tỷ lệ ion con định tính, định lượng của các chất chuẩn tương đương với tỷ lệ ion con định tính, định lượng của các nền mẫu thêm chuẩn, độ chênh lệch nhỏ hơn 20%. Phần mềm của hệ thống EVOQ đã so sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỉ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của nền mẫu thêm

chuẩn so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) khẳng định sự có mặt của các chất phân tích trong nền mẫu. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu.



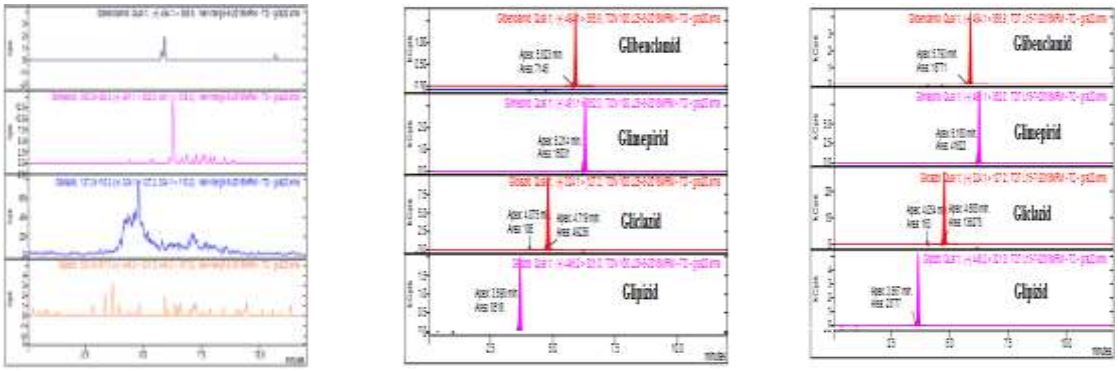
Nền hoàn *Nền hoàn thêm chuẩn* *Mẫu chuẩn*

Hình 3.8. Sắc ký đồ của giảm glucose máu trên nền hoàn ND3 bằng LC-MS/MS



Nền nén *Nền nén thêm chuẩn* *Mẫu chuẩn*

Hình 3.9. Sắc ký đồ của giảm glucose máu trên nền nén ND1 bằng LC-MS/MS



Nền nang *Nền nang thêm chuẩn* *Mẫu chuẩn*

Hình 3.10. Sắc ký đồ của giảm glucose máu trên nền nang ND2 bằng LC-MS/MS

c. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích có tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 3 lần tín hiệu nhiễu đường nền (S/N khoảng 3), giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ thấp nhất hệ thống phân tích còn có thể định lượng được và có tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 10 lần tín hiệu nhiễu đường nền (S/N khoảng 10). Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp của 4 chất phân tích có nồng độ chính xác khoảng 0,375; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 0,5 µg/ml. Thêm vào bột nền mẫu placebo 0,50 g nền ND1 và ND3; 1,50 g nền ND2 chính xác 1,00 ml dung dịch chuẩn đã chuẩn bị ở trên rồi tiến hành xử lý mẫu và phân tích với các điều kiện đã chọn. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.16.

Bảng 3.16. Kết quả xác định LOD và LOQ nhóm giảm glucose máu

Hoạt chất	Nền nang ND2			Nền hoàn ND3			Nền nén ND1		
	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	S/N (LOD)	LOD ng/ml)	LOQ (ng/ml)
GLIB	3,4	0,3	1,0	2,8	0,4	1,2	3,1	0,3	1,0
GLIC	3,3	0,3	1,0	3,0	0,4	1,2	3,2	0,3	1,0
GLIM	2,9	0,3	1,0	3,2	0,4	1,2	2,8	0,3	1,0
GLIP	3,5	0,3	1,0	3,1	0,4	1,2	3,8	0,3	1,0

d. Xây dựng đường chuẩn

Từ dung dịch chuẩn hỗn hợp nồng độ 10 µg/ml (chuẩn bị như mục 2.1.1), tiến hành chuẩn bị dãy chuẩn làm việc: các dung dịch chuẩn hỗn hợp 5 chất trong đó glibenclamid, glimerpirid, glipizid có nồng độ từ 5-35 ng/ml trong MeOH; gliclazid có nồng độ từ 40-280 ng/ml. Xây dựng đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa tỷ lệ diện tích pic và nồng độ của các chất phân tích. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả xây dựng đường chuẩn nhóm giảm glucose máu của phương pháp LC-MS/MS

Hoạt chất		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
GLIB	Nồng độ (ppb)	5	10	15	20	25	30	35
	S pic (counts)	2709	5915	8230	10914	14562	16963	18771
	Đường chuẩn	**y = 547,24x +207,14; r =0,9973**						
GLIP	Nồng độ (ppb)	5	10	15	20	25	30	35
	S pic (counts)	3440	8252	10601	13873	17682	21324	24324
	Đường chuẩn	**y = 684,84x +517; r = 0,9980**						
GLIM	Nồng độ (ppb)	5	10	15	20	25	30	35
	S pic (counts)	2280	8015	13750	19486	25221	30957	36692

	Đường chuẩn	**y = 1147,1x -3455,7; r = 0,9965**						
GLIC	Nồng độ (ppb)	40	80	120	160	200	240	280
	S pic (counts)	14472	29220	55655	66866	86313	99598	115218
	Đường chuẩn	**y =422,9x-901,43,6; r=0,9960**						

Nhận xét: Các đường tuyến tính đều có hệ số tương quan r > 0,995 trong khoảng nồng độ khảo sát. Như vậy, có sự phụ thuộc tuyến tính giữa tỷ lệ diện tích pic vào nồng độ chất phân tích. Do đó, có thể tính kết quả trong mẫu thử dựa vào phương trình hồi quy.

e. Độ đúng và độ chính xác

Tiến hành trên 3 nền mẫu. Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp của 4 chất phân tích ở 3 mức nồng độ:

- Mức nồng độ thấp: Dung dịch có nồng độ mỗi chất GLIP, GLIM, GLIB là 12,5 µg/ml; GLIC là 100 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là GLIP, GLIM, GLIB 10 ng/ml; GLIC 80 ng/ml;

- Mức nồng độ trung bình: : Dung dịch có nồng độ mỗi chất GLIP, GLIM, GLIB là 25 µg/ml; GLIC là 200 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là GLIP, GLIM, GLIB 20 ng/ml; GLIC 160 ng/ml;

- Mức nồng độ cao: : Dung dịch có nồng độ mỗi chất GLIP, GLIM, GLIB là 37,5 µg/ml; GLIC là 300 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là GLIP, GLIM, GLIB 30 ng/ml; GLIC 240 ng/ml.

Sau khi cho dung dịch chuẩn, lắc nhẹ và để khô ở nhiệt độ phòng. Tiến hành xử lý mẫu như quy trình đã xây dựng và phân tích bằng LC-MS/MS.

Ở mỗi mức nồng độ tiến hành lặp lại 7 lần, tiến hành song song.

Độ đúng và độ lặp lại khác ngày được tiến hành tương tự như trên nhưng vào một ngày khác. Kết quả thu được ở Bảng 3.18.

Nhận xét: Kết quả ở bảng trên cho thấy: độ đúng và độ lặp lại của 5 chất phân tích có hệ số biến thiên RSD dao động trong khoảng 1,3%- 4,1% với độ tìm lại 95,4 – 99,9% .

Bảng 3.18. Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác của nhóm giảm glucose máu phương pháp LC-MS/MS

Hoạt chất	*$m_{thêm\ vào}$ (µg)	Trong ngày			Khác ngày		
		$m_{tìm\ lại}$ (µg)	Độ đúng (%)	RSD (%)	$m_{tìm\ lại}$ (µg)	Độ đúng (%)	RSD (%)
Nền viên nén ND1							
GLIP	10,0	9,7	99,0	1,3	9,8	98,5	1,4
	20,0	19,8	99,0	2,1	19,8	98,2	2,8
	30,0	29,7	99,1	1,9	29,1	98,1	1,6
GLIM	10,0	98	97,5	1,5	9,8	98,3	1,4
	20,0	19,8	99,0	2,2	19,6	97,9	2,1
	30,0	29,5	98,2	3,1	29,2	97,2	3,2
GLIB	9,9	9,7	98,2	1,6	9,6	97,2	1,5
	19,8	19,4	97,7	1,9	19,8	99,9	1,8
	29,7	28,3	97,3	2,2	29,1	98,0	2,0
GLIC	79,8	77,4	97,0	3,4	77,8	97,4	3,3
	159,6	155,6	97,5	4,1	155,0	97,0	3,7
	239,4	231,7	96,8	3,4	232,7	97,1	3,1
Nền viên nang ND2							
GLIP	9,9	9,7	98,0	1,4	9,8	98,5	1,4
	19,8	19,8	99,0	2,3	19,4	98,2	2,8
	29,7	29,3	99,8	1,9	29,1	98,1	1,6
GLIM	10,0	9,8	97,5	1,5	9,8	98,3	2,1
	20,0	19,7	98,7	2,2	19,6	97,9	3,2
	30,0	29,3	97,6	3,4	29,2	97,2	3,2
GLIB	10,0	9,8	98,0	1,6	9,6	97,2	1,5
	20,0	19,7	98,4	2,0	19,8	99,9	1,8
	30,0	29,1	97,1	2,3	29,1	98,0	2,0
GLIC	79,9	77,7	97,2	3,3	77,8	97,4	3,3
	159,8	155,5	97,3	4,1	155,0	97,0	3,7
	239,7	230,8	96,3	4,1	231,2	97,1	3,1
Nền hoàn ND3							
GLIP	10,0	9,6	96,3	1,3	9,6	97,3	1,3
	20,0	19,8	98,9	2,4	19,7	99,7	2,4
	30,0	29,3	97,8	2,1	29,3	98,8	2,1
GLIM	10,1	9,7	96,3	1,4	9,9	98,0	1,2
	20,2	19,6	97,2	2,0	20,2	97,4	2,0
	30,3	19,0	95,6	2,3	28,9	95,4	2,2
GLIB	10,1	9,7	96,3	1,4	9,7	96,0	1,4
	20,2	19,5	96,7	1,8	19,6	97,1	1,7

	30,3	29,1	96,0	1,7	29,2	96,3	1,5
GLIC	80,0	77,2	96,5	2,6	77,5	96,9	2,6
	160,0	155,2	97,0	3,7	155,5	97,2	3,9
	240,0	230,6	96,1	4,0	230,6	96,1	4,0

**: lượng chuẩn trong 1ml mẫu phân tích*

Như vậy, quy trình đã xây dựng có LOD thấp (từ 0,3 đến 0,4 ng/ml tính trên dịch phân tích) ở cả 3 nền, các chất nghiên cứu có tương quan chặt chẽ giữa tín hiệu thu được và nồng độ chất phân tích (r > 0,995), độ đặc hiệu, độ chính xác và độ thu hồi đáp ứng yêu cầu AOAC 2016.

3.1.3. Xây dựng quy trình định tính, định lượng một số thuốc nhóm ức chế PDE-5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc đơn (1 mg/ml): Cân chính xác khoảng 10 mg mỗi chất sildenafil, tadalafil, vardenafil cho vào các bình định mức 10 ml, hòa tan bằng dung môi methanol thu được dung dịch chuẩn đơn mỗi chất nồng độ chính xác khoảng 1 mg/ml. Từ đó, pha thành dung dịch chuẩn đơn (1000 ng/ml).

3.1.3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện khối phổ

a. Khảo sát điều kiện khối phổ

Sử dụng các dung dịch chuẩn đơn nồng độ 1000 ng/ml tiêm không qua cột vào hệ thống MS để xác định ion mẹ và các ion con. Các điều kiện phân mảnh ion, năng lượng bắn phá phân mảnh (CE) được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ. Từ kết quả tối ưu hóa, lựa chọn 2 ion con có tín hiệu lớn, trong đó ion con có tín hiệu lớn và ổn định hơn làm ion định lượng, ion con còn lại dùng để định tính. Điều kiện khối phổ lựa chọn theo Bảng 3.1 và phổ đồ được trình bày trong Bảng 3.19.

Bảng 3.19. Điều kiện khối phổ của nhóm ức chế PDE-5

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	CE (eV)	Tỷ lệ (%)
SIL	475,2	100,3	24	76,3
		283,0	35	23,7
VAR	489,2	151,1	40	86,4
		312,0	37	13,6
TAD	390,0	268,0	11	75,6
		169,0	34	24,4

Nhận xét: Các điều kiện ion hóa và điều kiện phân mảnh đã xác định được điều kiện MS/MS để phân tích các hoạt chất nghiên cứu theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC).

b. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Dựa trên các tài liệu tham khảo đã tổng hợp cùng với điều kiện trang thiết bị phòng thí nghiệm, cố định một số thông số chạy sắc ký sau:

- Thể tích tiêm: 2 µl.
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ).
- Cột Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ).
- Nhiệt độ cột: 40^{o}C.

Tiêm vào hệ thống sắc ký hỗn hợp 3 chất nghiên cứu nồng độ 1000 ng/ml và khảo sát các thông số khác:

Pha động

Pha động trong sắc ký lỏng khối phổ được sử dụng với hai mục đích: tách các chất trong hỗn hợp và tác động vào quá trình ion hóa của các chất phân tích.

❖ Khảo sát thành phần pha động

Trong kỹ thuật ESI (+), các acid/muối (acid formic, acid acetic, amoni format...) có vai trò cung cấp proton thường được thêm vào pha động để tăng khả năng ion hóa các chất phân tích. Qua tham khảo 1 số nghiên cứu trước đây, tiến hành khảo sát chuẩn hỗn hợp 100 ng/ml với 2 pha động như sau:

MP 1: Acid formic 0,1%/H_2O (A) và ACN (B)

MP 2: Acid formic 0,1%/H_2O (A) và acid formic 0,1%/ACN (B)

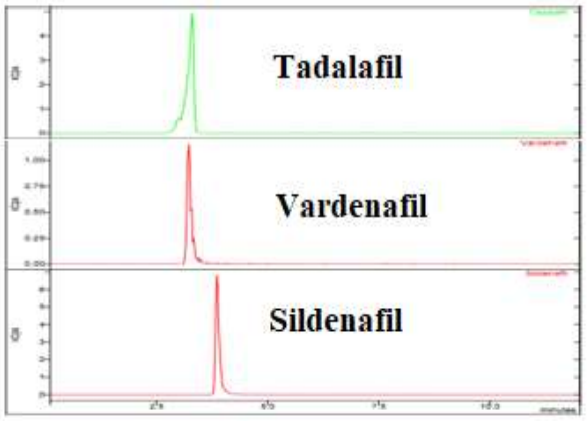
Kết quả tín hiệu của các chất thu được lớn hơn với hệ pha động MP2: acid formic 0,1%/H_2O (A) và acid formic 0,1%/ACN (B).

❖ Khảo sát tỷ lệ pha động

Sử dụng hệ pha động MP2 với kênh A: acid formic 0,1%/H_2O và kênh B: acid formic 0,1%/ACN, khảo sát chế độ pha động đẳng dòng 40:60 và các chế độ gradient. Lựa chọn chế độ gradient như sau:

Bảng 3.20. Chế độ gradient pha động phân tích nhóm ức chế PDE-5

Thời gian (phút)	0	7,0	8,5	12,0
HCOOH 0,1 % /H_2O	70	30	70	70
HCOOH 0,1 %/ /Acetonitril	30	70	30	30



Hình 3.11. Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 bằng LC-MS/MS

Thể tích tiêm

Thể tích tiêm mẫu quyết định lượng mẫu được đưa vào cột. Vì vậy, cần chọn thể tích tiêm mẫu phù hợp để thu được các pic cân xứng và có giới hạn phát hiện phù hợp. Khảo sát thể tích tiêm 2µl, chúng tôi thấy trên sắc ký đồ pic nhọn, gọn, tín hiệu tốt. Hơn nữa, nền đông dược có thành phần rất phức tạp, để giảm thiểu tạp đi vào cột gây giảm hiệu lực cột và nhiễu nền cao, chọn thể tích tiêm 2 µl.

Tốc độ dòng

Sử dụng dung dịch chuẩn hỗn hợp 3 chất nồng độ 1000 ng/ml tiêm vào hệ thống sắc ký, khảo sát với hai tốc độ dòng 0,2 ml/phút và 0,3 ml/phút. Lựa chọn tốc độ dòng 0,3 ml/phút để có sắc ký đồ cho pic có thời gian lưu phù hợp, các pic tách rõ ràng, độ rộng chân pic hẹp, cường độ tín hiệu pic phù hợp đồng thời vẫn duy trì được áp suất cột ổn định và đảm bảo độ bền của cột sắc ký.

3.1.3.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Khảo sát 4 hệ dung môi khác nhau methol (QT3.1), methanol-nước (QT3.2), methanol-nước-ammoniac (QT3.3), acetonitrile (QT3.4) để lựa chọn dung môi cho hiệu suất chiết cao nhất. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích SIL là 625 µg/ml; TAD và VAR là 125 µg/ml trong methanol.

Chuẩn bị mẫu: Cân 1 lượng nền mẫu 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp. Lắc nhẹ. Để khô ở điều kiện phòng. Sau đó, tiến hành chiết với các dung môi khác nhau theo quy trình dự kiến ở phần phương

pháp và phân tích trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả hiệu suất chiết của các chất nghiên cứu được trình bày ở

Bảng 3.21. Kết quả khảo sát hiệu suất chiết nhóm ức chế PDE-5 của phương pháp

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	QT3.1		QT3.2		QT3.3		QT3.4	
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	H (%)
Nền nang NP1									
SIL	550	545	99,1	504	91,7	519	94,3	273	49,7
TAD	104	103	98,8	100	96,5	98	94,2	49	47,3
VAR	112	111	99,1	107	95,4	104	92,8	44	38,9
Nền hoàn NP2									
SIL	550	543	98,7	531	96,5	399	72,6	524	95,2
TAD	104	103	98,6	96	92,3	70	67,6	80	76,7
VAR	112	109	97,2	101	90,6	100	89,3	46	41,4
Nền Cao NP3									
SIL	550	546	99,3	519	94,4	514	93,4	282	51,2
TAD	104	102	97,6	98	93,8	99	94,8	47	45,4
VAR	112	109	97,5	108	96,2	104	93,1	40	35,6

Nhận xét: Kết quả ở Bảng 3.21 cho thấy: Đối với cả 3 dạng nền mẫu placebo gồm viên nang, viên hoàn và cao thuốc thì khi sử dụng dung môi chiết là methanol sẽ cho hiệu suất chiết cao nhất. Do đó, nghiên cứu lựa chọn dung môi methanol để chiết đồng thời 3 chất phân tích từ chế phẩm đông dược.

Từ kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện phân tích như sau:

Xử lý mẫu

Cân lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Pha loãng lớp dịch trong phía trên 50 lần bằng methanol. Lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện chạy LC-MS

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ)
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ)
- Nhiệt độ buồng cột: 40^{o}C
- Thể tích tiêm mẫu: 2 µl
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Thời gian phân tích: 12 phút

- Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1%/H_2O
  Kênh B: HCOOH 0,1%/ACN
- Chương trình pha động: Chế độ gradient 3 theo Bảng 3.20
- Điều kiện khối phổ theo *Bảng 3.1* và Bảng 3.19, cụ thể ở Phụ lục 5.3.

3.1.3.3. Thẩm định phương pháp

a. Độ thích hợp hệ thống

Phân tích lặp lại 6 lần dung dịch hỗn hợp chuẩn 3 chất phân tích tại nồng độ sildenafil 500 ng/ml, tadalafil và vardenafil đều là 100 ng/ml trên hệ thống LC-MS/MS với các điều kiện đã lựa chọn. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống trên nhóm ức chế PDE-5

Lần	Sildenafil		Tadalafil		Vardenafil	
	t_R (phút)	Diện tích pic	t_R (phút)	Diện tích pic	t_R (phút)	Diện tích pic
1	3,850	50708	3,260	64712	3,212	8851
2	3,850	48449	3,260	61744	3,212	8809
3	3,862	48766	3,263	67308	3,214	9381
4	3,832	50708	3,272	64712	3,189	8851
5	3,834	48449	3,254	61744	3,190	8809
6	3.853	48766	3,265	67308	3,198	9381
TB	3,847	49308	3,262	64588	3,203	9014
RSD(%)	0,18	3,86	0,36	3,16	0,30	2,22

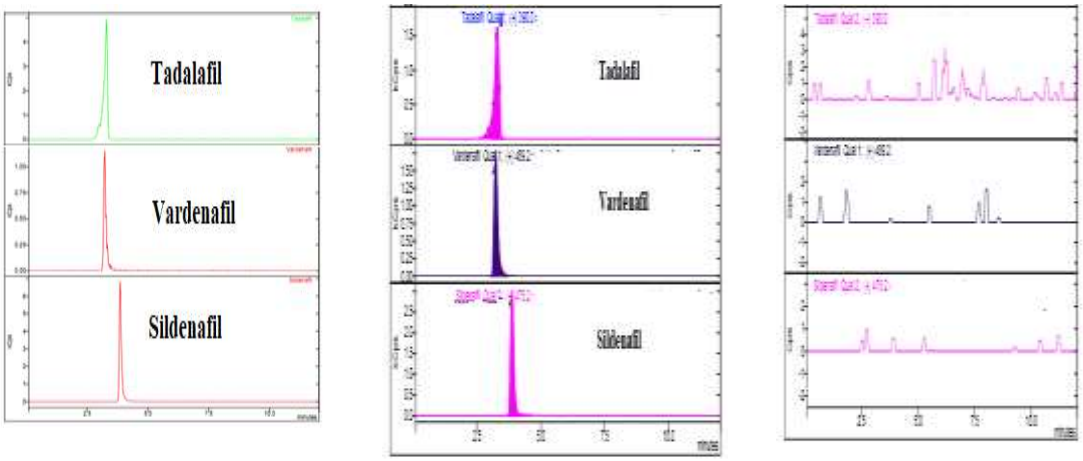
Từ các kết quả cho thấy: Diện tích pic thu được của 6 lần sắc ký lặp lại mẫu chuẩn của 3 chất phân tích có thời gian lưu t_R (RSD < 0,4%), diện tích pic (RSD <3,86%). Như vậy hệ thống LC-MS/MS đạt yêu cầu để phân tích 3 chất sildenafil, vardenafil, tadalafil trong chế phẩm đông dược.

b. Độ đặc hiệu

Theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) phương pháp đạt yêu cầu khi có ít nhất 4 điểm IP. Ở phương pháp LC-MS này, khi tiến hành phân tích, phải có 1 ion mẹ và 2 ion con với mỗi chất. Như vậy, phương pháp đã xây dựng đạt yêu cầu có 1 ion mẹ và 2 ion con định tính và định lượng.

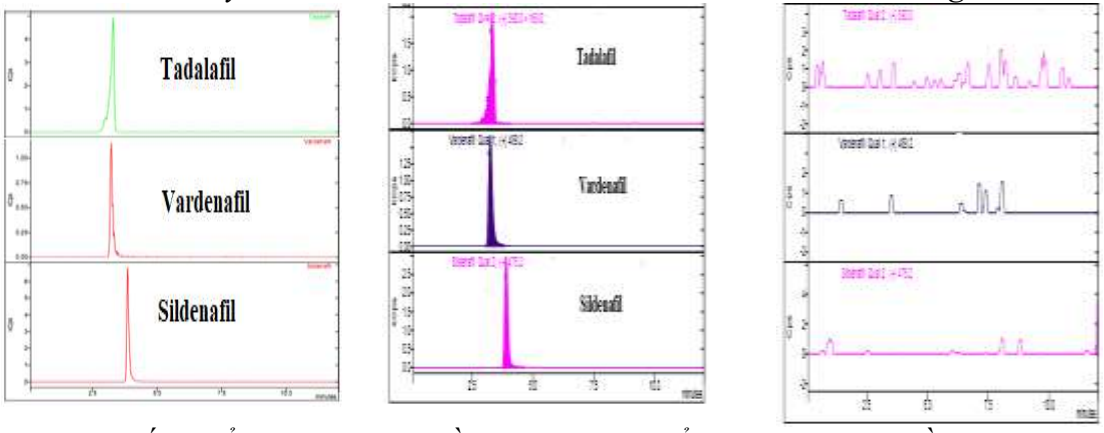
Chuẩn bị mẫu nền, mẫu nền thêm chuẩn và mẫu chuẩn như sau: Mẫu nền: Xử lý mẫu nền theo quy trình xử lí mẫu. Mẫu chuẩn: Mẫu hỗn hợp chuẩn của SIL là 500 ng/ml; VAR, TAD là 160 ng/ml trong methanol. Mẫu nền tự tạo có thêm hỗn hợp chuẩn của 3 chất phân tích có nồng độ tương đương nồng độ của mỗi chất trong

mẫu hỗn hợp chuẩn. Phân tích đồng thời 3 mẫu trên hệ thống LC-MS/MS. Kết quả trình bày ở hình sau.



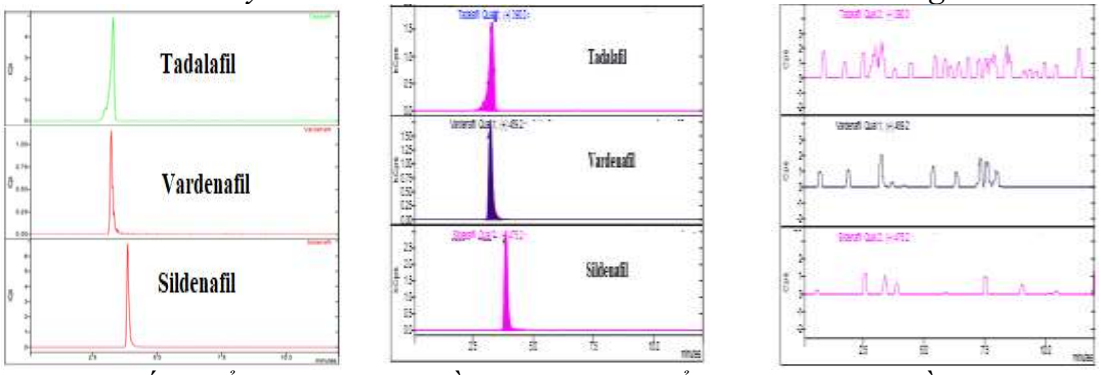
Chất chuẩn *Nền cao thêm chuẩn* *Nền cao*

Hình 3.12 Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 trên nền cao NP3 bằng LC-MS/MS



Chất chuẩn *Nền hoàn thêm chuẩn* *Nền hoàn*

Hình 3.13 Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 trên hoàn NP2 bằng LC-MS/MS



Chất chuẩn *Nền nang thêm chuẩn* *Nền nang*

Hình 3.14 Sắc ký đồ của nhóm ức chế PDE-5 trên nang NP1 bằng LC-MS/MS

Nhận xét: Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trùng với thời gian của 3 chất phân tích. Trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, các pic xuất hiện trùng thời gian lưu với mẫu trắng thêm chuẩn, các pic đều gọn, cân đối. Đặc biệt, tỷ lệ ion con định tính,

định lượng của các chất chuẩn tương đương với tỷ lệ ion con định tính, định lượng của các nền mẫu thêm chuẩn, độ chênh lệch nhỏ hơn 20%. Phần mềm của hệ thống EVOQ đã so sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỉ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của nền mẫu thêm chuẩn so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) khẳng định sự có mặt của các chất phân tích trong nền mẫu. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu trên các nền mẫu viên hoàn, viên nang, cao thuốc.

c. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Xác định LOD và LOQ của phương pháp bằng cách phân tích các chất ở nồng độ thấp và xác định giá trị tỷ số tín hiệu/nhiễu (S/N). LOD được xác định tại nồng độ có S/N khoảng bằng 3 và LOQ được xác định ở nồng độ có S/N khoảng bằng 10.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp của 4 chất phân tích có nồng độ chính xác khoảng 0,625; 1,25; 2,5; 3,75; 5 µg/ml. Thêm vào bột nền mẫu placebo 1,00 g nền NP1 và NP3; 1,20 g nền NP2 chính xác 1,00 ml dung dịch chuẩn đã chuẩn bị ở trên rồi tiến hành xử lý mẫu và phân tích với các điều kiện đã chọn. Kết quả được thể hiện ở *Bảng 3.23*.

Bảng 3.23. Kết quả xác định LOD, LOQ nhóm ức chế PDE-5 của phương pháp

Hoạt chất	Nền nang NP1			Nền hoàn NP2			Nền cao NP3		
	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	S/N (LOD)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
SIL	2,8	1,0	4,0	3,0	1,0	4,0	2,9	1,0	4,0
TAD	3,3	0,5	2,0	3,2	0,5	2,0	3,2	0,5	2,0
VAR	3,1	1,0	3,0	2,8	1,0	3,0	3,0	1,0	3,0

d. Xây dựng đường chuẩn

Tiến hành phân tích hỗn hợp chuẩn trên hệ thống LC-MS/MS. Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối quan hệ giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic tương ứng với r>0,99. Kết quả thu được Bảng 3.24, như sau:

Bảng 3.24. Kết quả đánh giá khoảng tuyến tính của nhóm ức chế PDE-5

STT	Sildenafil		Tadalafil		Vardenafil	
	C (ppb)	Diện tích pic (counts)	C (ppb)	Diện tích pic (counts)	C (ppb)	Diện tích pic (counts)
1	124,6	9031	26,5	11643	24,9	1152
2	249,2	20721	53,0	27086	49,8	3379
3	373,8	31861	79,5	46067	74,6	5896
4	498.4	50708	106,0	64712	99,5	8851

5	623,0	60408	132,5	81656	124,4	11981
6	747,6	74519	159,0	105067	149,3	16056
7	872,2	89387	185,5	120597	174,1	18818
PTHQ	y = 108,1x -5796,6		y = 698,7x -8797,9		y = 121,2x -2614,9	
r	0,9981		0,9990		0,9963	

e. Độ đúng, độ chính xác của phương pháp

Tiến hành trên 3 nền mẫu. Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp của 4 chất phân tích ở 3 mức nồng độ:

- Mức nồng độ thấp: Dung dịch có nồng độ mỗi chất chính xác khoảng SIL là 312,5 µg/ml; VAR, TAD là 62,5 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là SIL 250 ng/ml; VAR, TAD 50 ng/ml;
- Mức nồng độ trung bình: Dung dịch có nồng độ mỗi chất chính xác khoảng SIL là 625 µg/ml; VAR, TAD là 125 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là SIL 500 ng/ml; VAR, TAD 100 ng/ml;
- Mức nồng độ cao: Dung dịch có nồng độ mỗi chất chính xác khoảng SIL là 937,5 µg/ml; VAR, TAD là 187,5 µg/ml. Sau khi xử lý mẫu, nồng độ các chất trong dung dịch sẽ là SIL 750 ng/ml; VAR, TAD 150 ng/ml.

Sau khi cho dung dịch chuẩn, lắc nhẹ và để khô ở nhiệt độ phòng. Tiến hành xử lý mẫu như quy trình đã xây dựng và phân tích bằng LC-MS/MS.

Ở mỗi mức nồng độ tiến hành lặp lại 7 lần, tiến hành song song.

Độ đúng và độ lặp lại khác ngày được tiến hành tương tự như trên nhưng vào một ngày khác. Kết quả thu được ở Bảng 3.25.

Bảng 3.25. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày của nhóm ức chế PDE-5

Hoạt chất	Trong ngày				Khác ngày			
	*m thêm vào (µg)	$\bar{m}$ tìm lại (µg)	Độ đúng (%)	RSD (%)	*m thêm vào (µg)	$\bar{m}$ tìm lại (µg)	Độ đúng (%)	RSD (%)
	Nền viên nang NP1							
SIL	265	264	99,0	3,4	265	261	98,6	4,7
	550	542	98,3	2,2	550	540	98,1	3,7
	800	793	99,1	1,3	800	792	99,0	1,7
TAD	50	46	97,0	2,3	50	48	96,3	2,4
	104	98	98,3	3,5	104	102	98,0	3,1

	150	147	97,5	1,9	150	146	97,5	1,9
VAR	48	46	95,5	3,6	48	45	94,7	3,0
	112	110	97,3	2,7	112	109	97,1	1,7
	160	158	98,7	1,6	160	157	98,1	2,9
	Nền viên hoàn NP2							
SIL	265	251	95,4	2,9	265	252	95,2	3,3
	550	537	95,1	4,7	550	530	96,4	1,8
	800	790	98,9	1,7	800	782	97,8	3,1
TAD	50	48	98,3	2,0	50	49	98,1	2,1
	104	100	99,5	3,6	104	103	99,3	3,4
	150	146	98,3	2,4	150	147	98,3	2,5
VAR	48	46	95,1	3,3	48	46	95,0	3,3
	112	108	96,0	2,5	112	108	96,3	3,2
	160	158	97,8	4,1	160	156	97,6	4,2
	Nền cao NP3							
SIL	265	264	99,7	2,2	265	263	99,2	2,1
	550	536	98,1	2,4	550	542	98,7	2,6
	800	784	98,8	3,7	800	784	98,6	3,6
TAD	50	46	96,7	2,2	50	45	96,6	2,4
	100	94	98,1	3,2	104	95	94,2	3,6
	150	146	97,3	1,8	150	143	97,1	2,3
VAR	48	46	93,8	4,5	48	45	93,5	4,5
	112	110	96,2	4,0	112	109	96,5	4,6
	160	158	98,8	2,4	160	154	98,5	2,8

**m: lượng chất chuẩn thêm tính trong 1ml mẫu*

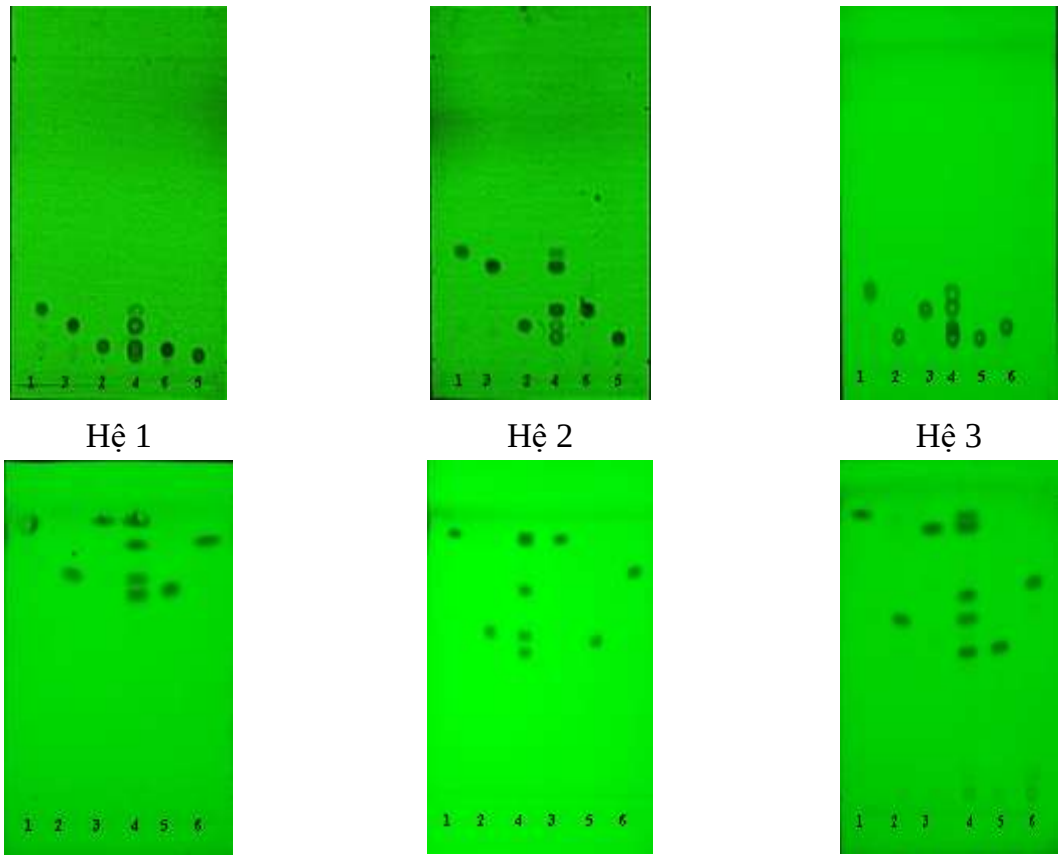
Nhận xét: Độ thu hồi của các chất phân tích dao động trong khoảng 92 – 104% tùy theo nồng độ đối với cả 3 chất và hệ số biến thiên: RSD của mỗi chất ở các mức nồng độ 1,7- 4,67%. Như vậy, phương pháp đã xây dựng cho độ thu hồi và độ lặp lại đáp ứng theo hướng dẫn của AOAC 2016 là với mức nồng độ 100 ppm - <0,1%, độ thu hồi 90-107%, độ lặp lại có RSD < 5,3%; với mức nồng độ 10 ppm - <100 ppm, độ thu hồi 80-110%, độ lặp lại có RSD < 7,3%. Như vậy, Phương pháp đã xây dựng có LOD thấp (từ 0,3 đến 1,3 ng/ml) ở cả 3 nền, các chất nghiên cứu có tương quan chặt chẽ giữa tín hiệu thu được và nồng độ chất phân tích (r > 0,995), độ đặc hiệu, độ chính xác và độ thu hồi đáp ứng yêu cầu AOAC 2016.

3.2. Xây dựng quy trình định tính bằng phương pháp HPTLC

3.2.1. Xây dựng quy trình định tính nhóm glucorticoid bằng phương pháp HPTLC

3.2.1.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Pha riêng các dung dịch chuẩn đơn: Betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison có nồng độ khoảng 1 mg/ml trong methanol. Khảo sát các hệ dung môi pha động hê 1: cloroform – methanol - amoniac 25% (90 :1 :5) ; hệ 2 : cloroform – methanol –diethylamin (90 : 10 : 1) ; hệ 3 : terbutyl methyl ether –methanol–amoniac 25% (20 : 2 : 1) ; hệ 4 : ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:1) ; hệ 5 : ethanol- n-hexan- amoniac (70:30:1), hệ 6: cloroform - ethyl acetat - ethanol (8:1:1), tiến hành trên bảng mỏng TLC silica gel 60 F254, thể tích chấm 5 µl, bước sóng phát hiện 254 nm. Kết quả được trình bày ở Hình 3.15.



Hệ 1 Hệ 2 Hệ 3

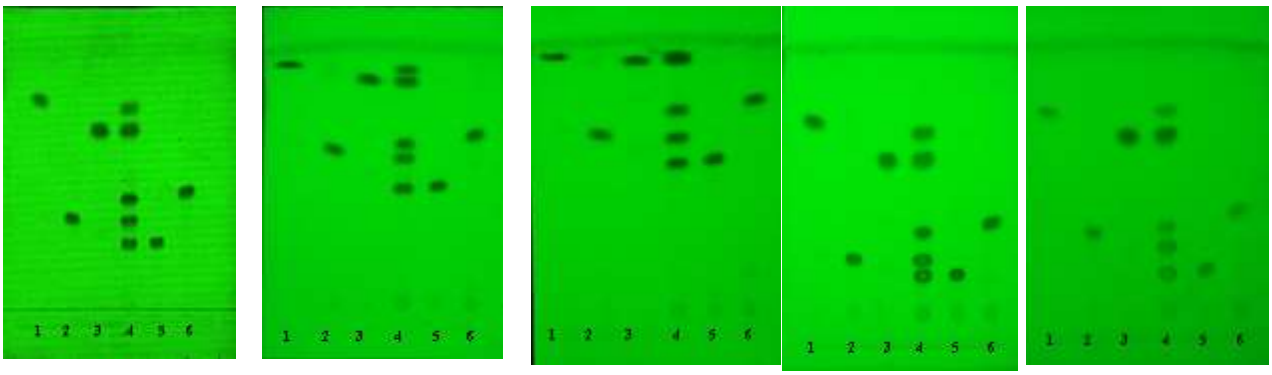
Hệ 4 Hệ 5 Hệ 6

1 – DEXA, 2 – BETA; 3 – HYRO, 4 – Hỗn hợp, 5- PREL, 6 – PREN

Hình 3.15. Kết quả khảo sát thành phần dung môi pha động nhóm corticoid

Dựa trên kết quả khảo sát thu được, khảo sát tiếp hệ 6: Cloroform - ethyl acetat - ethanol (8:1:1). Kết quả cho thấy: R_f của các chất cao, tách được betamethason,

prednisolon và prednison. Vết của dexamethason acetat và hydrocortison acetat còn dính nhau. Quyết định chọn hệ $CHCl_3$ - EtOAc - EtOH để khảo sát tỷ lệ hệ dung môi. Tiến hành thay đổi tỷ lệ thành phần pha động đã chọn để tìm pha động phân tách tốt nhất. Khảo sát hệ dung môi: $CHCl_3$ - EtOAc - EtOH với các tỉ lệ 8,5:1:0,5 (hệ B); 8:1,5:1 (hệ C); 8:0,5:1 (hệ D); 9:1:0,5 (hệ E); 8:1,5:0,5 (hệ F). Kết quả được trình bày ở Hình 3.16.



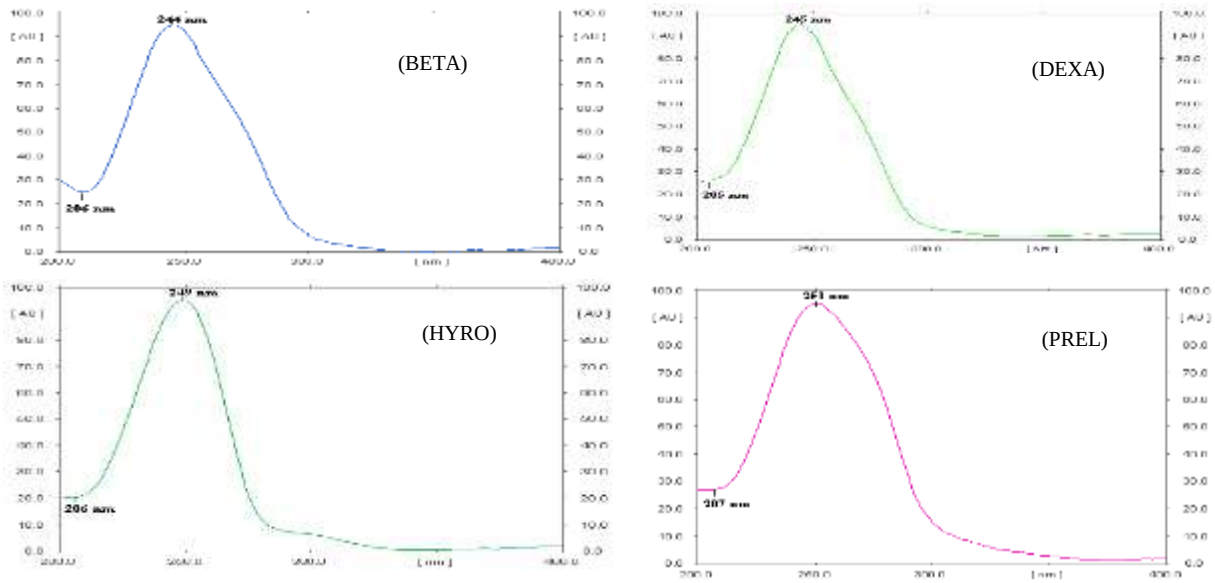
1 - DEXA; 2 - BETA; 3 - HYRO; 4 - hỗn hợp; 5 - PREL; 6 – PREN

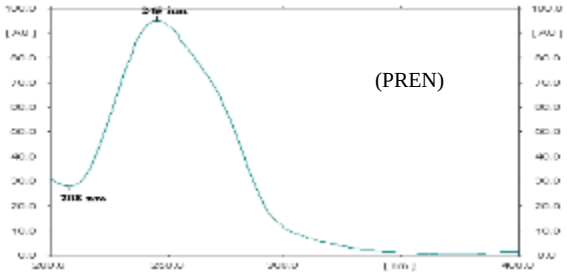
Hệ B Hệ C Hệ D Hệ E Hệ F

Hình 3.16. Kết quả khảo sát tỷ lệ hệ dung môi trên nhóm corticoid

Nhận xét: Hệ B: $CHCl_3$ - EtOAc - EtOH (8,5:1:0,5) có khả năng tách các chất tốt và R_f các chất nằm trong khoảng 0,2 - 0,8.

Tiến hành quét phổ UV từ bước sóng 200 đến 400 nm tại vị trí vết của 5 chất phân tích trong sắc ký đồ của chuẩn đơn và chuẩn hỗn hợp, kết quả được trình bày ở Hình 3.17.





Hình 3.17. Phổ hấp thụ UV của nhóm corticoid

Kết quả ở Hình 3.17, cho thấy cả 5 chất có cực đại hấp thụ trong khoảng 244 - 251 nm, trong đó 2/5 chất có cực đại hấp thụ tại 245 nm và đều là khoảng cực đại hấp thụ của 3 chất còn lại. Do đó lựa chọn 245 nm

Qua quá trình khảo sát trên kết hợp quy trình chiết mẫu của LC-MS/MS, do hàm lượng dược chất corticoid rất thấp, để tăng khả năng phát hiện, cần bổ sung thêm bước làm giàu mẫu như sau, xem thêm Phụ lục 5.4:

❖ ***Xử lý mẫu***

Cân lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Lấy 2,0 ml dịch cô cách thủy đến cạn và hòa tan cắn trong 1,0 ml methanol. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

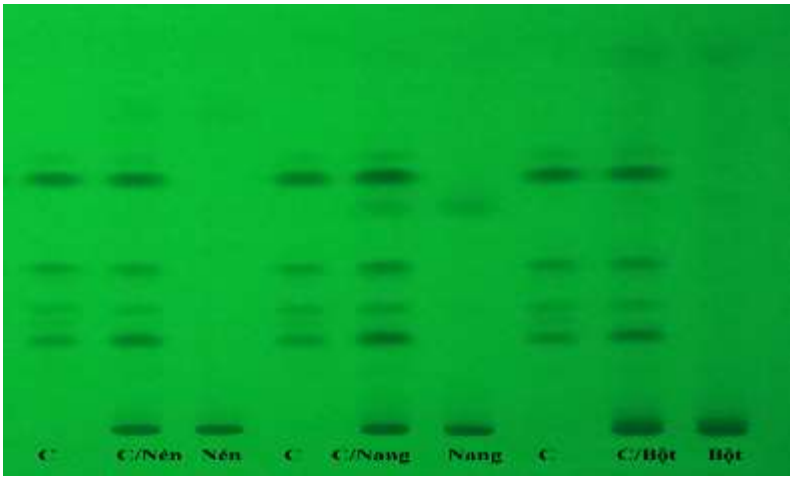
❖ ***Điều kiện sắc ký :***

- Bản mỏng: Silica gel 60 F_{254} với các kích thước (20x10 cm)
- Pha động: Cloroform - ethyl acetat - ethanol (8,5:1:0,5, v/v/v)
- Thể tích mẫu: 5 µl
- Phát hiện dưới đèn UV bước sóng 254 nm.
- Lấy đáp ứng phân tích tại 245 nm để xác định giới hạn phát hiện.

3.2.1.2. Thẩm định phương pháp

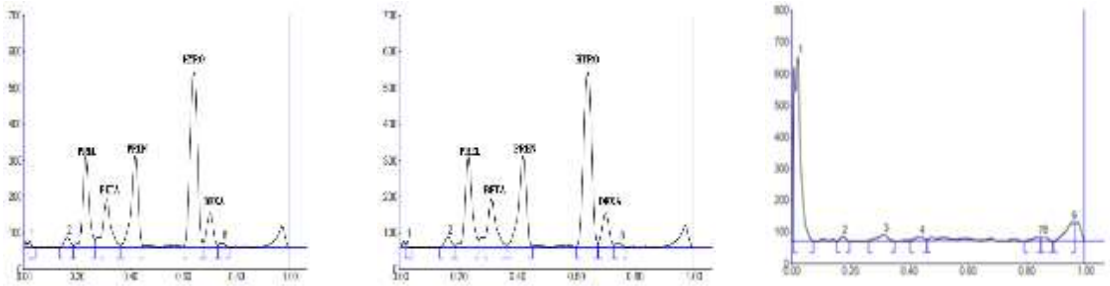
a. Độ đặc hiệu

Phân tích đồng thời 3 mẫu gồm dung dịch hợp chuẩn, mẫu trắng là nền mẫu tự tạo và mẫu trắng thêm chuẩn trên hệ thống HPTLC, thực hiện trên 3 nền mẫu tự tạo. Kết quả sắc ký đồ của bản mỏng dưới đèn UV 254 nm, thu được ở Hình 3.18.



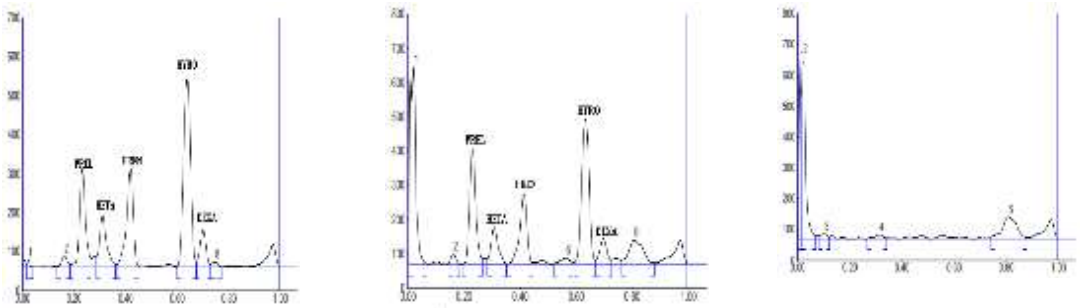
Hình 3.18.Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của nhóm glucocorticoid bằng HPTLC

Tiến hành quét bản mỏng bằng máy Scanner rồi lấy sắc ký đồ thông qua phần mềm winCAT, kết quả được minh họa ở Hình 3.19 và Hình 3.20, Hình 3.21.



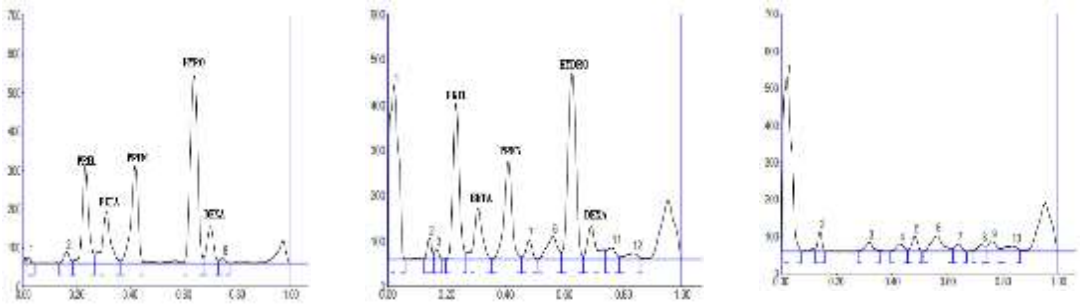
C-Chất Chuẩn *C/Nén-Nền Nén thêm chuẩn* *Nền Nén*

Hình 3.19. Sắc ký đồ analog của nhóm corticoid trên nền nén NX3 bằng HPTLC



C-Chất Chuẩn *C/Nang-Nền Nang thêm chuẩn* *Nang-Nền Nang*

Hình 3.20. Sắc ký đồ analog của nhóm corticoid ở nền nang NX1 bằng HPTLC



C-Chất Chuẩn *C/Bột-Nền Bột thêm Chuẩn* *Bột- Nền Bột*

Hình 3.21. Sắc ký đồ analog của nhóm corticoid trên nền Bột NX2 bằng HPTLC

Nhận xét: Kết quả cho thấy trên sắc đồ của *mẫu nền* không xuất hiện vết tương ứng về vị trí với vết của các chất phân tích, chứng tỏ các chất phân tích đã được tách tốt ra khỏi các thành phần của nền. Trên sắc đồ của *mẫu thêm chuẩn*, xuất hiện pic có R_f và màu sắc tương đương với vết thu được trên sắc đồ của *mẫu chuẩn* (R_f của prednisolon, betamethason, prednison, hydrocortison aceat và dexamethason acetat lần lượt là 0,25; 0,33; 0,45; 0,67 và 0,72). Khi quét phổ của UV-VIS của các vết sắc ký thu được trên *mẫu thêm chuẩn* và *mẫu chuẩn*, độ tinh khiết của các pic sắc ký trên các *mẫu thêm chuẩn* đều đạt > 0,99, và hệ số phù hợp của phổ UV-VIS của pic sắc ký trên *mẫu thêm chuẩn* so với vết có R_f tương ứng của *mẫu chuẩn* đều >0,99. Các giá trị độ tinh khiết pic và hệ số phù hợp cho thấy phương pháp loại bỏ được phần lớn ảnh hưởng của nền lên pic chất cần phân tích, có độ chọn lọc tương đối tốt.

b. Giới hạn phát hiện

Xác định LOD của phương pháp bằng cách phân tích các chất ở nồng độ thấp và xác định giá trị tỷ số tín hiệu/nhiễu (S/N). LOD được xác định tại nồng độ có S/N khoảng bằng 3.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích (µg/ml) là 900; 450; 300; 150; 100; 75 và 50 µg/ml trong methanol.

Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm vào mỗi nền mẫu 1,00 ml các dung dịch chuẩn ở trên rồi xử lý mẫu theo qui trình đã xây dựng. Tiến hành phân tích trên hệ thống HPTLC với các điều kiện đã lựa chọn. Xử lý bản mỏng bằng phần mềm winCATS, kết quả thu được trình bày ở *Bảng 3.26*.

Bảng 3.26. Kết quả LOD của nhóm corticoid

Chất	Nền NX3		Nền NX1		Nền NX2	
	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)
BETA	3,6	20	3,3	20	2,7	40
DEXA	2,5	40	2,8	40	2,1	40
HYDO	2,1	30	2,2	30	2,8	60
PREL	2,9	60	3,1	30	3,3	120
PREN	3,1	60	3,5	30	3,2	120

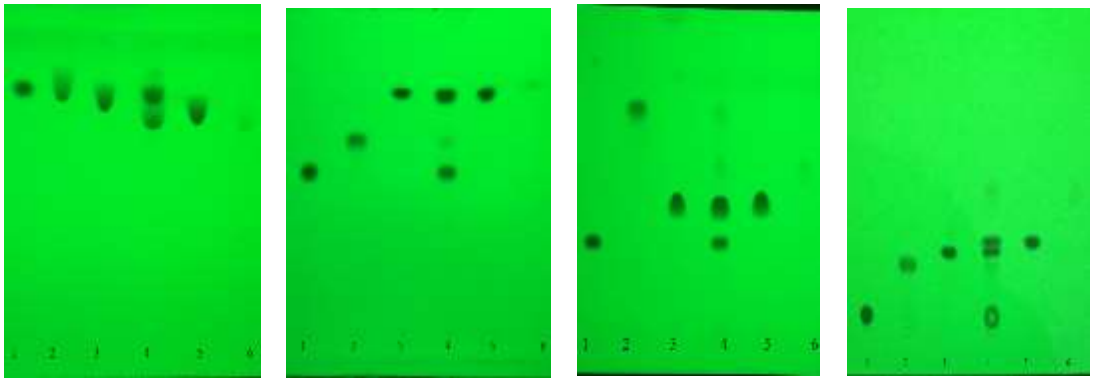
Nhận xét: Kết quả cho thấy: độ chọn lọc cao trên 3 nền mẫu và giới hạn phát hiện của 5 chất phân tích thấp trong khoảng 20-120 ng/vết . Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng theo yêu cầu của AOAC.

3.2.2. Xây dựng quy trình định tính nhóm NSAID bằng phương pháp HPTLC

3.2.2.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Dựa vào độ tan của các chất phân tích và tham khảo công bố, tiến hành khảo sát trên 4 hệ pha động gồm: hệ 1: $CHCl_3$: MeOH: NH_3 25% (18:15:5); hệ 2: Toluen: n-propanol: acid formic (5:4:1); hệ 3: $CHCl_3$: MeOH(9:1); hệ 4: n-hexan: ethyl acetat: acid acetic (7:2,5:0,5).

Pha các dung dịch chuẩn gốc paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen và ibuprofen trong methanol có nồng độ khoảng 500 µg/ml. Phân tích trên bản mỏng silicagel 60 GF 254, thể tích chấm 5 µl. Sau đó tiến hành triển khai sắc ký thu được kết quả như Hình 3.22.



Hệ 1 Hệ 2 Hệ 3 Hệ 4

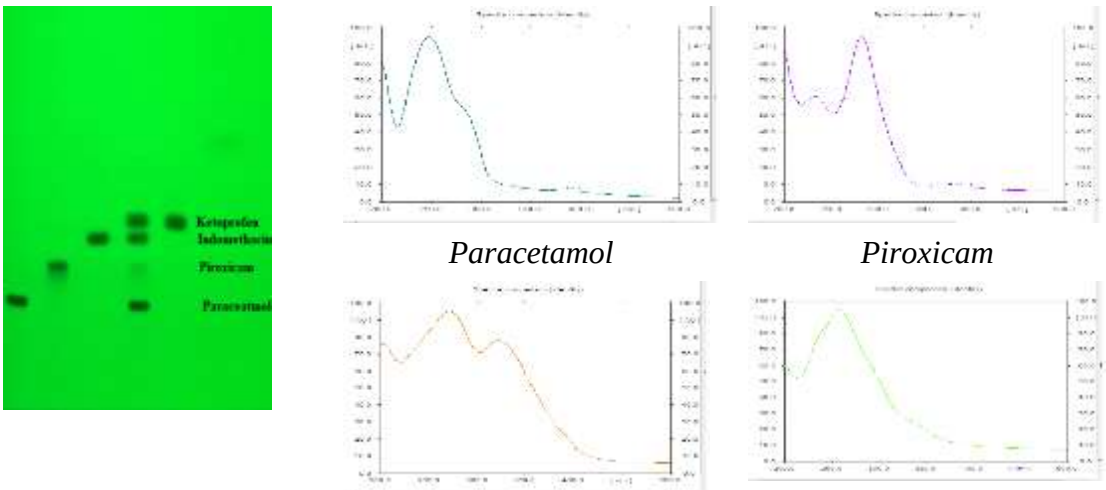
Hình 3.22. Kết quả khảo sát 4 hệ dung môi pha động nhóm NSAID với: 1- paracetamol, 2- piroxicam, 3- indomethacin, 4- hỗn hợp 5 chất phân tích, 5- ketoprofen, 6- ibuprofen

Từ kết quả sắc ký đồ thu được ta có nhận xét như sau:

- Hệ 1 không tách được 5 chất phân tích, hơn nữa R_f của các chất quá cao và các vết không được gọn.
- Hệ 2 tách được paracetamol và piroxicam tuy nhiên chưa tách được indomethacin, ketoprofen, ibuprofen.
- Hệ 3 tách được chất paracetamol, piroxicam tuy nhiên không tách được indomethacin và ketoprofen, ibuprofen.
- Hệ 4 tách được 5 chất phân tích nhưng R_f của paracetamol vẫn còn thấp.

Từ kết quả trên, chọn hệ 4 (n-hexan: ethyl acetat: acid acetic) để khảo sát tiếp. Tiến hành thay đổi tỉ lệ của các thành phần trong pha động để tìm được hệ pha động tối ưu nhất. Kết quả, ta thu được hệ pha động n-hexan : ethyl acetat: acid acetic (6:2,5:1,5) .Với hệ dung môi pha động trên có thể tách được 5 chất cần phân tích, các vết gọn, với R_f của paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen và ibuprofen lần lượt là: 0,18; 0,30; 0,36; 0,43 và 0,60..

Do đó ta chọn hệ dung môi pha động n-hexan: ethyl acetat: acid acetic (6:2,5:1,5) làm dung môi khai triển sắc ký cho 4 chất paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen. Tiến hành quét phổ của 4 vết chất chuẩn trong dải bước sóng từ 200-500nm ta thu được phổ chuẩn của 4 chất phân tích được thể hiện ở *Hình 3.23.*



Sắc ký đồ nhóm NSAID *Paracetamol* *Piroxicam* *Indomethacin* *Ketoprofen*

Hình 3.23. Sắc ký đồ sắc ký với hệ pha động n-hexan: ethyl acetat: acid aceti (6:2,5:1,5) nhóm NSAID; Kết quả quét phổ UV của nhóm NSAID

Nhận xét: Trong dải sóng 200-500 nm, paracetamol có một cực đại hấp thụ ở 247 nm, piroxicam có hai cực đại hấp thụ ở 236 nm và 282 nm, indomethacin có hai

cực đại hấp thụ ở 271 nm và 318 nm, ketoprofen có một cực đại hấp thụ ở 255 nm. Ta sẽ chọn ở mỗi chất phân tích một cực đại có độ hấp thụ lớn nhất để làm bước sóng định lượng .Với paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen lần lượt là 247 nm, 282 nm, 271 nm, 255 nm.

Qua quá trình khảo sát trên kết hợp quy trình chiết mẫu của LC-MS/MS, lựa chọn điều kiện phân tích như sau, xem thêm Phụ lục 5.5:

❖ ***Xử lý mẫu***

Cân lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Pha loãng lớp dịch trong phía trên 4 lần bằng methanol. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

❖ ***Điều kiện sắc ký:***

- Bản mỏng HPTLC Silicagel 60 F_{254}
- Pha động: n-hexan: ethyl acetat :acid acetic (6:2,5:1,5; v/v/v)
- Thể tích mẫu: 5µl
- Phát hiện:

+ Phát hiện bằng đèn soi UV ở bước sóng 254 nm;

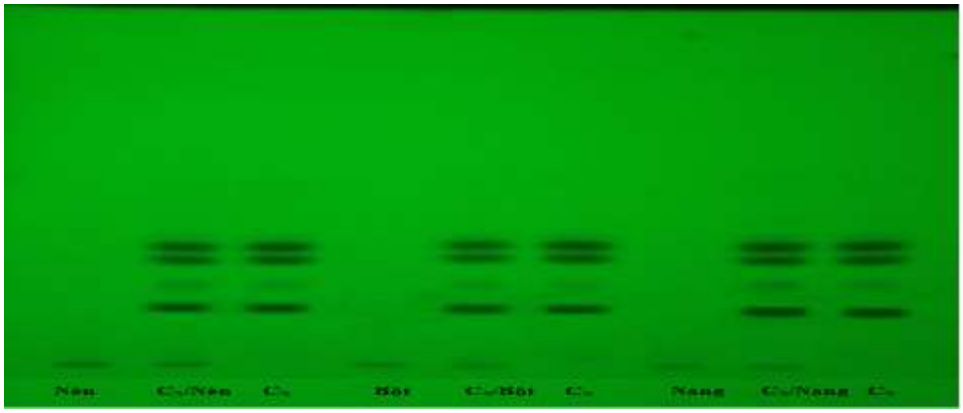
+ Lấy tín hiệu chất phân tích tại bước sóng 247 nm với paracetamol, 282 nm với piroxicam, 271 nm với indomethacin, 255 nm với ketoprofen để tính giới hạn phát hiện.

3.2.2.2. Thẩm định phương pháp

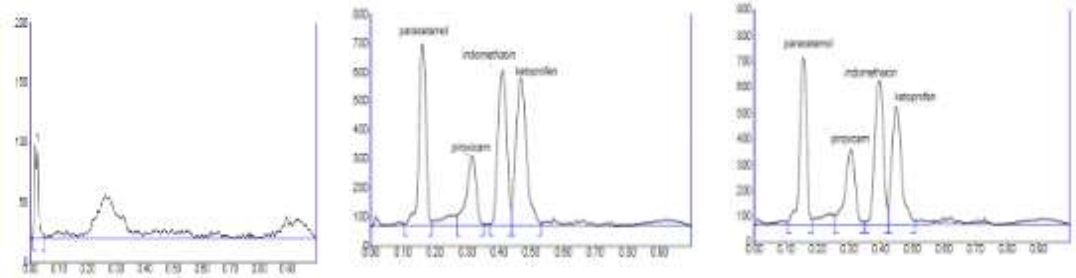
a. Độ đặc hiệu

Phân tích đồng thời trên 3 mẫu: Mẫu hỗn hợp chuẩn của 4 chất phân tích, mẫu nền tự tạo (nền viên nang, nền bột và nền viên nén), mẫu nền tự tạo có thêm hỗn hợp chuẩn của 4 chất phân tích trên hệ thống HPTLC. Kết quả sắc ký đồ của bản mỏng dưới đèn UV 254 nm, thu được Hình 3.24.

Tiến hành quét bản mỏng bằng máy Scanner rồi lấy sắc ký đồ thông qua phần mềm winCAT, kết quả được minh họa ở Hình 3.25, Hình 3.26, Hình 3.27.

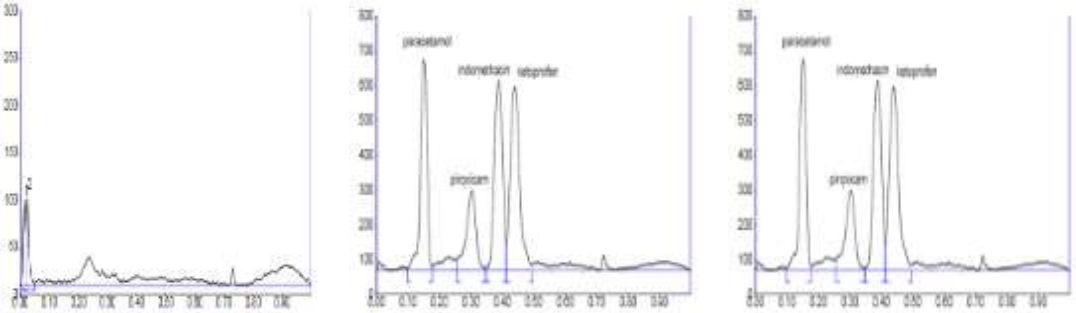


Hình 3.24. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của nhóm NSAID bằng HPTLC



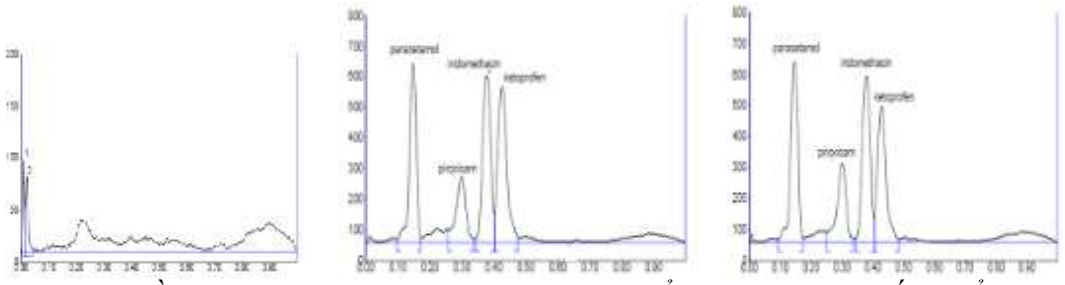
Nén-Nền nén C_N*/Nén- Nén thêm chuẩn* C_N *Hỗn hợp chuẩn*

Hình 3.25.Sắc ký đồ analog của nhóm NSAID trên nền nén NX3 bằng HPTLC



Bột-Nền bột C_N*/Bột- Bột thêm chuẩn* C_N *-Chất chuẩn*

Hình 3.26. Sắc ký đồ analog của nhóm NSAID trên nền bộ NX2t bằng HPTLC



Nang-Nền nang C_N*/Nang- Nang thêm chuẩn* C_N *-Chất chuẩn*

Hình 3.27. Sắc ký đồ analog của nhóm NSAID trên nền nang NX1 bằng HPTLC

Kết quả thu được tương tự với *nhóm corticoid*, thể hiện ở R_f và màu sắc của vết thu được trên sắc đồ *mẫu thêm chuẩn* tương đương với vết thu được từ *mẫu chuẩn* (R_f của paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen lần lượt là 0,17; 0,30; 0,38; 0,42), hệ số phù hợp phổ UV-VIS của vết trên *mẫu thêm chuẩn* so với vết tương ứng trên *mẫu chuẩn* đều > 0,99. Trên sắc đồ của *mẫu nền* không xuất hiện vết tương ứng về vị trí với vết của các chất phân tích, và độ tinh khiết các pic tương ứng với các chất cần phân tích trong *mẫu thêm chuẩn* đều > 0,99. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ chọn lọc.

b. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích có tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 3 lần tín hiệu nhiễu đường nền (S/N khoảng 3), giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ thấp nhất hệ thống phân tích còn có thể định lượng được và có tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 10 lần tín hiệu nhiễu đường nền (S/N khoảng 10).

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích (µg/ml) là 1000; 750; 500; 375; 250 và 175 trong methanol.

Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm vào mỗi nền mẫu 1,00 ml các dung dịch chuẩn ở trên rồi xử lý mẫu theo qui trình đã xây dựng.

Tiến hành phân tích trên hệ thống HPTLC với các điều kiện đã lựa chọn. Xử lý bản mỏng bằng phần mềm winCATS, kết quả thu được trình bày ở Bảng 3.27.

Bảng 3.27. Kết quả xác định LOD của nhóm NSAID

Chất	**Nền NX1**		**Nền NX2**		**Nền NX3**	
	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)
PARA	2,9	50	3,0	50	3,3	50
PIRO	2,9	50	2,8	50	2,7	50
INDO	3,0	50	2,9	35	2,7	50
KETO	2,9	50	3,1	50	2,8	50

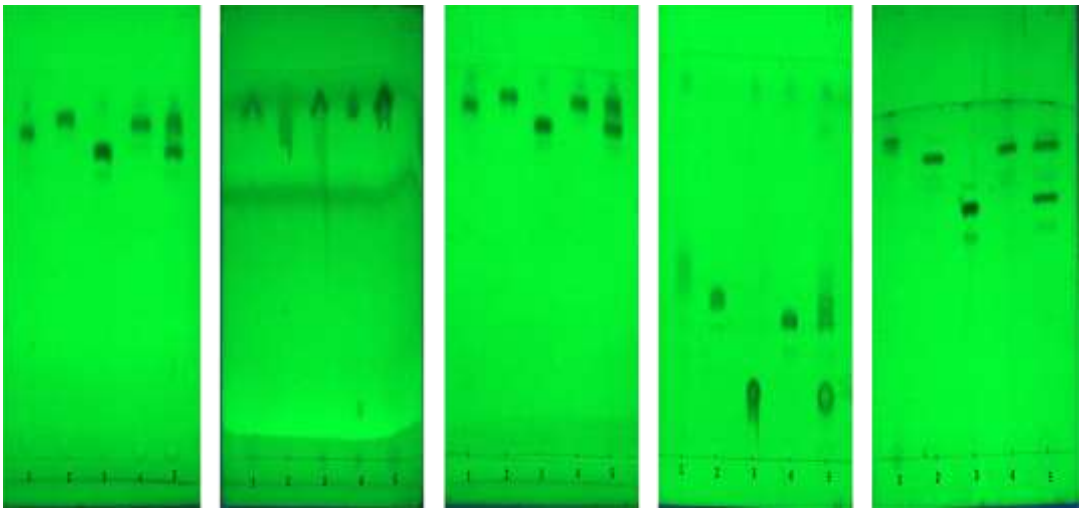
Nhận xét: Kết quả cho thấy: độ chọn lọc cao trên 3 nền mẫu và giới hạn phát hiện của 4 chất phân tích thấp trong khoảng 35-50 ng/vết . Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng theo yêu cầu của AOAC.

3.2.3. Xây dựng quy trình định tính nhóm giảm glucose máu bằng phương pháp HPTLC

3.2.3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Pha riêng các dung dịch chuẩn gốc: cân chính xác khoảng 5,0 mg các chất chuẩn vào bình định mức 5,0 ml. Thêm vào bình định mức khoảng 2 ml MeOH, lắc cho tan rồi thêm MeOH vừa đủ đến vạch.

Khảo sát các hệ pha động Hệ 1: *n*-butanol – acid acetic – H_2O (11:2:2); Hệ 2: MeOH – H_2O – acid acetic băng (6:4:0,25); Hệ 3: *n*-butanol – acid acetic – H_2O – MeOH (12:4:1:2); Hệ 4: *n*-butyl acetat-acid formic (100: 0,4), Hệ 5: ethyl acetat – toluen – diethyl ether – acid acetic (30:10:10:0,1), tiến hành trên bản mỏng silica gel 60 F254, kích thước 10x10 cm; thể tích chấm: 5 µl, bước sóng phát hiện 254 nm. Kết quả thể hiện ở Hình 3.28.



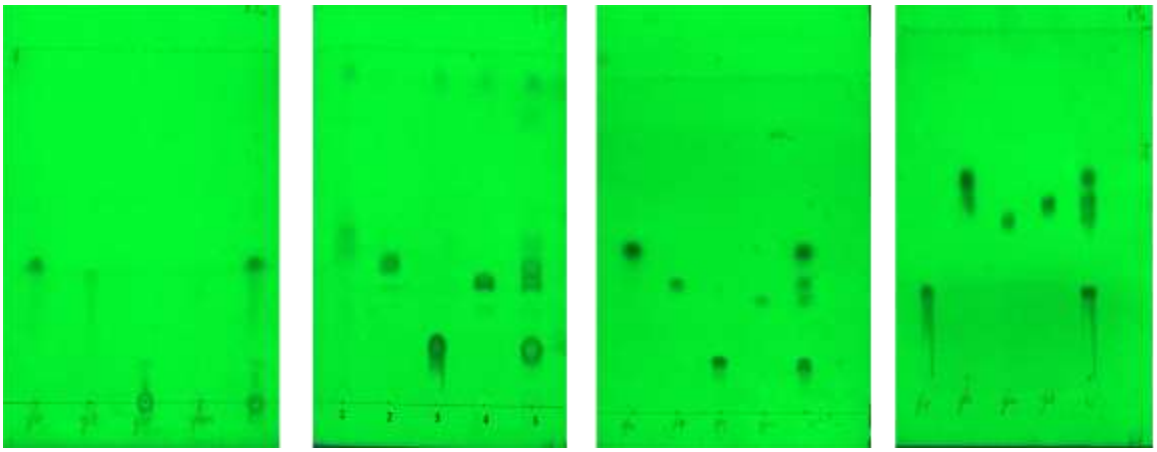
Hệ 1 Hệ 2 Hệ 3 Hệ 4 Hệ 5

Hình 3.28.Kết quả khảo sát hệ dung môi pha động nhóm giảm glucose máu

Nhận xét: Hệ 1: R_f của các chất lớn, không tách rõ được 4 chất. Hệ 2 Không tách được 4 chất. Hệ 3: R_f của các chất lớn, không tách đượcc 4 chất. Hệ 4: n-butylacetat có chứa 0,4% acid formic : R_f của glipizid 0,08; R_f của glimepirid 0,23; R_f của glibenclamid 0,26; R_f của gliclazid 0,31. Hệ 4 có thể tách được riêng các chất nhưng R_f nhỏ, vết glibenclamid và glimepirid gần nhau. Hệ 5 các vết rõ nét nhưng

không tách được riêng 4 chất.Từ các kết quả trên, lựa chọn hệ 4 cho nghiên cứu tiếp theo.

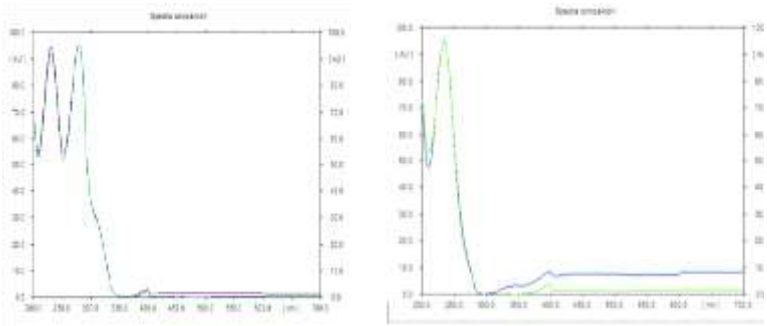
Tiến hành khảo sát các hệ dung môi có tỷ lệ acid formic trong pha động dao động từ 0,3 đến 0,6. Thể tích chấm 5 µl, bản mỏng 10 x 20 cm, phát hiện ở bước sóng 254nm. Kết quả thể hiện ở *Hình 3.29*. Nhận xét: Hệ 4A: n-butyl acetat- acid formic (100:0,3) không tách được riêng 4 chất cần phân tích, các chất cho vết mờ. Hệ 4B: n-butyl acetat - acid formic (100:0,4) có thể tách được 4 chất nhưng vết mờ, glibenclamid và glimepirid còn dính vết nhau. Hệ 4C: n-butyl acetat- acid formic (100:0,5) có thể tách được riêng 4 chất cần phân tích, các vết gọn, glibenclamid và glimepirid tách nhau xa hơn. Hệ 4D: n-butyl acetat - acid formic (100:0,6) tách được riêng 4 chất phân tích nhưng các chất bị kéo vết nhiều.



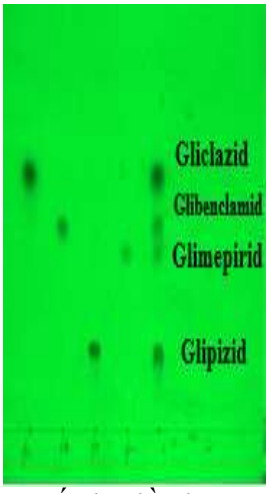
Hệ 4A Hệ 4B Hệ 4C Hệ 4D

Hình 3.29. Kết quả khảo sát hệ dung môi n- butyl acetat chứa acid formic các tỷ lệ khác nhau với nhóm giảm glucose máu

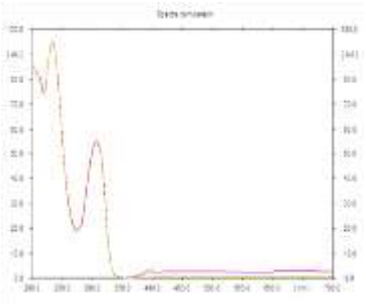
Kết quả cho thấy hệ 4C đạt yêu cầu phân tách các chất. Tiến hành quét phổ UV tại vị trí vết của 4 chất phân tích glipizid, glimepirid, glibenclamid và gliclazid trong sắc đồ của chuẩn đơn và chuẩn hỗn hợp, kết quả thể hiện ở như *Hình 3.30.*



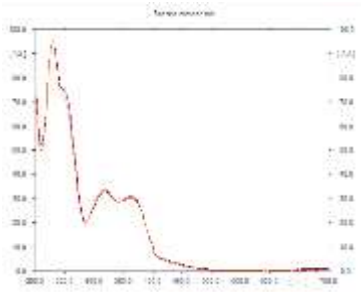
Glipizid *Glimepirid*



Sắc ký đồ nhóm giảm glucose máu



Glibenclamid



Gliclazid

Hình 3.30. sắc kí đồ hệ n-butylacetat chứa 0,5% acid formic; Kết quả phổ UV của nhóm giảm glucose máu

Qua quá trình khảo sát trên kết hợp quy trình chiết mẫu của LC-MS/MS, điều kiện phân tích được lựa chọn như sau, xem thêm Phụ lục 5.6:

❖ ***Điều kiện xử lý mẫu :***

Cân chính xác một lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

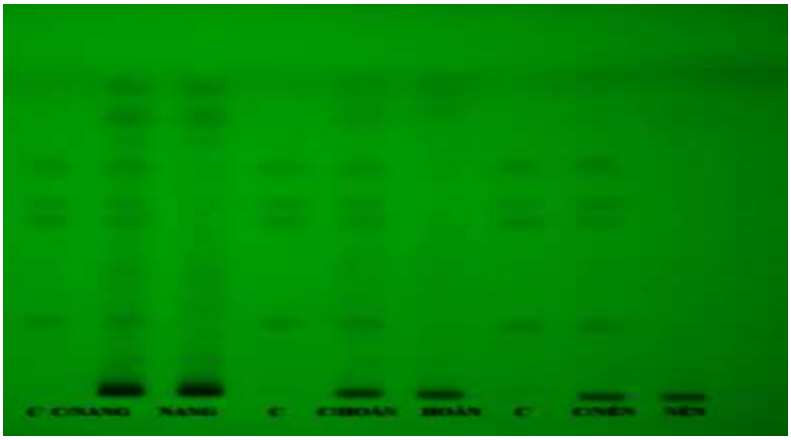
❖ ***Điều kiện sắc ký :***

- Bản mỏng : silica gel 60 F_{254} với kích thước (10x20 cm).
- Pha động : n-butyl acetat - acid formic (100:0,5; v/v)
- Thể tích mẫu : 5 µl.
- Phát hiện dưới đèn soi UV bước sóng 254 nm.
- Quét phổ tại bước sóng 235 nm để tìm giới hạn phát hiện.

3.2.3.2. Thẩm định phương pháp

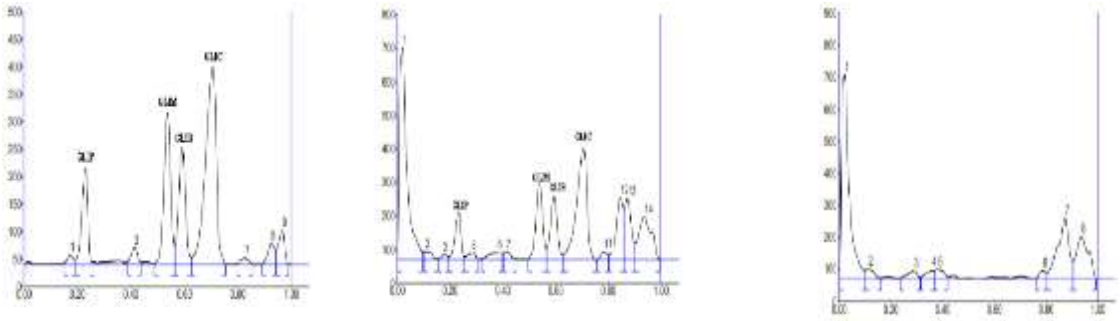
a. Độ đặc hiệu

Phân tích đồng thời 3 mẫu gồm dung dịch hợp chuẩn, mẫu trắng là nền mẫu tự tạo và mẫu trắng thêm chuẩn trên hệ thống HPTLC, thực hiện trên 3 nền mẫu tự tạo. Kết quả sắc ký đồ của bản mỏng dưới đèn UV 254 nm, xem Hình 3.31.



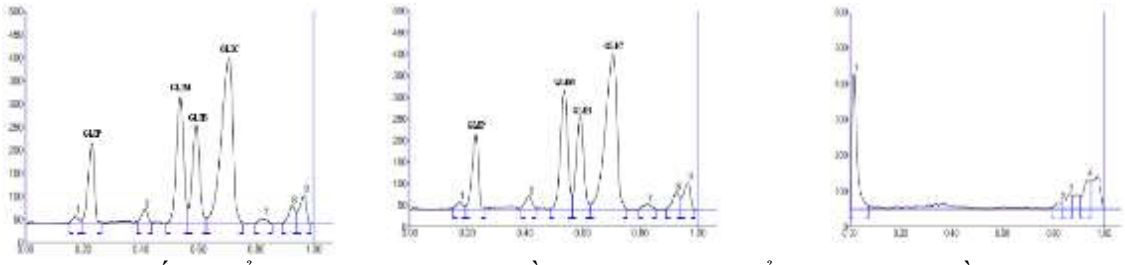
Hình 3.31. Sắc ký đồ về độ đặc hiệu của nhóm giảm glucose máu bằng HPTLC

Tiến hành quét bản mỏng bằng máy Scanner rồi lấy sắc ký đồ thông qua phần mềm winCAT, kết quả được minh họa ở Hình 3.32, Hình 3.33, Hình 3.34.



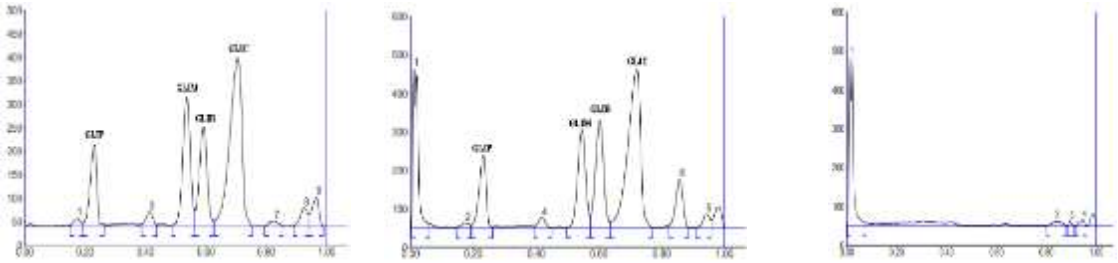
C-Chất chuẩn C/Nang-Nền Nang thêm chuẩn Nang-Nền Nang

Hình 3.32 Sắc ký đồ analog của nhóm giảm glucose máu trên nền nang ND2 bằng HPTLC



C-Chất Chuẩn C/Hoàn-Nền Hoàn thêm chuẩn Hoàn-Nền Hoàn

Hình 3.33. Sắc ký đồ analog của nhóm giảm glucose máu trên nền hoàn ND3 bằng HPTLC



C-Chất Chuẩn C/Nén-Nền Nén thêm chuẩn Nén-Nền Nén

Hình 3.34. Sắc ký đồ analog của nhóm giảm glucose máu trên nền nén ND1 bằng HPTLC

Nhận xét: kết quả cho thấy trên sắc đồ của *mẫu thêm chuẩn* xuất hiện vết có R_f và màu sắc tương đương với vết thu được trên sắc đồ của mẫu chuẩn (R_f của glipizid, glimepirid, glibenclamid, gliclazid lần lượt là 0,24; 0,55; 0,60; 0,72), và các pic trên *mẫu thêm chuẩn* có độ tinh khiết pic > 0,99 và khi chồng phổ với các pic tương ứng trên *mẫu chuẩn* thu được hệ số phù hợp > 0,99. Trên sắc đồ của *mẫu nền* không xuất hiện vết tương ứng về vị trí (R_f) với vết của các chất phân tích. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chọn lọc khá tốt.

b. Giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ thấp nhất của chất phân tích có tín hiệu đáp ứng của pic gấp khoảng 3 lần tín hiệu nhiễu đường nền (S/N khoảng 3).

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ mỗi chất phân tích (µg/ml) là 3600; 1800; 900; 600; 300 và 150 µg/ml trong methanol.

Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm vào mỗi nền mẫu 1,00 ml các dung dịch chuẩn ở trên, lắc nhẹ và để khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó, xử lý mẫu theo qui trình đã xây dựng. Tiến hành phân tích trên hệ thống HPTLC với các điều kiện đã lựa chọn. Xử lý bản mỏng bằng phần mềm winCATS, kết quả thu được trình bày ở *bảng 3.28.*

Bảng 3.28. Kết quả xác định LOD và LOQ của nhóm giảm glucose máu

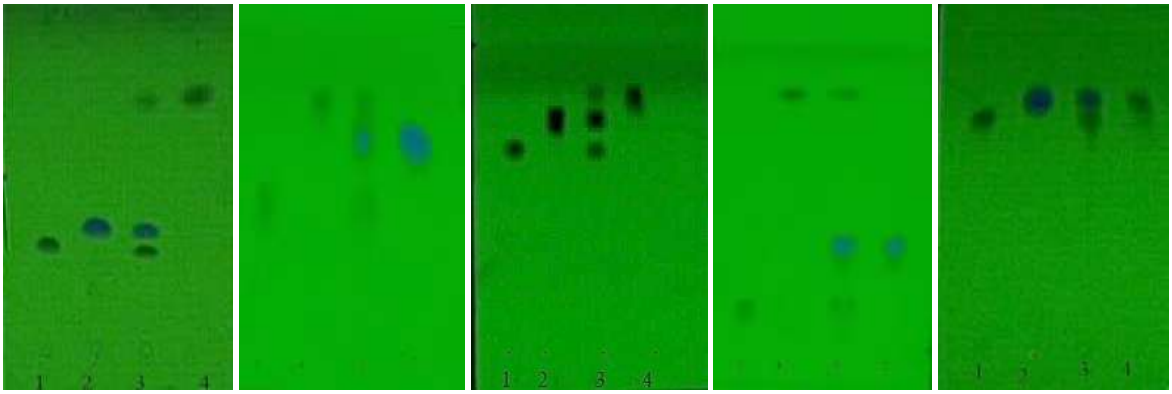
Chất	Nền viên nén ND2		Nền viên nang ND3		Nền hoàn ND1	
	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)
GLIP	3,4	180	3,2	30	3,3	60
GLIM	2,7	60	2,9	30	2,7	30
GLIB	2,9	30	3,7	60	2,8	30
GLIC	2,8	60	3,5	60	3,4	120

Nhận xét: Kết quả cho thấy: độ chọn lọc cao trên 3 nền mẫu và giới hạn phát hiện của 4 chất phân tích thấp trong khoảng 30-120 ng/vết . Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng theo yêu cầu của AOAC.

3.2.4. Xây dựng quy trình định tính nhóm ức chế PDE-5 bằng phương pháp HPTLC

3.2.4.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Pha riêng các dung dịch chuẩn gốc sildenafil citrat, tadalafil hydroclorid và vardenafil có nồng độ khoảng 1mg/ml trong methanol. Khảo sát các hệ pha động, tiến hành trên bản mỏng silica gel 60 F254, kích thước 10x10 cm; thể tích chấm: 5 µl, bước sóng phát hiện 254 nm. Kết quả thể hiện ở *Hình 3.35*



Hệ 1 Hệ 2 Hệ 3 Hệ 4 Hệ 5

Hình 3.35. Kết quả khảo sát hệ dung môi pha động nhóm ức chế PDE-5, trong đó 1- Sildenafil; 2-Vardenafil; 3-hỗn hợp 3 chất phân tích; 4-Tadalafil

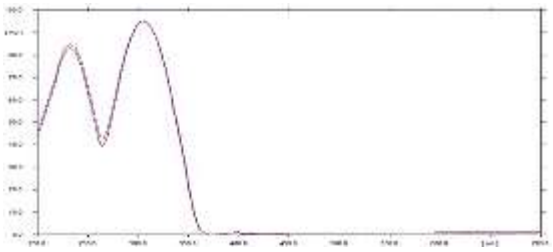
Nhận xét: Hệ 1: Cloroform – methanol - amoniac 25% (90 :1 :5) : Vết của tadalafil còn tương đối cao. Vardenafil và sildenafil vẫn còn sát nhau. Hệ 2 : Cloroform – methanol –diethylamin (90 : 10 : 1) : vết của các chất vẫn còn cao. Vardenafil và tadalafil không tách. Hệ 3 : terbutyl methyl ether –methanol–amoniac 25% (20 : 2 : 1): Vết của các chất lớn. Hệ 4 : Ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:1): Hệ tách được 3 chất tuy nhiên giá trị vết của sildenafil còn hơi thấp trong khi vết của tadalafil tương đối cao. Các vết tách rời xa nhau. Hệ 5 : Ethanol- n-hexan- amoniac (70:30:1): Không tách được 3 chất. Từ các kết quả trên lựa chọn hệ 4 cho các nghiên cứu tiếp theo.

Tiến hành thay đổi tỷ lệ thành phần pha động đã chọn để tìm được pha động tối ưu nhất. Kết quả thu được hệ Ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:2,6) cho R_f của sildenafil 0,21; vardenafil 0,3; tadalafil là 0,51, các vết tách nhau rõ khi soi dưới đèn UV bước sóng 254 nm. Tiến hành quét phổ UV tại vị trí vết của 3 chất

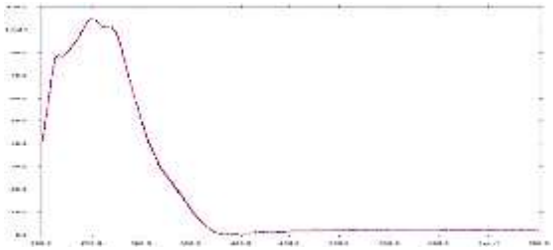
phân tích sildenafil, tadalafil, vardenafil trong sắc ký đồ của chuẩn đơn và chuẩn hỗn hợp như *Hình 3.36*.



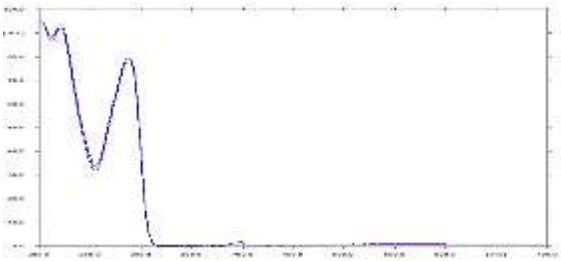
Sắc ký đồ nhóm ức chế PDE-5



Sildenafil



Vardenafil



Tadalafil

Hình 3.36. Sắc ký đồ và phổ UV của nhóm ức chế PDE-5

Sildenafil có cực đại hấp thụ tại 2 bước sóng là 232nm và 304 nm, vardenafil có cực đại hấp thụ tại 251nm, tadalafil có cực đại hấp thụ tại 235 và 285 và nm. Do đó, lựa chọn 304nm đối với sildenafil, 251nm đối với vardenafil và 285 đối với tadalafil là bước sóng phát hiện khi lấy kết quả định lượng các chất phân tích.

Qua quá trình khảo sát trên kết hợp quy trình chiết mẫu của LC-MS/MS, điều kiện phân tích được lựa chọn như sau:

❖ ***Xử lý mẫu***

Cân lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/10 phút. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

❖ ***Điều kiện sắc ký :***

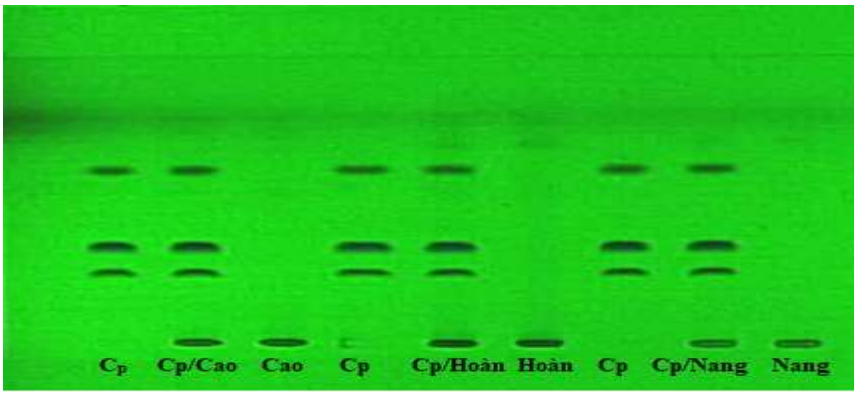
- Bản mỏng : silica gel 60 F_{254} với kích thước (10x20 cm)
- Pha động : Ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45: 5: 2,6; v/v/v)
- Thể tích mẫu : 5 µl
- Phát hiện dưới đèn soi UV bước sóng 254 nm

- Bước sóng quét phổ để tìm giới hạn phát hiện: 251 nm đối với vardenafil, 285 nm đối với tadalafil và 304 nm đối với sildenafil, xem thêm Phụ lục 5.7.

3.2.4.2. Thẩm định phương pháp

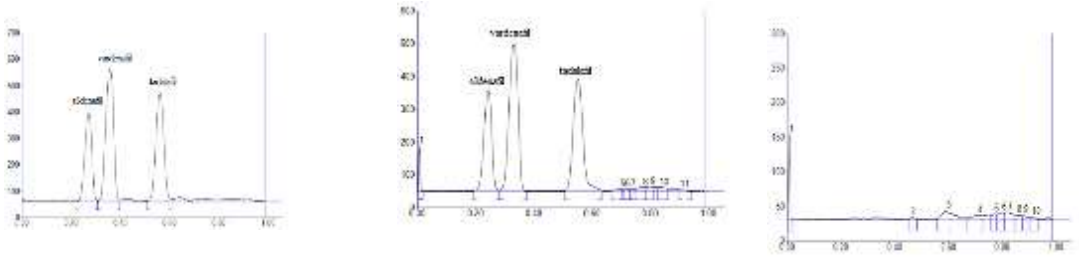
a. Độ đặc hiệu

Phân tích đồng thời 3 mẫu: dung dịch hỗn hợp chuẩn chất phân tích, mẫu placebo, và mẫu placebo thêm chuẩn trên hệ thống HPTLC, trong đó mẫu placebo là nền mẫu đông dược tự tạo ở dạng viên nang, viên hoàn và dạng cao thuốc. Kết quả thu được các sắc ký đồ dưới đèn UV 254, thu được ở Hình 3.37.



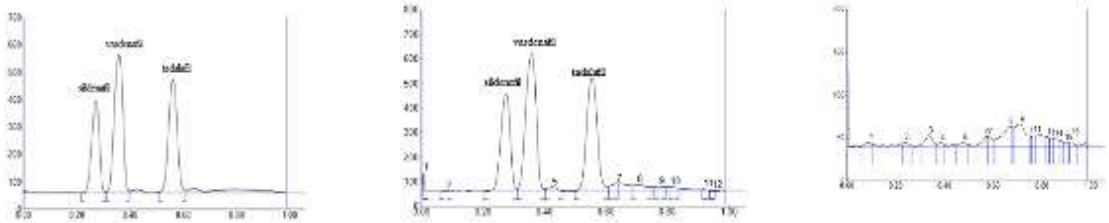
Hình 3.37. Sắc ký đồ đanh giá độ đặc hiệu của nhóm ức chế PDE-5 bằng HPTLC

Tiếp tục, xử lý kết quả với phần mềm WinCAT đối với mẫu trên nền chế phẩm tự tạo, lấy sắc kí đồ analog. Kết quả thể hiện ở Hình 3.38, Hình 3.39, Hình 3.40.



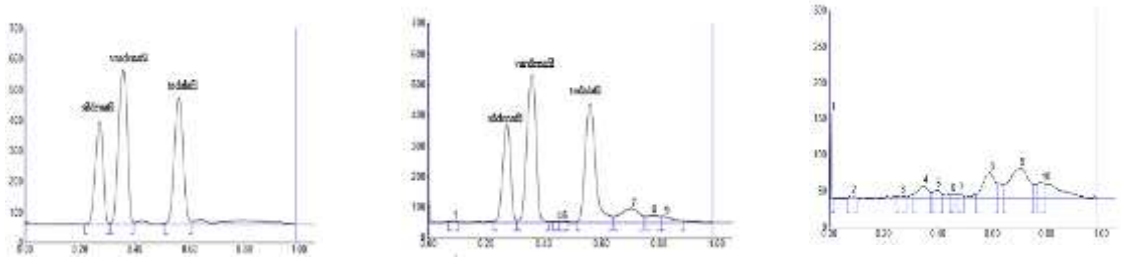
Cp-Chất Chuẩn *Cp/Cao-Chuẩn trong Cao* *Cao-Nền Cao*

Hình 3.38. Sắc ký analog của nhóm ức chế PDE-5 trên nền cao NP3 bằng HPTLC



Cp-Chất Chuẩn *Cp/Hoàn-Nền Hoàn thêm chuẩn* *Hoàn-Nền Hoàn*

Hình 3.39. Sắc ký analog của nhóm ức chế PDE-5 trên nền hoàn NP2 bằng HPTLC



Cp-Chất Chuẩn *Cp/Nang-Nền nang thêm chuẩn* *Nang-Nền nang*

Hình 3.40. Sắc ký analog của nhóm ức chế PDE-5 trên nền nang NP1 bằng HPTLC

Kết quả cho thấy: trên sắc ký đồ của mẫu placebo thêm chuẩn có các vết chính có cùng hình dạng, màu sắc, quãng đường đi với các vết chính trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện các vết tương ứng với các vết chính trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu placebo thêm chuẩn. Do đó, phương pháp có tính chọn lọc đảm bảo để phát hiện 3 chất trên nền các chế phẩm đông dược khảo sát.

b. Giới hạn phát hiện

Từ các dung dịch chuẩn gốc của 4 chất phân tích có nồng độ 1,0 mg/ml tiến hành pha loãng thành dãy các dung dịch có nồng độ giảm dần như sau:

- Sildenafil: 3140, 2590, 1570, 1250, 785 µg/ml
- Tadalafil: 3480, 2865, 1740, 1300, 870 µg/ml
- Vardenafil: 3760, 3100, 1880, 1410, 940 µg/ml

Cân chính xác một lượng nền mẫu chính xác khoảng 1,00 g nền N1 và N3; 1,20 g nền N2. Thêm vào mỗi nền mẫu 1,00 ml các dung dịch chuẩn ở trên, lắc nhẹ và để khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó, xử lý mẫu theo qui trình đã xây dựng. Tiến hành phân tích trên hệ thống HPTLC với các điều kiện đã lựa chọn. Xử lý bản mỏng bằng phần mềm winCATS, kết quả thu được trình bày ở *Bảng* 3.29 sau:

Bảng 3.29. Kết quả xác định LOD, LOQ của nhóm ức chế PDE-5

Chất	Nền viên nang		Nền viên hoàn		Nền cao thuốc	
	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)	S/N	LOD (ng/vết)
Sildenafil	3,8	157	3,0	157	3.2	157
Tadalafil	4,6	174	4,9	174	4.9	174
Vardenafil	4,5	188	5,0	188	4,6	188

Nhận xét: Kết quả cho thấy: độ chọn lọc cao trên 3 nền mẫu và giới hạn phát hiện của 3 chất phân tích thấp trong khoảng 157-188 ng/vết . Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng theo yêu cầu của AOAC.

3.3. Phát triển quy trình định tính bằng phương pháp TLC-SERS

Phương pháp HPTLC phát hiện các chất dựa vào màu sắc vết, R_f và phổ UV. Tuy nhiên, phổ UV của các chất trong cùng một nhóm dược lý có cấu trúc tương tự thường khó phân biệt, dễ nhầm lẫn; đặc biệt trong chế phẩm đông dược với nền mẫu phức tạp. Do đó, có thể phát triển phương pháp tách bằng TLC và phát hiện bằng phổ SERS cho phép thu nhận được nhiều thông tin cấu trúc hóa học của hoạt chất hơn, từ đó có thể kết luận chính xác hơn. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, đề tài đã lựa chọn sildenafil là đối tượng phát triển phương pháp.

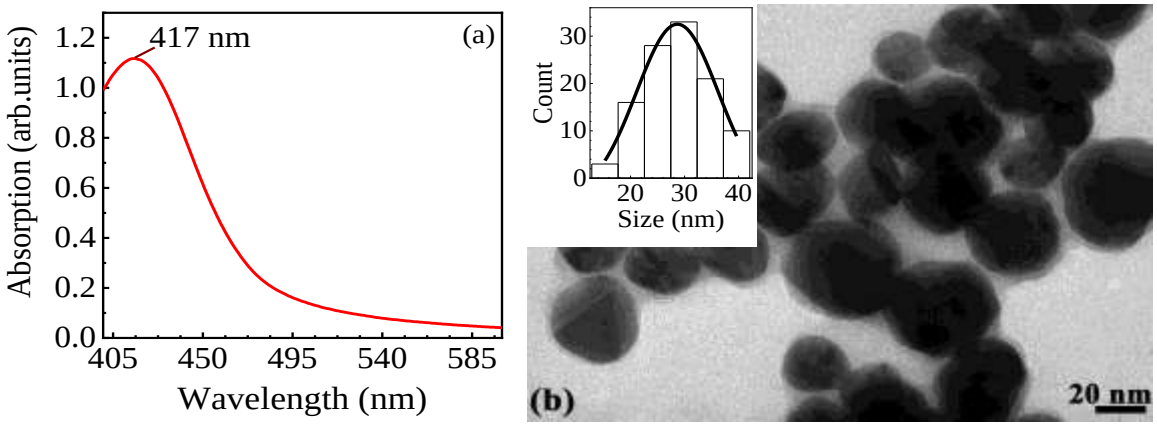
3.3.1. Xây dựng quy trình định tính bằng phương pháp TLC-SERS

3.3.1.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký lớp mỏng (TLC)

- Kết quả khảo sát HPTLC với nhóm ức chế PDE-5 cho thấy hệ pha động ethyl acetat-isopropanol-amoniac 25% (45:5:2,6) vết sildenafil tách hoàn toàn khỏi nền dược liệu, vết gọn, màu đen với R_f là 0,21, xem *Hình 3.36.*

3.3.1.2. Tối ưu hóa keo bạc

Khảo sát phổ UV và hình ảnh kích thước bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) của dung dịch keo bạc

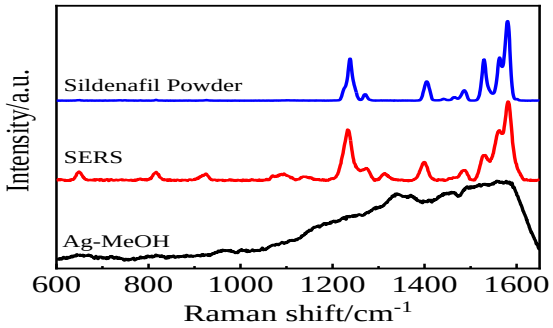


Hình 3.41. Kết quả (a) Phổ UV−vis, (b) Hình ảnh TEM của keo bạc

Kết quả phổ UV của keo bạc và hình ảnh TEM được trình bày ở *Hình 3.41*. Hình (a) cho thầy kết quả cực đại UV của keo bạc là 417 nm. Kết quả phổ UV tương ứng với các hình ảnh TEM của keo bạc ở hình b. Từ Ảnh TEM cho thấy kích thước hạt trung bình khoảng gần 30 nm, và sự phân bố kích thước hạt được thể hiện như đồ thị nhỏ bên trong Ảnh TEM. Có thể thấy hình dạng hạt Ag có dạng cầu và khá đồng đều, các tính chất này rất phù hợp cho việc hình thành "hot spots".

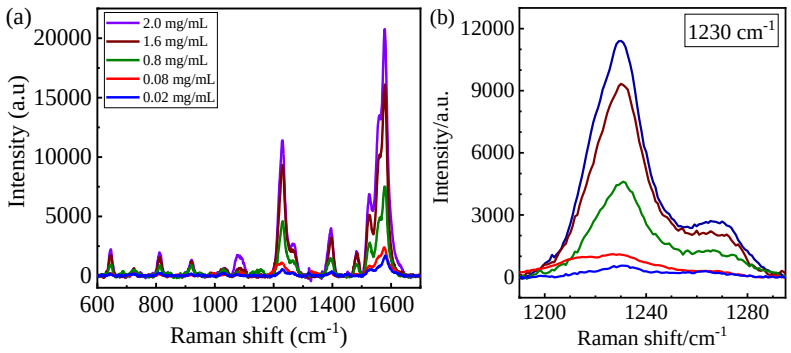
3.3.1.3. Xác định các đỉnh đặc trưng của sildenafil

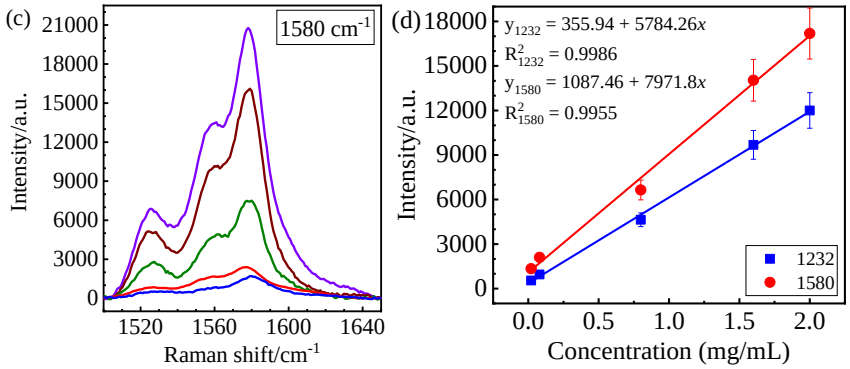
Để xác định các đỉnh đặc trưng của sildenafil chúng tôi đã tiến hành đo raman của mẫu sildenafil bột chuẩn, sildenafil-MeOH-Ag và Ag-MeOH để xác định chính xác hơn. Phổ raman của chúng được thể hiện ở *Hình 3.42*.



Hình 3.42 . Phổ Raman của keo bạc (màu đen), bột sildenafil (màu xanh), và phổ SERS của dung dịch sildenafil (màu đỏ).

Phổ SERS của sildenafil trong methanol ở các nồng độ khác nhau từ 0.02-0.2 mg/ml chấm trên bản mỏng TLC được trình bày ở *Hình 3.43* (a) với một số đỉnh lý thuyết của sildenafil. Kết quả cho thấy cường độ đỉnh raman đặc trưng cho sidenafil giảm khi giảm nồng độ. Ở đây, xét hai đỉnh cao nhất đặc trưng là 1232 và 1580 cm^{-1} được phóng đại để quan sát được thể hiện ở *Hình 3.43* (b,c). Sự thay đổi cường độ đỉnh raman theo nồng độ khác nhau được làm khớp theo mô hình tuyến tính như được thể hiện trên *Hình 3.43* (d). với hệ số tương quan tuyến tính tương ứng với đỉnh 1232 cm^{-1} và 1580 cm^{-1} lần lượt là 0,976 và 0,989. Điều này đã chỉ ra rằng cường độ của các đỉnh đặc trưng cho sidenafil tăng tuyến tính khi tăng nồng độ.

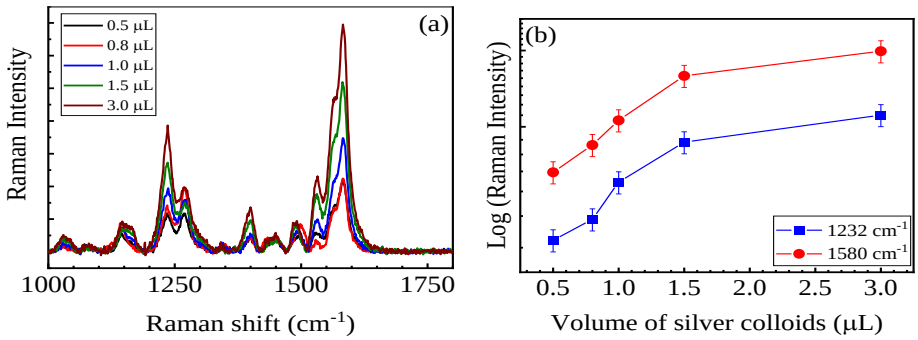




Hình 3.43. Phổ SERS của sildenafil với (a) phổ của sildenafil với nồng độ dung dịch tăng dần. Hình ảnh mở rộng tại các đỉnh đặc trưng: (b) 1232 cm^{-1}, (c) 2580 cm^{-1}, and (d) Mối tương quan giữa cường độ đỉnh với nồng độ sildenafil

3.3.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích nhỏ dung dịch keo bạc lên bản mỏng

Pha dung dịch chuẩn sildenafil 1 mg/ml trong methanol. Tiến hành TLC với các điều kiện đã chọn ở mục 3.1.2 và đánh dấu các điểm phân tách. So sánh phổ SERS của các vết chuẩn sildenafil khi nhỏ hỗn dịch keo có các thể tích khác nhau từ 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 3,0 µl. Kết quả xem *Hình 3.44.*

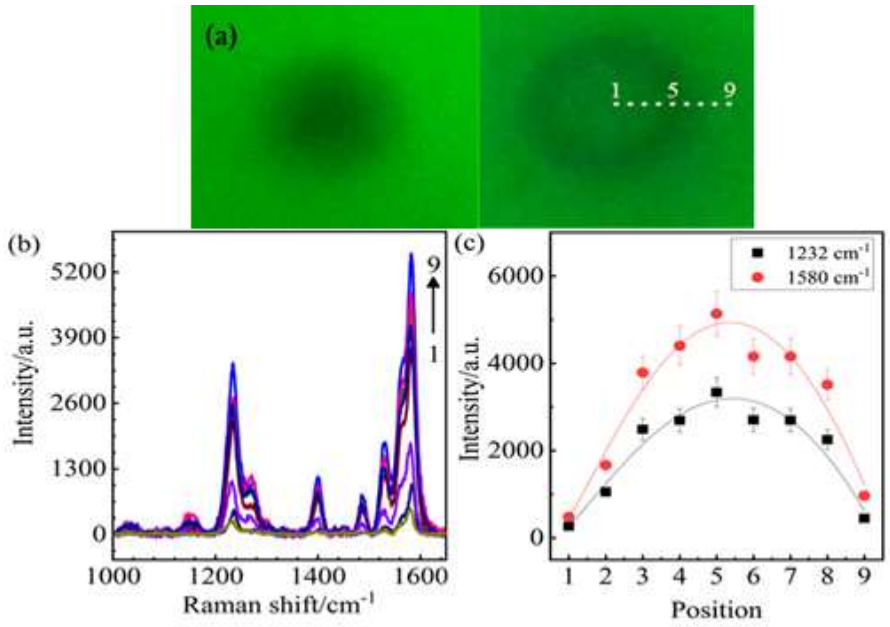


Hình 3.44. Phổ SERS của sildenafil với thể tích keo bạc khác nhau a); sự tương quan giữa cường độ các đỉnh 1232 và 1580 cm^{-1} với thể tích keo bạc b).

Phổ SERS của sildenafil tương ứng với các thể tích keo Ag khác nhau từ 0,5 µL đến 3,0 µL được thể hiện ở *Hình 3.44*a. Cường độ Phổ SERS của hai đỉnh đại diện cao nhất của sildenafil là 1232 và 1580 cm^{-1} được trình bày ở *Hình 3.44* b. Các kết quả cho thấy cường độ của hai đỉnh này tăng khá nhanh tương ứng với thể tích từ 0,5 µL đến 1,5 µL, và bắt đầu tăng chậm khi thể tích lớn hơn 1,5. Do vậy trong các phép đo chúng tôi đã sử dụng ở thể tích 1,5 µL để khảo sát SERS.

Khảo sát hiệu suất SERS với các vị trí khác nhau dọc theo đường kính của vết loang cà phê được hình thành sau khi nhỏ dung dịch keo bạc lên bản mỏng, và khoảng cách tương đối của nó với các điểm TLC được nghiên cứu để tối ưu hóa phương pháp. Với dung dịch chuẩn sildenafil 1 mg/ml trong methanol, tiến hành chấm và triển khai

bản mỏng với các điều kiện đã chọn và đánh dấu các điểm phân tách. Tiến hành thu tín hiệu SERS tại các vị trí khác nhau theo thứ tự từ 1 đến 9 như Hình bắt đầu từ tâm vòng tròn, Hình 3.45. Lựa chọn vị trí 5 giữa vành biên để cho tín hiệu SERS cao nhất.



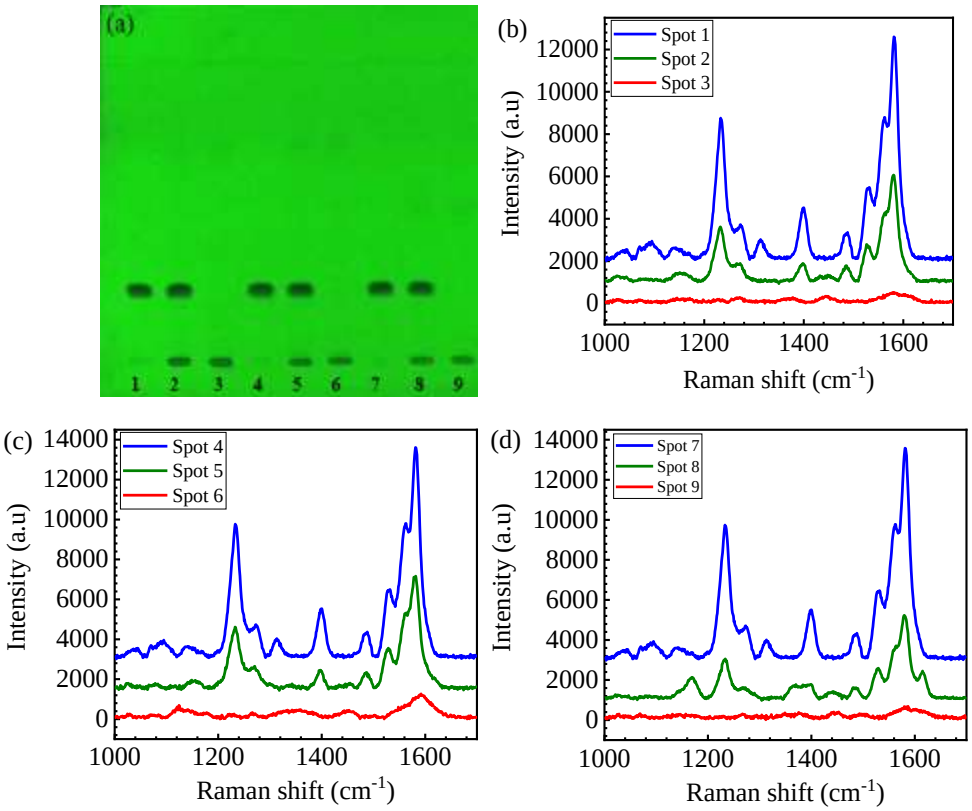
Hình 3.45. Sắc ký đồ của bản mỏng tại vị trí vết khi chưa nhỏ keo và sau khi nhỏ keo vị trí từ 1-9 tạo vòng cà phê trong đường kính của vết sildenafil (a), Phổ SERS của sildenafil tại các vị trí nhỏ keo khác nhau, (c) Mối tương quan giữa cường độ đỉnh 1232 và 1580 cm^{-1} với các vị trí 1-9 (b).

3.3.2. Thẩm định phương pháp định tính sildenafil bằng TLC-SERS

3.3.2.1. Độ đặc hiệu:

Phân tích và ghi nhận các phổ SERS đồng thời 3 mẫu gồm sildenafil chuẩn, mẫu placebo (các dạng viên nang, viên nén, cao thuốc) và mẫu placebo thêm chuẩn, theo quy trình của Phụ lục 5.8. Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ của mẫu nền thêm chuẩn xuất hiện vết có R_f và màu sắc tương đương với vết thu được trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn (R_f của sildenafil là 0,21). Trên sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện vết tương ứng về vị trí với vết của các chất phân tích, Hình 3.46(a). Sau đó, nhỏ keo bạc lên vị trí vết có $R_f \approx 0,21$, thu nhận phổ SERS của các vết cho thấy sildenafil có các tín hiệu đặc trưng tái lặp quanh các dịch chuyển SERS chính của chất chuẩn. Nền mẫu ảnh hưởng không đáng kể đến vị trí các đỉnh đặc trưng của sildenafil, riêng đỉnh 1398 cm^{-1} ở phổ nền mẫu viên nang làm thay đổi đáng kể, dao động đỉnh rộng nên không còn là đỉnh đặc trưng để nhận biết hoạt chất trong nền

mẫu, Hình 3.46(b, c, d). Như vậy, các đỉnh đặc trưng của các chế phẩm đông dược có trộn lẫn sildenafil là 1232 ± 1, 1268 ± 2, 1485 ± 1, 1529 ± 2, 1580 ± 1 cm^{-1}.



Hình 3.46. Sắc ký đồ của sildenafil trên 3 nền mẫu (a), và phổ SERS của 9 vết: (b) sildenafil (spot 1), sildenafil trong nền nang (spot 2), nền nang (spot 3), (c) sildenafil (spot 4), sildenafil trong nền hoàn (spot 5), nền hoàn (spot 6), d) sildenafil (spot 7), sildenafil trong nền cao.(spot 8), nền cao (spot 9)

3.3.2.2. Giới hạn phát hiện (LOD):

Pha dung dịch chuẩn của sildenafil citrat có nồng độ 300; 200; 100; 50; 20; 10; 5 µg/ml. Thêm 1 ml các dung dịch trên vào bột nền mẫu trắng với lượng khoảng 1/2 liều dùng, trộn đều, cô cách thủy. Xử lý mẫu và tiến hành phân tích, tín hiệu các đỉnh đặc trưng của sildenafil ở nồng độ 10 µg/ml (tương đương 2 ng/vết) vẫn có thể phát hiện được. Do đó, LOD của sildenafil là 2 ng/vết.

3.4. Đánh giá khả năng ứng dụng của các phương pháp HPTLC, LC-MS/MS và TLC-SERS

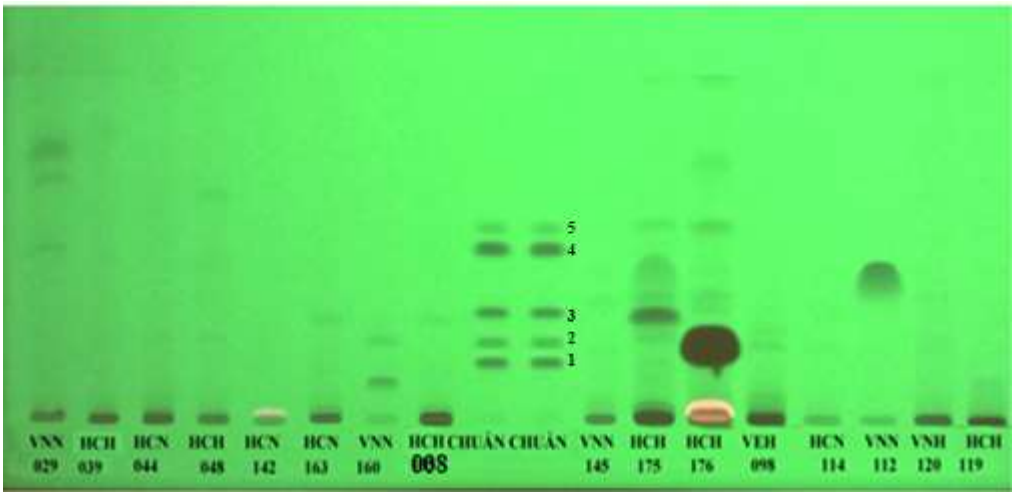
Trong 184 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm chức năng thu thập, phương pháp HPTLC được thực hiện để sàng lọc và LC-MS/MS được sử dụng phân tích để khẳng định kết quả trên toàn bộ mẫu. Đồng thời, phương pháp TLC-SERS được thực

hiện trên 24 mẫu chế phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lực để phát hiện sildenafil.

3.4.1. Ứng dụng phương pháp HPTLC trên mẫu thực

3.4.1.1. Phát hiện các chất nhóm corticoid trên trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp

119 chế phẩm đông dược điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp được xử lý và phân tích bằng phương pháp HPTLC với các điều kiện đã chọn. Sau khi khai triển sắc ký, sấy khô bản mỏng và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, kết quả được minh họa ở *Hình 3.47* và trình bày ở Phụ lục 3.1.1



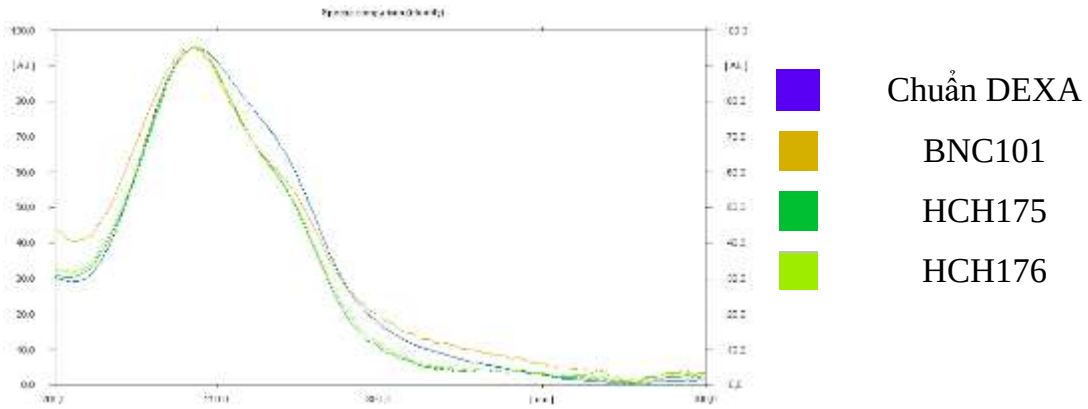
Hình 3.47. Sắc ký đồ các mẫu thực phát hiện nhóm glucocorticoid với vị trị chuẩn 1-prednisolon, 2-betamethason, 3-prednison, 4-hydrocortison acetat, 5-dexamethason acetat

Kết quả cho thấy:

- Tại vị trí R_f tương đương của chuẩn betamethason có 11 mẫu nghi ngờ dương tính với betamethason (VNN160, VNN146, VNN159, BNH091, HCH092, BNC101, VNH139, HCN141, VNN156, VNN162, HCH176).
- Tại vị trí R_f tương đương của chuẩn dexamethason acetat của có 03 mẫu nghi ngờ dương tính với dexamethason acetat (BNC101, HCH175, HCH176).
- Tại vị trí R_f tương đương của hydrocortison acetat có không có mẫu nghi ngờ dương tính với hydrocortison acetat
- Tại vị trí R_f tương đương của prednisolon không có mẫu nghi ngờ dương tính với prednisolon.

- Tại vị trí R_f tương đương của prednison có 04 mẫu nghi ngờ dương tính với prednison (VNH070, HCN169, HCN153, HCH175).

Để khẳng định kết quả dương tính, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với chất chuẩn. Kết quả được minh họa ở Hình 3.48, và trình bày ở phụ lục Phụ lục 3.1.2. và 3.1.3.



Hình 3.48. Kết quả chồng phổ các mẫu dương tính dexamethason acetat

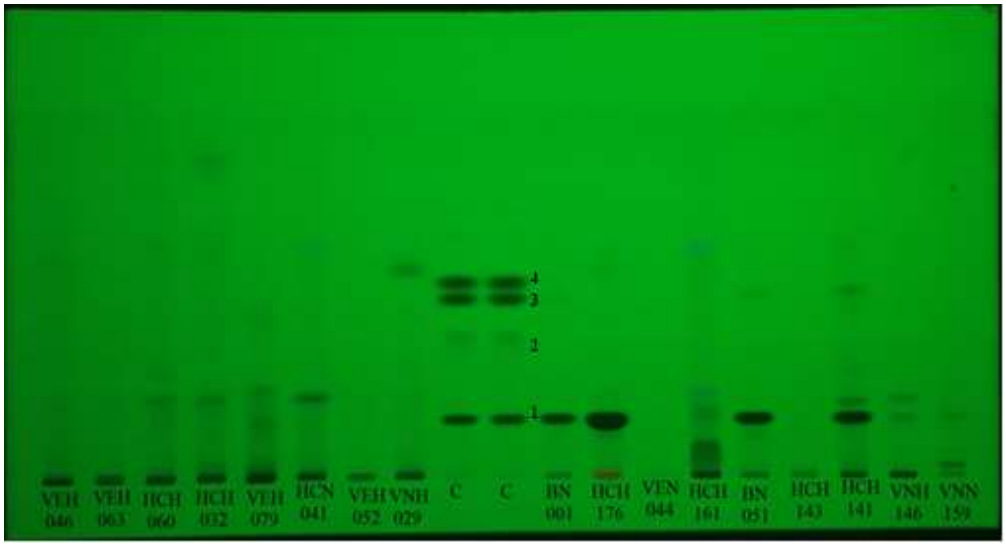
Các kết quả chồng phổ của các mẫu nghi dương tính với betamethason, prenison khác cũng đều cho kết quả âm tính. Có 03 mẫu dương tính với dexamethason acetat (BNC101, HCH175, HCH176).

Bảng 3.30. Kết quả định tính các mẫu dương tính với nhóm glucocorticoid

Mẫu thử	m_{TB} đơn vị mẫu (g)	Liều dùng (đơn vị)	BETA	DEXA	PREL	PREN	HYRO
BNC101	1,1904	1	-	+	-	-	-
HCH175	0,1572	40	-	+	-	-	-
HCH176	0,1416	33	-	+	-	-	-

3.4.1.2. Phát hiện nhóm NSAID trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp

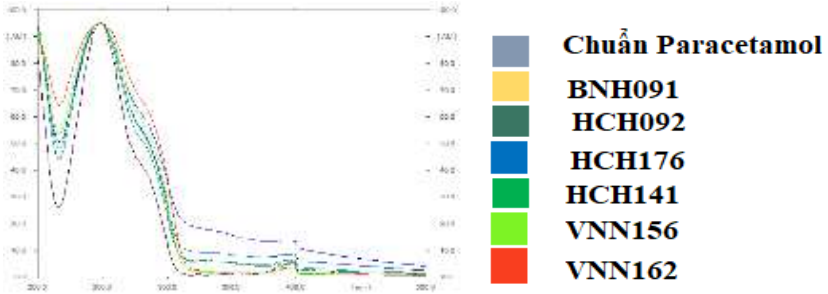
119 mẫu chế phẩm đông dược điều trị bệnh xương khớp. Chế phẩm được xử lý theo quy trình, sau đó phân tích trên hệ thống HPTLC với các điều kiện đã lựa chọn. Sau khi khai triển, sấy khô bản mỏng rồi quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254nm. Kết quả được minh họa ở Hình 3.49 và trình bày Phụ lục 3.2.1.



Hình 3.49. Sắc ký đồ phân tích các mẫu phát hiện nhóm NSAID với vị trí chuẩn 1-paracetamol, 2-piroxicam, 3-indomethacin, 4-ketoprofen

Nhận xét:

- tại vị trí R_f tương đương của chuẩn paracetamol có 17 mẫu nghi ngờ dương tính với paracetamol (VNN145, VNN 162, HCH 008, HCH 167, HMH 152, VEH043, VEH 071, BN 01, HCH 176, BN51, HCH 141, VNH146, VNN 159, BNC 101, HCH 092, VNN 156, BNH 091). Tại vị trí tương đương của chuẩn indomethacin có 4 mẫu nghi ngờ dương tính với indomethacin (HCN 169, BN 01, VNH 074, HCH 092)
- tại vị trí R_f tương đương của chuẩn indomethacin có 1 mẫu nghi ngờ dương tính với indomethacin(HCN 153).
- Không có mẫu nghi ngờ dương tính với piroxicam, ketoprofen và ibuprofen
- Để khẳng định cho nghi ngờ trên, ta tiến hành quét phổ của các vết nghi ngờ với dải bước sóng 200-500 nm, sau đó chồng phổ với phổ chuẩn của paracetamol và indomethacin. Kết quả được minh họa ở Hình 3.50, và trình bày ở Phụ lục 3.2.2.



Hình 3.50. Kết quả chồng phổ mẫu dương tính Paracetamol

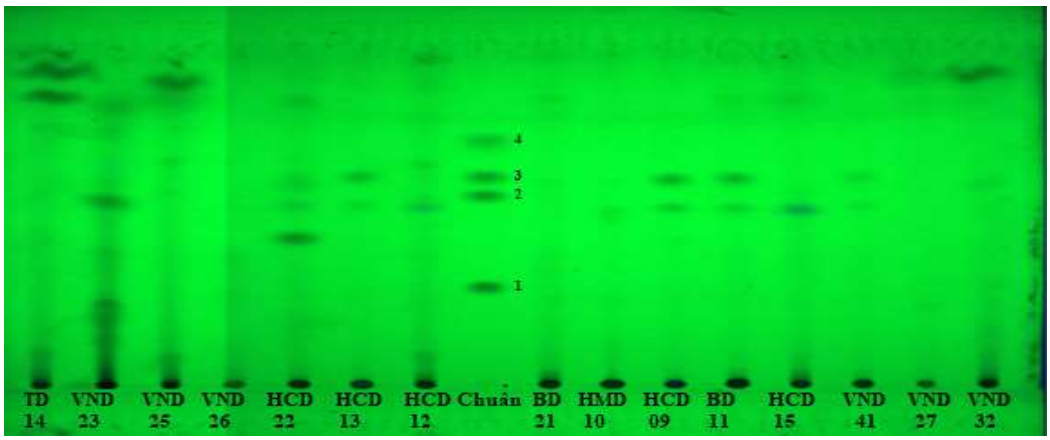
Kết quả chồng phổ cho thấy có 9 mẫu dương tính với paracetamol gồm (BN 01, HCH 008, BN 51, BNH 091, HCH 092, HCH 141, VNN 156, VNN 162, HCH 176) và 1 mẫu dương tính với indomethacin là BN 01.Các mẫu nghi ngờ dương tính còn lại đều cho kết quả âm tính, xem phụ lục *3.2.2*

Bảng 3.31. Kết quả định tính các mẫu dương tính với nhóm NSAID

Mẫu thử	m_{tb} đơn vị (g)	Liều dùng/1 ngày (đơn vị)	PARA	PIRO	INDO	KETO
BN 01	6,3410	1 gói	+	-	+	-
HCH 008	0,2203	15 viên	+	-	-	-
BN 51	8,0580	1 gói	+	-	-	-
BNH 091	1,1210	2 gói	+	-	-	-
HCH 092	5,6381	2 gói	+	-	-	-
HCH 141	0,6285	10 viên	+	-	-	-
VNN 156	0,5573	4 viên	+	-	-	-
VNN 162	0,2586	3 viên	+	-	-	-
HCH 176	0,1880	33 viên	+	-	-	-

3.4.1.3. Phát hiện dược chất nhóm giảm glucose máu trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường

41 mẫu chế phẩm đông dược điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh tiểu đường dạng. Các mẫu chế phẩm được xử lý theo quy trình và phân tích bằng phương pháp HPTLC với các điều kiện đã chọn. Sau khi khai triển sắc ký, sấy khô bản mỏng và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, kết quả được minh họa ở hình Hình 3.51 và trình bày ở Phụ lục 3.3.2.



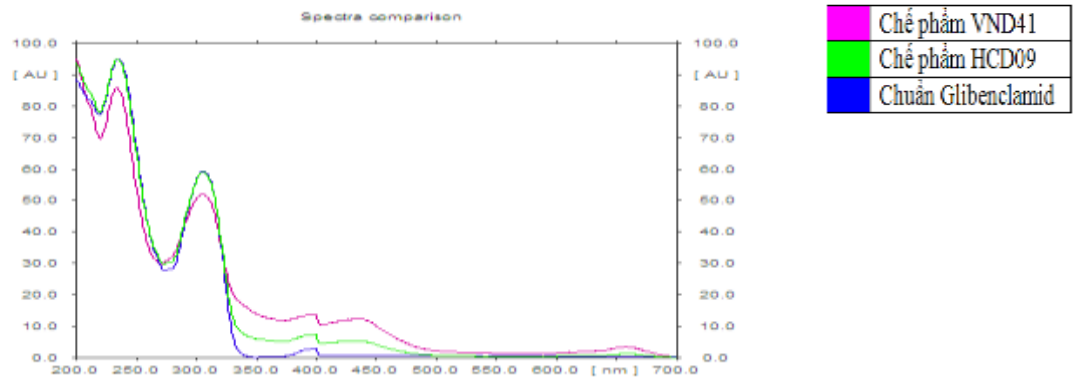
Hình 3.51. Sắc kí đồ phân tích các mẫu phát hiện nhóm giảm glucose máu với vị trí chuẩn 1- glipizid, 2- glimepirid, 3-glibenclamid, 4-gliclazid

Kết quả cho thấy:

- Tại vị trí tương đương của chuẩn glibenclamid có 16 mẫu nghi ngờ dương tính với Glibenclamid (VND41, HCD09, HCD18, HCD19, HCD22, HCD13, BD11, HMD10, HCD33, HCD08, HCD40, HCD16, VND32, VND38, HCD06, VND39).
- Tại vị trí tương đương của Glipizid có 7 mẫu nghi ngờ dương tính với Glipizid (VND04, HCD06, HCD07, VND30, VND39, HCD19).
- Tại vị trí tương đương của Glimepirid có 2 mẫu nghi ngờ dương tính với glimepirid(HCD17, HCD40).
- Tại vị trí tương đương của Gliclazid có 1 vết nghi ngờ duong tính với Gliclazid (HCD37).

Để khẳng định kết quả dương tính, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với chất chuẩn. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu nghi ngờ đều âm tính với glipizid, glimepirid và gliclazid với hệ số chồng phổ <0,99.

- Có 8 mẫu trộn lẫn glibenclamid (VND41, HCD09, HCD18, HCD19, HCD22, HCD13, BD11, HMD10). Kết quả chồng phổ các vết dương tính được minh họa ở *Hình 3.52* và trình bày ở Phụ lục 3.3.2, Phụ lục 3.3.3, Bảng 3.32.



Hình 3.52. Kết quả chồng phổ UV quét tại vị trí có Rf (vết glibenclamid) của các mẫu dương tính với glibenclamid

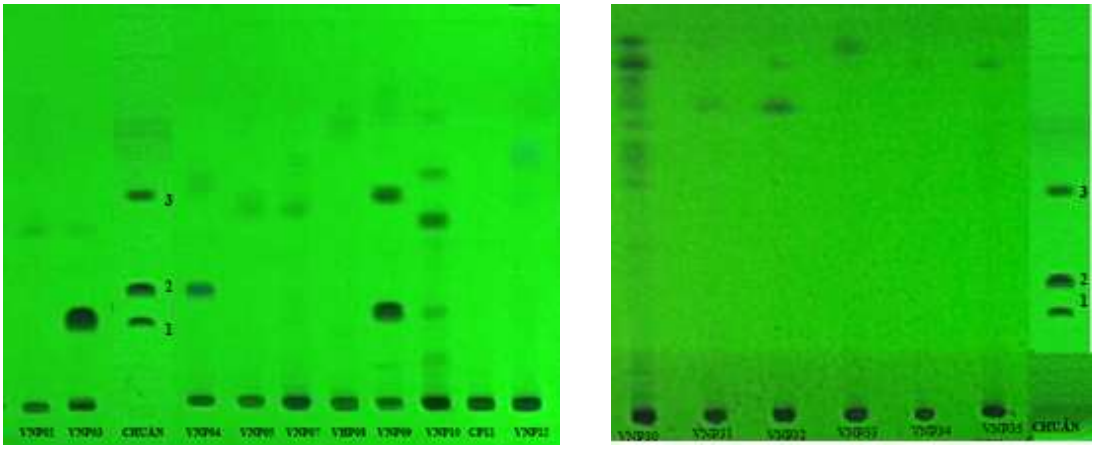
Bảng 3.32 Kết quả định tính các mẫu dương tính với nhóm giảm glucose máu

Mẫu thử	$m_{TB\ đơn\ vị}$ (g)	Liều dùng (đơn vị)	GLIB	GLIC	GLIP	GLIM
HCD09	0,2031	6	+	-	-	-
HMD10	3,0727	1 (*)	+	-	-	-
BD11	-	-	+	-	-	-
HCD13	0,2211	5 (*)	+	-	-	-

HCD18	0,2252	2	+	-	-	-
HCD19	0,2133	2	+	-	-	-
HCD22	0,1042	10	+	-		-
VND41	0,3346	1 (*)	+	-	-	-

3.4.1.4. Phát hiện nhóm ức chế PDE-5 trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương

24 mẫu chế phẩm đông dược dùng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lý của nam giới. Các mẫu chế phẩm được xử lý theo quy trình lựa chọn và phân tích bằng phương pháp HPTLC với các điều kiện đã chọn. Sau khi khai triển sắc ký, sấy khô bản mỏng và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, kết quả được minh họa Hình 3.53 và trình bày ở Phụ lục 3.4.1.

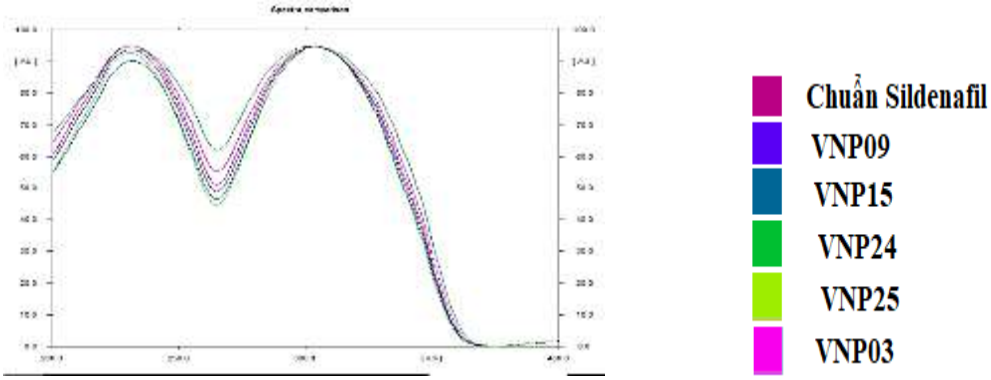


Hình 3.53.Sắc kí đồ phân tích các mẫu phát hiện nhóm ức chế PDE-5 với vị trí chuẩn 1-sildenafil, 2-vardenafil, 3-tadalafil

Kết quả cho thấy:

- Tại vị trí tương đương của chuẩn sildenafil có 06 mẫu nghi ngờ dương tính với sildenafil (VNP03, VNP09, VNP15, VNP24, VNP25, VNP10)
- Tại vị trí tương đương của tadalafil có 04 mẫu nghi ngờ dương tính với tadalafil (VNP09, VNP15, VNP24, VNP04)
- Tại vị trí tương đương của vardenafil có 01 mẫu nghi ngờ dương tính với vardenafil (VNP04)

Để khẳng định kết quả dương tính, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với chất chuẩn. Kết quả được minh họa ở Hình 3.54 và trình bày ở Phụ lục 3.4.2 và phụ lục 3.4.3.



Hình 3.54. Kết quả chồng phổ mẫu dương tính sildenafil

Từ kết quả chồng phổ ta thấy có 05 mẫu dương tính với sildenafil (gồm VNP03, VNP09, VNP15, VNP24, VNP25); 04 mẫu dương tính với tadalafil (gồm có VNP04, VNP09, VNP15, VNP24); 01 mẫu dương tính với vardenafil (mẫu VNP04). Kết quả được thể hiện ở *Bảng 3.33*

Bảng 3.33. Kết quả định tính các mẫu chế phẩm đông dược dương tính với dược chất nhóm ức chế PDE-5

Mẫu thử	m_{tb} đơn vị (g)	Liều dùng (đơn vị)	Sildenafil	Tadalafil	Vardenafil
VNP03	0,542	1	+	-	-
VNP04	0,228	2	-	+	+
VNP09	0,245	2	+	+	-
VNP15	0,246	2	+	+	-
VNP24	0,466	1	+	+	-
VNP25	0,572	2	+	-	-

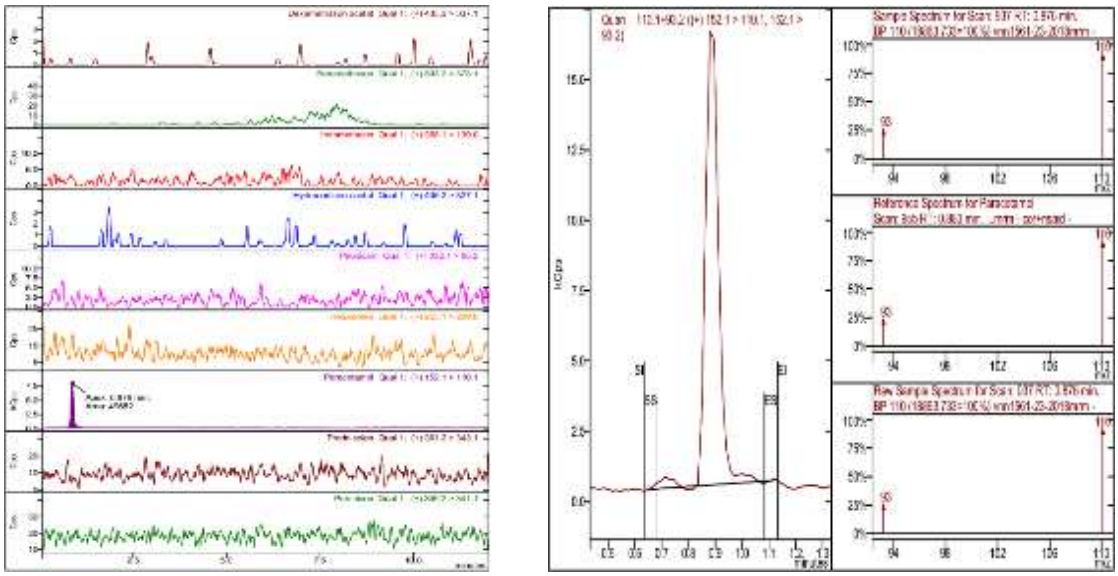
3.4.2. Ứng dụng phương pháp LC-MS/MS xác định các dược chất trộn lẫn trong chế phẩm đông dược

- ***Định tính:*** Định tính các hoạt chất có thể có trong mẫu thử dựa vào so sánh thời gian lưu, phổ khối và tỷ lệ đáp ứng của hai mảnh ion con đặc trưng của các hoạt chất có thể có trong mẫu thử với mẫu chuẩn.

- ***Định lượng:*** Tính nồng độ các chất phân tích trong dịch chiết dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng của các chất phân tích được thiết lập trong ngày. Từ nồng độ các chất phân tích (nếu có) trong dịch sau chiết, tính hàm lượng chất phân tích trong mẫu ban đầu bằng cách tính đến hệ số pha loãng sau nghi ngờ qua HPTLC.

3.4.2.1. Phát hiện nhóm giảm đau, chống viêm trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp

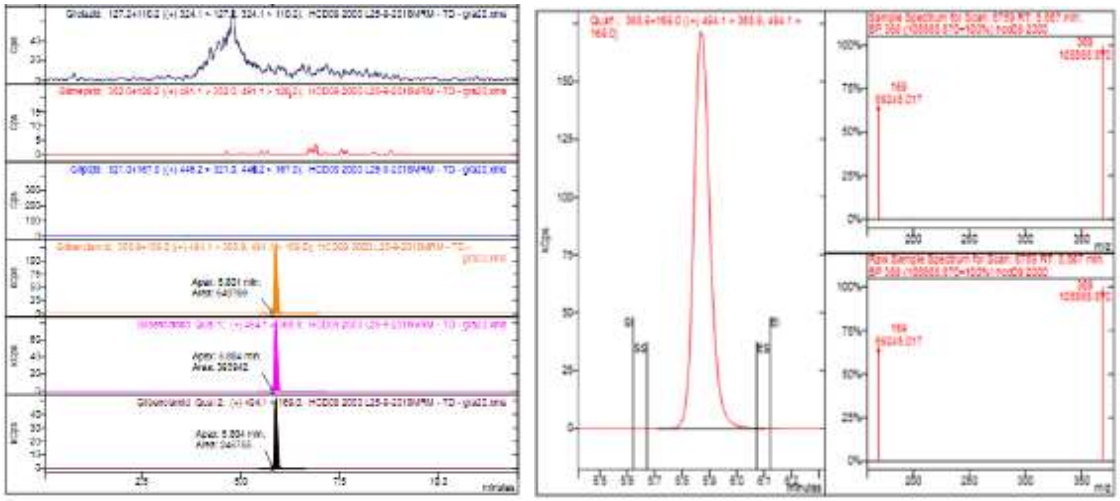
Kết quả đã phát hiện 11 chế phẩm bị trộn trái phép các hoạt chất giảm đau và chống viêm (cả nhóm NSAID và corticoid). Kết quả định tính và định lượng các chất được minh họa ở Hình 3.55, trình bày ở Bảng 3.34 và Phụ lục 2. Kết quả phân tích trên mẫu chế phẩm đông dược thu thập được đã phát hiện 11 chế phẩm bị trộn trái phép các hoạt chất giảm đau và chống viêm. Trong đó, phát hiện 7 mẫu dương tính với paracetamol (31,21-1318,62 mg/liều), 3 mẫu dương tính với dexamethason acetat (0,44-0,95 mg/liều). Đồng thời phát hiện 1 mẫu dương tính với cả hai chất paracetamol (485,21 mg/liều) và indomethacin (5,64 mg/liều), 1 mẫu dương tính với hai chất paracetamol (385,37 mg/liều mg/g) và dexamethason acetat (0,95 mg/liều).



Hình 3.55. Sắc ký đồ và phổ khối paracetamol trong mẫu VNN156

3.4.2.2. Phát hiện nhóm giảm glucose máu trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường

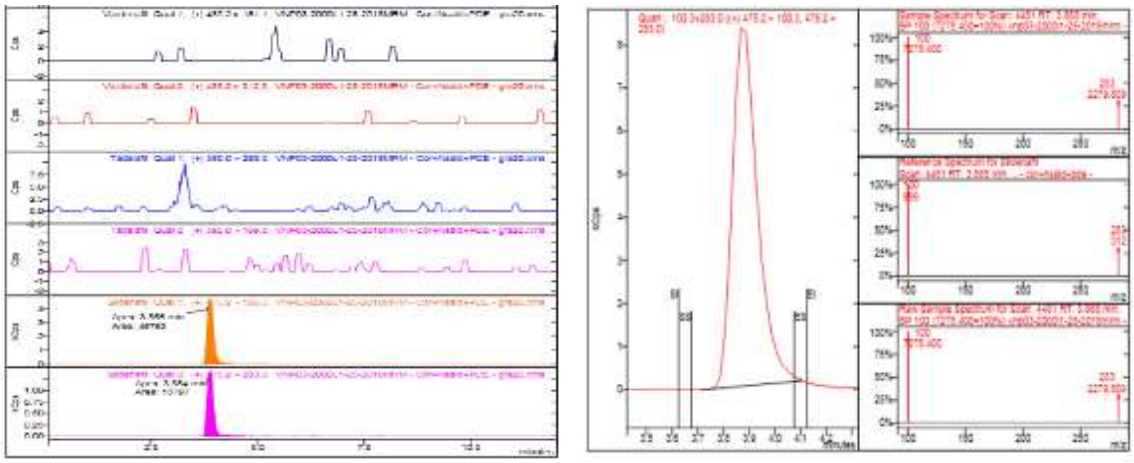
Áp dụng phương pháp đã xây dựng phân tích 41 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe do cỡ mẫu nhỏ. Mẫu thử được phân tích theo quy trình đã xây dựng. Kết quả 33/41 mẫu không phát hiện thấy có glibenclamid, glipizid, glimepird và gliclazid**,** 8/41 mẫu phát hiện có glibenclamid. Kết quả được minh họa ở Hình 3.56 và trình bày Bảng 3.34 và Phụ lục 2.



Hình 3.56. Sắc ký đồ và phổ khối glibenclamid trong mẫu dương tính HCD09

3.4.2.3. Phát hiện nhóm ức chế PDE-5 trên mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lực

Áp dụng phương pháp đã xây dựng phân tích 24 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Mẫu thử được phân tích theo quy trình đã xây dựng. Kết quả 18/24 mẫu không phát hiện thấy có sildenafil, tadalafil, vardenafil**,** 6/24 mẫu dương tính. Trong 06 mẫu dương tính, có VNP03, VNP25 dương tính với 1 hoạt chất là sildenafil (15,58 – 68,77 mg/1 liều dùng); VNP04 dương tính với tadalafil (5,89 mg/liều) và vardenafil (10,10 mg/ 1 liều dùng); VNP09, VNP15, VNP24 dương tính với sildenafil (58,61-70,00 mg/liều) và tadalafil (12,34-17,17 mg/liều). Kết quả được minh họa ở Hình 3.57 , trình bày ở Bảng 3.34 và Phụ lục 2.



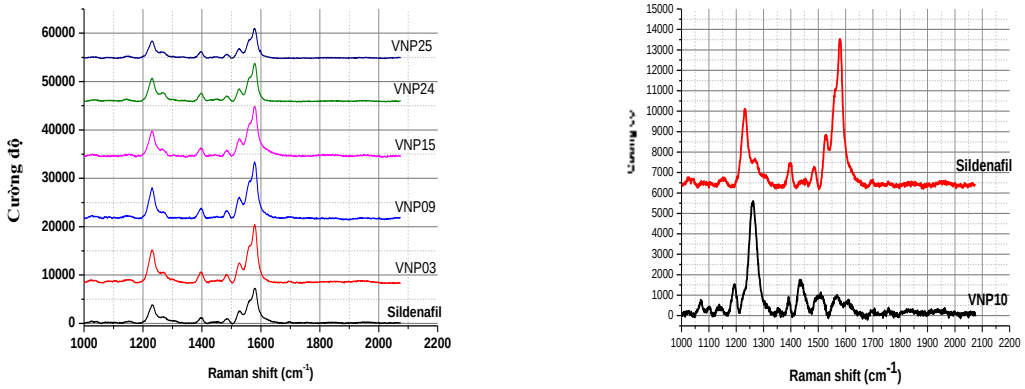
Hình 3.57. Sắc ký đồ và phổ khối sildenafil trong mẫu dương tính VNP03

Bảng 3.34. Kết quả các mẫu chế phẩm phát hiện có dược chất nghiên cứu

Mẫu thử	Đơn vị mẫu	m_{TB} đơn vị (g)	Chất phát hiện	Tỷ lệ mảnh con (%)		Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng (mg/đơn vị mẫu)	Hàm lượng (mg/liều 1 ngày)
				Định lượng	Định tính			
BN01	bột	6,341	PARA	81,9	21,1	76,52	485,21	485,21
			INDO	82,6	17,4	0,89	5,64	5,64
HCH08	hoàn	0,2203	PARA	80,2	19,8	9,45	2,08	31,21
BN51	bột	8,058	PARA	80,1	19,9	77,28	622,72	622,72
BNH091	bột	1,1210	PARA	81,2	18,8	28,65	32,12	64,24
HCH092	hoàn	5,6381	PARA	79,9	20,1	29,27	165,03	330,06
BNC101	bột	1,1904	DEXA	58,2	41,8	0,68	0,8050	0,81
HCH141	hoàn	0,6285	PARA	78,4	21,6	21,45	13,4802	134,80
VNN156	nang	0,558	PARA	80,6	18,9	590,78	329,66	1318,62
VNN162	nang	0,2586	PARA	79,1	20,9	475,82	123,05	369,14
HCH175	hoàn	0,157	DEXA	49,1	50,9	0,07	0,01	0,44
HCH176	hoàn	0,188	PARA	80,2	19,8	56,94	10,70	385,37
			DEXA	51,8	48,2	0,14	0,03	0,95
HCD09	hoàn	0,2031	GLIB	63,5	36,5	1,62	0,33	1,98
HMD10	hoàn	3,0727	GLIB	63,8	36,2	0,07	2,16	2,16
BD11	bột	-	GLIB	61,9	38,1	-	0,14	0,14
HCD13	hoàn	0,2211	GLIB	63,1	36,9	1,18	0,26	1,31
HCD18	hoàn	0,2252	GLIB	64,1	35,9	3,34	0,75	1,50
HCD19	hoàn	0,2133	GLIB	60,8	39,2	3,44	0,73	1,47
HCD22	hoàn	0,1042	GLIB	62,9	37,1	1,79	0,19	1,86
VND41	nang	0,3346	GLIB	62,8	37,2	1,68	0,58	0,58
VNP03	nang	0,542	SIL	77,2	22,8	126,88	68,77	68,77
VNP04	nang	0,228	TAD	87,5	12,5	12,92	2,95	5,89
			VAR	74,9	25,1	22,15	5,05	10,10
VNP09	nang	0,245	SIL	77,3	22,7	119,61	29,31	58,61
			TAD	85,7	14,3	35,04	8,59	17,17
VNP15	nang	0,246	SIL	78,4	21,6	100,33	24,68	49,36
			TAD	86,6	13,4	27,91	6,87	13,73
VNP24	nang	0,466	SIL	73,5	26,5	150,21	70,00	70,00
			TAD	82,7	17,3	26,48	12,34	12,34
VNP25	nang	0,572	SIL	78,8	21,2	33,43	15,58	15,58

3.4.3. Ứng dụng phương pháp TLC-SERS trên mẫu thực

Ứng dụng phương pháp để phân tích 24 mẫu chế phẩm đông dược thu thập được. Các mẫu chế phẩm được xử lý theo quy trình và phân tích bằng TLC – SERS với các điều kiện đã chọn. Kết quả thu được cho thấy trên sắc ký đồ TLC của 24 mẫu chế phẩm đông dược được khảo sát, phát hiện có 06 mẫu VNP03, VNP09, VNP10, VNP15, VNP24, VNP25 có vết tương ứng tại R_f của sildenafil chuẩn. Trên phổ SERS của 06 vết nghi nghờ cho kết quả Bảng 3.35, Hình 3.58 như sau:



(a) (b)

Hình 3.58. Phổ SERS của (a) các mẫu dương tính với sildenafil;(b) mẫu nghi ngờ có sildenafil dựa vào R_f tương ứng 0,21

Bảng 3.35. Bảng các đỉnh đặc trưng và tỉ lệ cường độ SERS ở các đỉnh của các mẫu dương tính sildenafil

VNP03	Raman shift (cm^{-1})	1231	1268	1398	1485	1527	1579
	Tỉ lệ	1,00	0,33	0,31	0,23	0,60	1,77
VNP09	Raman shift (cm^{-1})	1231	1268	1398	1485	1527	1579
	Tỉ lệ	1,00	0,29	0,34	0,27	0,70	1,83
VNP15	Raman shift (cm^{-1})	1232	1268	1397	1485	1527	1579
	Tỉ lệ	1,00	0,30	0,32	0,23	0,71	1,90
VNP24	Raman shift (cm^{-1})	1231	1268	1397	1485	1527	1580
	Tỉ lệ	1,00	0,36	0,36	0,23	0,56	1,67
VNP25	Raman shift (cm^{-1})	1231	1268	1397	1485	1527	1579
	Tỉ lệ	1,0	0,36	0,37	0,25	0,56	1,76

Nhận xét: Trong 6 mẫu nghi nghờ có chứa sildenafil thì có 5 mẫu gồm VNP03, VNP09, VNP15, VNP24, VNP25 cho tín hiệu SERS có các đỉnh đặc trưng trùng với các đỉnh đặc trưng của sildenafil chuẩn với tỉ lệ các đỉnh nằm trong ngưỡng dao động. Mẫu VNP10 không xuất hiện đỉnh nào trùng với các đỉnh đặc trưng của sildenafil (*Hình 3.58b*). Như vậy phương pháp TLC – SERS đã khẳng định được 5 mẫu dương tính với sildenafil trong tổng số 24 mẫu chế phẩm được khảo sát, đồng thời cũng khẳng định một mẫu dương tính giả bên TLC là mẫu VNP10.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng các nền mẫu chế phẩm đông dược

Do nhận thức được tính an toàn của các sản phẩm có nguồn gốc từ tự nhiên nên nhu cầu về sản xuất và sử dụng các chế phẩm có nguồn gốc thảo dược trong nước ngày càng tăng. Mặt khác, nguồn tài nguyên cây thuốc dồi dào và nền y học cổ truyền lâu đời của nước ta cũng là một trong những yếu tố thuận lợi cho thuốc có nguồn gốc từ thảo dược ngày càng chiếm được tin dùng. Hiện nay, các chế phẩm có nguồn gốc từ thảo dược được phát triển theo nhiều hướng khác nhau như các bài thuốc gia truyền được sản xuất tại các cơ sở sản xuất của các lương y, lương dược; các chế phẩm thuốc đông dược, thực phẩm chức năng có nguồn gốc từ thảo dược. Thuốc thành phẩm y học cổ truyền (thuốc đông y, thuốc từ dược liệu) là dạng thuốc y học cổ truyền đã qua tất cả các giai đoạn sản xuất, kể cả đóng gói và dán nhãn, bao gồm: Thuốc dạng viên, thuốc dạng nước, thuốc dạng chè, thuốc dạng bột, thuốc dạng cao và các dạng thuốc khác [8].

Về thành phần của các thuốc đông dược và TPBVSK hỗ trợ điều trị xương khớp cũng rất đa dạng. Các chế phẩm có thể chỉ có 1 hoặc nhiều thành phần là dược liệu. Các chế phẩm phổ biến có nhiều thành phần hơn, từ 2 tới 10 thành phần là dược liệu. Trong Danh mục thuốc cổ truyền được Bộ Y tế công nhận (Bản dự thảo lần 3) của Bộ Y tế ngày 31/10/2016 có rất nhiều bài thuốc có tác dụng làm mạnh gân cốt, giảm đau được chỉ định chữa các bệnh về xương khớp gồm:

- Theo Sách phụ nhân lương phương (gia giảm của bài Độc hoạt), bài thuốc *Tam tý thang* với thành phần gồm 16 vị dược liệu như Đảng sâm, hoàng kỳ, Bạch linh, Cam thảo, đương quy, xuyên khung, Bạch thược, sinh địa, đỗ trọng, ngưu tất, tục đoạn, tế tân, quế tâm, tần giao, độc hoạt, phòng phong.

- Theo Sách Tố Vấn bệnh cơ khí nghi Bảo mệnh tập, bài thuốc *Đại tần giao thang* với thành phần gồm 16 vị dược liệu như tần giao, thạch cao, đương quy, bạch thượng, xuyên khung, sinh địa, thục địa, bạch truật, bạch linh, cam thảo chích, hoàng cầm, phòng phong, khương hoạt, độc hoạt, bạch chỉ.

Bên cạnh đó, Dược điển Việt Nam V có bài thuốc là Độc hoạt ký sinh thang với thành phần gồm 15 dược liệu, công năng ích can thận, bổ khí huyết, khu phong tán hàn trừ thấp, thông kinh hoạt lạc như độc hoạt, tang ký sinh, thục địa, đỗ trọng, ngưu tất, tế tân, tần giao, bạch linh, quế tâm, phòng phong, xuyên khung, đảng sâm, cam thảo, đương quy, bạch thược. Chủ trị: Can, thận đều hư, phong hàn thấp gây đau nhức

mỏi, thắt lưng, đầu gối, các chi dưới co duỗi khó khăn, cảm giác nặng nề. Cao Hy thiêm thành phần gồm 2 dược liệu có công năng **t**hanh nhiệt, trừ thấp, tán phong, thông kinh chỉ thống. Chủ trị: Các chứng phong thấp sưng nóng đỏ đau, chân tay tê bại, đau lưng mỏi gối do phong thấp nhiệt gây nên như thiên niên kiện và hy thiêm.

Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã công bố các dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều bệnh đái tháo đường, nên nhiều chế phẩm đông dược ổn định đường huyết được quảng bá rộng rãi tại các nước. Tác giả Phùng Thị Thanh Hương cũng có rất nhiều nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của nhiều dược liệu như diệp hạ châu đắng [16], bằng lăng nước [17], dây thìa canh [18], mướp đắng .Tác giả Đỗ Trung Đàm [11], [12] đã có nghiên cứu sâu rất nhiều dược liệu như cây ngũ gia bì gai, cỏ xước, long nha thảo, tỏi, điều hay đào lộn hột, tri mẫu, xuyên tâm liên, hoàng kỳ, thương truật, sầu đâu, cây vang hay tô mộc, ớt, dừa cạn, dây bình bát, hoàng liên, đông trùng hạ thảo, sơn thù, thạch hộc. Từ các bài thuốc và nghiên cứu, đề tài đã xây dựng 3 nền mẫu hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường (Phụ lục 1).

Xã hội ngày càng phát triển, thói quen ăn uống, sinh hoạt, công việc dẫn tới tình trạng yếu sinh lý ở nam giới tăng lên nhiều. Nhu cầu sử dụng chế phẩm **hỗ trợ điều trị và điều trị bệnh yếu sinh lý** không ngừng tăng lên. Tuy nhiên, nếu sử dụng thuốc hóa dược có thể dẫn tới nhiều tác dụng phụ nguy hiểm. Do đó, người bệnh tìm đến và sử dụng chế phẩm có nguồn gốc thiên nhiên với suy nghĩ là không độc hại.

Về thành phần của các thuốc đông dược và TPBVSK hỗ trợ điều trị bệnh yếu sinh lý cũng rất đa dạng. Các chế phẩm có thể chỉ có 1 hoặc nhiều thành phần là dược liệu. Các chế phẩm phổ biến có nhiều thành phần hơn, từ 2 tới 10 thành phần là dược liệu. Các dược liệu phổ biến nhất được sử dụng trong các chế phẩm này là nhung hươu, cá ngựa, ba kích … Trong Danh mục thuốc cổ truyền được Bộ Y tế công nhận (Bản dự thảo lần 3) của Bộ Y tế ngày 31/10/2016 có rất nhiều bài thuốc có tác dụng bổ thận, tráng dương như Điều nguyên cứu bản thang, thận khí hoàn, an trung tán, bổ dương tiếp âm phương. Theo Hải thượng Y tông tâm lĩnh, bài thuốc Điều nguyên cứu bản thang gồm 6 vị dược liệu như bạch truật, hoài sơn, thục địa, thỏ ty tử, phá cổ chỉ, nhục quế. Bài thuốc có công năng **b**ổ tỳ thận dương; chủ trị tỳ thận dương hư: ỉa lỏng, phù thũng, hư trướng, chảy dãi, ho, đau đỉnh đầu [30].

Dược điển Việt Nam IV và V có bài thuốc chế viên hoàn Sâm Nhung bổ thận gồm 23 vị dược liệu, có công năng bổ thận, cố tinh. Chủ trị thận hư, phòng sự yếu, di mộng tinh, kinh nguyệt không đều, khí hư bạch đới, đau thắt lưng, mỏi gối, ù tai. Bài

thuốc này đã được chuyển thành sản phẩm Sâm Nhung bổ thận lưu hành trên thị trường, được nhiều người tin dùng.

Theo tác giả Phan Tấn Tô trong đề tài "Nguồn gốc bài thuốc Minh Mạng thang và đề xuất các bài thuốc phù hợp trong sản xuất rượu Minh Mạng" do Sở Khoa học - Công nghệ và Môi trường Thừa Thiên-Huế chủ trì, năm 1997, bài thuốc Minh Mạng thang có tác dụng hỗ trợ điều trị mỏi lưng gối, người giảm chức năng sinh lý, giúp bổ khí huyết, bổ thận, tráng dương, tăng cường sinh lý. Tiếp tục nghiên cứu này, tác giả Đặng Thị Mai Hoa [15] đã sưu tầm, biên dịch và đề xuất hướng sử dụng các bài thuốc của Thái y viện triều Nguyễn cũng chỉ rõ tác dụng của bài thuốc Minh Mạng thang trong đó có các thành phần dược liệu như thục địa, nhân sâm, ba kích, đương quy, đỗ trọng, kỷ tử, hoàng kỳ, cúc hoa, đại táo, dâm dương hoắc, cam thảo, xa tiền tử, táo nhân, hoài sơn, nhục thung dung, xà sàng tử, viễn chí, ngũ vị tử, phá cố chỉ, liên nhục.

Từ các các bài thuốc và các dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị và điều trị các bệnh xương khớp, bệnh đái tháo đường và bệnh liệt dương giúp tăng cường sinh lực trên, đề tài đã tiến hành xây dựng 9 nền mẫu được bào chế tại phòng nghiên cứu sản phẩm của Công ty Traphaco. Do đó, các nền mẫu này đại diện chung các nhiều sản phẩm đông dược đang lưu hành trên thị trường.

4.2. Phương pháp LC-MS/MS

4.2.1. Xây dựng quy trình chiết xuất các thuốc tân dược trong chế phẩm đông dược

Với mục tiêu nghiên cứu nhằm xác định chất cấm trộn trái phép trong chế phẩm đông dược, thì quá trình xử lý mẫu yêu cầu hiệu suất chiết 16 hóa dược nghiên cứu phải rất cao, trong nhiều nền mẫu chế phẩm dược liệu phức tạp với nhiều dạng bào chế khác nhau. Để cân bằng 2 yếu tố này, đề tài đã khảo sát từng nhóm hoạt chất dược lý dựa vào cấu trúc hóa học, tính tan và liều điều trị theo Dược Điển Việt Nam V [9], Dược thư quốc gia Việt Nam [4] và một số tài liệu khác [86], [136], .

4.2.1.1. Kỹ thuật xử lý mẫu thử có trộn lẫn các thuốc giảm đau, chống viêm

Các thuốc giảm đau, chống viêm gồm có nhóm glucorticoid, nhóm NSAID và nhóm giảm đau khác. Trong đó, nhóm glucorticoid thường không tan trong nước, ít tan trong ethanol [9], [47], [136]. Nhóm NSAID ít tan trong nước, tan được trong methanol và ethanol, metyl clorid [9], [47], [136]. Nhóm giảm đau khác chủ yếu paracetamol, thường ít tan trong nước, dễ tan trong dung dịch kiềm, ethanol 96%,

methylen clorid [9], [47], [136]. Với phương pháp LC-MS thì dung môi chiết chủ yếu là methanol như nghiên cứu của Maciej Bogusz [46]. Bên cạnh đó, Qionglin Liang và cộng sự [98] đã chiết mẫu bằng dung môi pha động methanol : Nước : TFA (78 :22 :0,1); hay methanol : nước (70: 30) theo Hyung Joo Kim [88]; hay ethanol 96% theo Aik-Jiang Lau [92]. Ngoài ra, một số hệ dung môi khác như methanol: H_20 (80:20) theo Akash A.Savaliya định tính bằng LC-MS-TOF, định lượng bằng HPLC [122]. Đề tài đã khảo sát chiết với các dung môi ethanol 96%, hỗn hợp methanol : nước (30:70), hỗn hợp methanol : nước (50:50), hỗn hợp methanol : nước (70:30) và methanol theo các tài liệu tham khảo [46], [88], [141], [51], [92]. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết methanol cho 9 hoạt chất phân tích của nhóm NSAID và corticoid là cao nhất, qui trình xử lý đơn giản như các nghiên cứu của Maciej Bogus [46]; Johannes Weist [141], So-Hyun Cho [51], Cao Công Khánh [20].

4.2.1.2. Kỹ thuật xử lý mẫu thử có trộn lẫn các thuốc giảm glucose máu

Các thuốc giảm glucose máu đặc biệt nhóm sulfonylurea thường ít tan trong nước, methanol, tan trong chloroform và ether [9], [47], [136]. Tuy nhiên, nếu sử dụng chloroform và ether làm dung môi chiết xuất thì lượng tạp dược liệu rất lớn, gây nhiễu đến kết quả phân tích. Do đó, một số nhóm nghiên cứu vẫn lựa chọn methanol là dung môi chiết thuốc giảm glucose máu trộn lẫn trong chế phẩm đông dược như Ning Li [97] sử dụng phương pháp UPLC-MS/MS để phát hiện và định lượng 14 loại thuốc chống đái tháo đường; hay Wensheng Pang [113]; Maciej J. Bogusz [46]. Methanol cũng được sử dụng trong phương pháp HPLC theo Vũ Ngọc Thắng [35]; phương pháp HPTLC theo tác giả Shweta S. Havel [70]. Kenichi Kumasaka [90] đã chiết mẫu với aceton, sau đó dịch chiết đem tiến hành TLC và HPLC. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu đã cho thấy methanol vẫn cho hiệu suất chiết tối ưu trong 4 hoạt chất nhóm giảm glucose máu, tương tự các nghiên cứu [97], [113]. Đề tài đã tiến hành khảo sát methanol, methanol: nước (20 :5), acetonitril, ethanol theo các tài liệu tham khảo [97], [35]. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất chiết methanol cho 4 hoạt chất phân tích của nhóm giảm glucose máu là cao, qui trình xử lý đơn giản theo như các nghiên cứu của Vũ Ngọc Thắng [35], Ning Li [97], Wensheng Pang [113], Maciej J. Bogusz [46].

4.2.1.3. Kỹ thuật xử lý mẫu thử có trộn lẫn các thuốc ức chế PDE-5

Các thuốc nhóm ức chế PDE-5 gồm sildenafil citrat, tadalafil, vardenafil hydroclorid thường ít tan trong nước, methanol và ethanol [86], [129], [47], [136]. Tuy nhiên, một

số nghiên cứu sử dụng methanol làm dung môi chiết như Reni Septiani và Sophi Damayanti [123], Tiên T.K. Do [60] trong phương pháp HPTLC; như Stéphane Balayssac trong HPLC [45]; như Ying Zhang [148], Maciej J. Bogusz [46], trong phương pháp LC-MS/MS. Tuy nhiên, một số tác giả như Eung-Sun Lee và các cộng sự [93] đã chiết mẫu với 25 ml MeOH/water (70:30) để phân tích đồng thời 38 hợp chất sildenafil, tadalafil, vardenafil và các dẫn chất của chúng bằng phương pháp LC – ESI – MS/MS. Mặt khác, Khaled Al-Tahami sử dụng acetotril để chiết mẫu phát hiện bằng TLC; dùng dung dịch chiết mẫu bằng acetonitril – H_2O (50:50) trong phương pháp HPLC. Do đó, đề tài đã khảo sát các dung môi chiết mẫu gồm methanol; methanol-nước =70: 30; methanol-nước-amoniac= 75 : 25 :1 ; acetonitril theo các tài liệu tham khảo. Kết quả đã cho thấy hiệu suất chiết tương đối cao (trên 90%) đồng thời vẫn làm sạch được mẫu, giúp quy trình LC-MS/MS đạt giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, sử dụng methanol tương tự các nghiên cứu [123], [45], [148], [46].

Xử lý mẫu là bước quan trọng ảnh hưởng tới độ chính xác của phương pháp phân tích. Đề tài tiến hành phân tích với số lượng mẫu chế phẩm đông dược, TPBVSK dạng viên nang, viên hoàn và cao thuốc, thuốc bột, đây là những nền mẫu phức tạp, nền mẫu dược liệu phát huỳnh quang mạnh. Do đó, cần phải xây dựng quy trình xử lý mẫu đơn giản phù hợp với 16 hoạt chất khác nhau, đạt yêu cầu phân tích và hiệu suất phải cao.

4.2.2. Xây dựng phương pháp phân tích LC-MS/MS

Phương pháp LC-MS/MS hiện nay được sử dụng phổ biến trên thế giới để phân tích các chất cấm trộn trong chế phẩm đông dược, thuốc y học cổ truyền do có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, phương pháp cũng được đưa vào phân tích nhiều chất trong các nền mẫu khác nhau như thực phẩm, dịch sinh học, nước thải… nhưng trên nền mẫu chế phẩm đông dược thì phương pháp vẫn chưa được đưa vào ứng dụng nhiều.

Trên các dạng nền mẫu đông dược đa dạng, chứa các thành phần dược liệu và tá dược phức tạp, khác nhau về cả tỷ lệ và thành phần giữa các nhà sản xuất, các phương pháp sắc ký thông thường như TLC, HPLC, HPTLC có thể gặp phải khó khăn ngay cả với yêu cầu đơn giản là định tính phát hiện. Nếu chỉ định tính dựa vào kết quả TLC bằng cách so sánh R_f (tương quan quãng đường dịch chuyển với chất chuẩn) thì có thể dẫn đến kết quả dương tính giả, phát hiện được nhiều mẫu dương tính hơn so với

thực tế khi vết dược liệu trùng với vết tân dược. Đối với HPLC và HPTLC, cũng có thể có kết quả dương tính giả nếu chỉ so sánh thời gian lưu t_R đơn thuần. Tuy nhiên, nếu thiết bị cho phép quét và chồng phổ UV-VIS với chất chuẩn thì sẽ cho kết quả chính xác hơn TLC. Cụ thể, khi pic dược liệu trùng với pic chuẩn, có thể phát hiện được và kết luận âm tính nếu hệ số match không đạt. Tuy vậy, nếu chế phẩm dương tính (có trộn tân dược) ở hàm lượng nhỏ, đồng thời pic lại bị trùng với một dược liệu nào đó ở hàm lượng lớn hơn, có thể cũng cho hệ số match không đạt. Đây là trường hợp cho kết quả âm tính giả, và nếu bỏ qua việc chồng phổ (kết luận dương tính), thì kết quả định lượng sẽ mắc sai số lớn do đã định lượng thêm cả thành phần dược liệu vào. Vì vậy, đề tài chúng tôi xây dựng phương pháp LC-MS nhằm khắc phục các khó khăn trên, với ưu điểm vượt trội về độ nhạy và độ đặc hiệu, phương pháp có khả năng loại bỏ sự ảnh hưởng của nền mẫu dược liệu phức tạp, thích hợp với hầu hết các nền chế phẩm đông dược trên thị trường và cho kết quả chính xác hơn.

Trong phương pháp LC-MS với chế độ bắn phá mảnh ion, lựa chọn điều kiện khối phổ và điều kiện sắc ký là rất quan trọng để đạt được độ đặc hiệu cao. Các thông số về MS của phương pháp đã đạt yêu cầu theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) khi có ít nhất 4 điểm IP (1 ion mẹ và 2 ion con định tính và định lượng) [54]. Về các thông số sắc ký lỏng, tốc độ dòng pha động phải phù hợp với lượng khí phun và áp suất đầu phun. Nếu tốc độ dòng quá thấp, thời gian phân tích sẽ dài và ảnh hưởng đến hình dạng pic. Ngược lại, nếu tốc độ dòng quá cao so với tốc độ ion hóa thì sẽ làm mất mẫu hoặc làm lẫn nhiều tạp dung môi, đồng thời làm tăng áp suất và làm giảm tuổi thọ của cột sắc ký. Khảo sát và lựa chọn tốc độ dòng 0,3 ml/phút cùng với khảo sát nhiều hệ dung môi và các cột sắc ký, đề tài đã xây dựng phương pháp tách được các chất nghiên cứu có pic gọn cân đối, thời gian lưu tương đối ngắn**,** cường độ tín hiệu pic phù hợp với áp suất cột ổn định. Đặc biệt, nhằm giúp cho việc phát hiện các tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược được chính xác, với độ tin cậy cao hơn. Ngoài việc dựa vào thời gian lưu và phổ khối của các chất phân tích như trong các nghiên cứu của tác giả Maciej J. Bogusz [46], Hyung Joo Kim [88], Akash A. Savaliya [122], nghiên cứu đã xác định thêm tỷ lệ của hai mảnh ion con đặc trưng bị bắn phá, giúp tăng độ chính xác và tin cậy của phép định tính, khẳng định đúng sự có mặt của các chất trộn lẫn. Do vậy, mặc dù prednison và prednisolon hay sildenafil và vardenafil có thời gian lưu gần nhau, nhưng với sự lựa chọn các mảnh mẹ và mảnh con của hai chất này hoàn toàn khác nhau, đã khẳng định tính chọn lọc ưu việt của detector khối phổ. Đề tài đã xây dựng một chương trình sắc ký chung phát hiện 16

hoạt chất nghiên cứu trong chế phẩm đông dược với các chế độ ESI (+) phù hợp với từng nhóm dược lý trên cùng cột Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm), nhiệt độ cột 40^0C, thể tích tiêm 2µl. Do đó, phương pháp xây dựng đã thể hiện khả năng ứng dụng cao trong thực tiễn, là điểm mới của đề tài.

Hệ thống máy LC-MS/MS EVOQ được hỗ trợ phần mềm tự động tối ưu hóa các điều kiện khối phổ của các chất phân tích thông qua tính năng Optimizer; tự động định danh các chất trong mẫu thử dựa vào các thông số thời gian lưu, hệ số các mảnh con định tính, định lượng, dựa diện tích píc, so sánh phổ mẫu thử và mẫu chuẩn. Do đó, kết quả qua hệ thống LC-MS/MS này đã gia tăng tính tin cậy và minh bạch hơn các hệ thống khác.

4.2.3. Thẩm định phương pháp LC-MS/MS

Thông qua thẩm định phương pháp LC-MS/MS, kết quả cho thấy phương pháp được xây dựng đã đạt được độ đúng và độ chính xác phù hợp, đáp ứng với yêu cầu của ICH 2005 và AOAC 2016 trên 9 nền mẫu tự tạo [43], [84]. Quan trọng nhất là phương pháp có độ đặc hiệu đạt yêu cầu theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) [54] khi có ít nhất 4 điểm IP (1 ion mẹ và 2 ion con định tính và định lượng) và độ nhạy cao, phù hợp trong việc phân tích trên nền mẫu có nhiều thành phần phức tạp như mẫu đông dược. Mặc dù, độ thích hợp hệ thống có RSD của diện tích pic <5,0% là hơi cao, nhưng độ đúng và độ chính xác vẫn đạt yêu cầu phân tích theo AOAC. Sở dĩ, tính thích hợp hệ thống về một số chất trên 2% là do nồng độ của các chất phân tích thấp, thể tích tiêm mẫu nhỏ và không sử dụng chuẩn nội nên dẫn đến sai số lớn.

Tại Việt Nam, nghiên cứu của Nguyễn Quang Nam và cộng sự (2011) tiến hành phát hiện nhanh 6 glucorticoid pha trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng kỹ thuật khối phổ với chế độ tiêm mẫu trực tiếp. Với nguồn ion ESI (+), chế độ MS/MS, LOD của mẫu chuẩn dexamethason, betamethason, prednison, prednisolon, dexamethason acetat, hydrocortison acetat pha trong MeOH và acid formic 0,1% lần lượt là 0,2 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,2 µg/ml và của mẫu giả lập thêm chuẩn lần lượt là 1 µg/ml; 1 µg/ml; 5 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml; 1 µg/ml [20]. Tại Trung Quốc (2009), Huang Ping và Ling Xiao đã dùng LC-MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+) phát hiện prednison và dexamethason acetat trong chế phẩm đông dược với LOD lần lượt là 0,3 ng/ml và 0,2 ng/ml [116]. Tại Hàn Quốc (2014), để phát hiện các chất giảm đau chống viêm trộn lẫn trong chế phẩm đông dược, bằng phương pháp LC-MS với nguồn ESI (+), Hyung Joo Kim và cộng sự đã xây dựng

phương pháp với LOQ của paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen lần lượt là 100; 20; 25; 0,5 ng/ml [88]; So-Hyun Cho và cộng sự đã xây dựng phương pháp với LOQ của dexamethason, betamethason, prednisolon, hydrocortison acetat lần lượt là 1,88; 0,94; 1,88; 0,94 ng/ml [51]. Nghiên cứu chúng tôi đã đánh giá độ chọn lọc của các nhóm giảm đau, chống viêm trên 3 nền bài thuốc cổ truyền Độc hoạt tang ký sinh thang, Đại tần giao thang và Tam tý thang ở 3 dạng bào chế viên nén, viên nang, thuốc bột, thể hiện tính đặc hiệu cao hơn so với nhiều nghiên cứu như Đào Văn Đôn [13] chỉ làm trên bột, Lê Đào Khánh Long [26] trên 1 bài thuốc giả lập, Venkata Sairam K [139] trên nền bột; và tương tự với Akash A. Savaliya [122]. Phương pháp LC-MS/MS được xây dựng có khả năng định tính và định lượng được đồng thời 9 hoạt chất giảm đau chống viêm với LOD trong khoảng 0,076 – 0,606 ng/ml và LOQ trong khoảng 0,25 – 2 ng/ml, giá trị này tương đương hoặc thấp hơn so với các nghiên cứu về phát hiện tân dược trong đông dược đã thực hiện tại Việt Nam và trên thế giới. Trong khoảng khảo sát, tất cả các chất nghiên cứu đều có mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic với nồng độ với $r > 0,995$.

Đối với nhóm giảm glucose máu, nghiên cứu của Li Ning [97] đã định tính với 14 chất trong đó glipizid, gliclazid, glibenclamid và glimepirid có LOD tương ứng 2,0; 0,95; 1,92; 5,45 ng/ml và LOQ tương ứng 4,0; 1,9; 3,84; 10,9 ng/ml là kết quả của nghiên cứu có LOD và LOQ thấp hơn so với với LOD nằm trong khoảng 0,9-2,0 ng/ml, còn LOQ là 1,9-10,9 ng/ml. Wensheng Pang [113] đã xây dựng phương pháp LC-MS với 10 chất trong nhóm giảm glucose máu trong đó glipizid, gliclazid, glibenclamid và glimepirid có LOQ tương ứng 1,0; 1,2; 2,0; 3,0 ng/ml. Nghiên cứu chúng tôi đã xây dựng phương pháp với 4 hoạt chất có LOD từ 0,3-0,4 ng/ml và LOQ trong khoảng 1,0-1,2 ng/ml, giá trị này tương đương hoặc thấp hơn với các nghiên cứu của Li Ning [97] và Wensheng Pang [113]**.** Bên cạnh đó, quá trình khảo sát được tiến hành trên 3 nền mẫu đặc trưng cho các chế phẩm đông dược điều trị và hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường, giúp ổn định đường huyết, đặc hiệu hơn so với nghiên cứu Wensheng Pang [113] chỉ làm trên viên nang và viên nén.

Đối với nhóm ức chế PDE-5, nghiên cứu của Ying Zhang [148] đã xây dựng phương pháp phát hiện 4 chất trong chế phẩm đông dược trong đó LOQ của sildenafil, vardenafil và tadalafil trong khoảng 10,0- 1,0 ng/ml. Nghiên cứu của Ji Hyune Lee [94] đã xây dựng phương pháp với 48 hoạt chất nhóm ức chế PDE-5 trong đó sildenafil, tadalafil và vardenafil có LOQ tương ứng là 10,0; 1,5; 3,0 ng/ml. Nghiên cứu chúng tôi đã xây dựng phương pháp với 3 hoạt chất có LOD từ 0,3-1,3 ng/ml và

LOQ trong khoảng 1,0-4,0 ng/ml, giá trị này tương đương hoặc thấp hơn với các nghiên cứu [94], [148]. Tuy nhiên, các kết quả này vẫn còn cao so với nghiên cứu của Eung-Sun Lee [93]. Bên cạnh đó, quá trình khảo sát được tiến hành trên 3 nền mẫu đặc trưng cho các chế phẩm đông dược điều trị và hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương, giúp tăng cường sinh lực, đặc hiệu hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Hảo [112] chỉ với 1 nền mẫu.

Như vậy, phương pháp LC-MS/MS phát hiện vừa định tính vừa định lượng các mẫu thực và là phương pháp qui chiếu cho các phương pháp mới xây dựng; nhược điểm cơ bản là thiết bị đắt tiền, thời gian xử lý và phân tích mẫu dài. So sánh với phương pháp HPLC-DAD chỉ dựa vào t_R và phổ UV thì độ đặc hiệu không cao bằng LC-MS. Do đó, việc sử dụng phương pháp LC-MS/MS là cần thiết để khẳng định kết quả dương tính, phân biệt tân dược và dẫn chất của chúng dựa vào tỷ lệ ion con định tính và định lượng. Phương pháp LC-MS/MS đã được xây dựng và thẩm định theo đúng hướng dẫn AOAC và EC, thể hiện nhiều điểm vượt trội hơn về độ chính xác, giới hạn phát hiện hơn hẳn nhiều nghiên cứu trước đây.

4.3. Phương pháp HPTLC

4.3.1. Xây dựng phương pháp phân tích HPTLC

Phương pháp HPTLC với ưu điểm chính là phân tích đồng thời được nhiều mẫu cùng một lúc trong cùng một điều kiện sắc ký, do đó tiết kiệm được thời gian phân tích, hóa chất đồng thời cũng cho độ lặp lại cao. Hệ thống HPTLC có ưu điểm hơn so với các hệ thống sắc ký lỏng như HPLC hay LC-MS là mẫu không nhất thiết phải xử lý quá sạch trước khi tiêm vào cột như hệ thống sắc ký lỏng, hơn nữa hệ thống HPTLC sử dụng bản mỏng có kích thước 20x10cm có thể phân tích tối đa 17 mẫu trong một lần triển khai sắc ký chỉ trong vòng khoảng 30 phút nhưng với hệ thống sắc ký lỏng phải phân tích từng mẫu một, thời gian phân tích một mẫu tầm 10 phút, nên thời gian phân tích bằng sắc ký lỏng sẽ lâu hơn rất nhiều. Bên cạnh đó, sau khi phân tích, nếu dùng phương pháp sắc ký lỏng sẽ tốn thêm dung môi và thời gian để rửa cột. Do đó phương pháp HPTLC được lựa chọn để đáp ứng mục tiêu chính của đề tài là khảo sát sơ bộ, sàng lọc trên số lượng lớn các mẫu chế phẩm đông dược thu thập được trên thị trường trộn lẫn một số thuốc thuộc nhóm giảm đau chống viêm trong thời gian nhanh nhất. Để sàng lọc nhanh các mẫu chế phẩm có thể chỉ cần dùng bản mỏng TLC với phương pháp so sánh giá trị R_f của mẫu thử và mẫu chuẩn (tương

quan giữa quãng đường dịch chuyển với chất chuẩn). Trên nền mẫu phức tạp (thuốc đông dược, TPBVSK) với ưu điểm là quy trình xử lý mẫu đơn giản trước khi đưa vào hệ thống sắc ký, độ nhạy cao, trong 1 lần phân tích có thể phân tích đồng thời được nhiều mẫu trong thời gian ngắn, tiết kiệm thời gian phân tích, tiết kiệm chi phí và cho kết quả nhanh. Phương pháp này phù hợp với cả phân tích định tính và định lượng, các thông số của quá trình phân tích được ghi lại và kiểm soát chặt chẽ, do đó có độ lặp lại cao. Dựa vào các đặc điểm trên, đề tài đã lựa chọn chọn phương pháp HPTLC để định tính các thuốc nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu và ức chế PDE-5 trong các chế phẩm đông dược dùng để điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp, bệnh tiểu đương và bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lý của nam giới.

- Nhược điểm: Do mẫu phân tích là các chế phẩm đông dược hoặc thực phẩm bảo vệ sức khỏe là những mẫu có thành phần rất phức tạp, nếu chỉ dựa vào kết quả TLC (hình ảnh sắc kí trên bản mỏng phát hiện ở bước sóng 254 nm và so sánh tương quan quãng đường dịch chuyển với chất chuẩn) thì có thể dẫn đến kết quả dương tính giả (phát hiện được nhiều mẫu dương tính hơn so với thực tế vì có thể là vết dược liệu trùng với chuẩn) nên cần áp dụng HPTLC. Tiến hành quét phổ và chồng với phổ của chất chuẩn sẽ cho kết quả chính xác hơn. Tuy nhiên khi chồng phổ, một số vết có cùng cực đại hấp thụ tại các bước sóng như chất chuẩn nhưng hình dạng pic không hoàn toàn trùng khớp (hệ số match không đạt). Nguyên nhân có thể là do các chất không tách khỏi hoàn toàn được dược liệu trong thành phần của chế phẩm đông dược hoặc TPBVSK. Trong trường hợp này, nếu không xác định là dương tính thì có thể bị bỏ qua các mẫu có trộn trái phép (âm tính giả) còn nếu xác định là dương tính thì kết quả định lượng sẽ bị sai do đã định lượng thêm cả thành phần dược liệu vào. Vì vậy, nên áp dụng những phương pháp có khả năng loại bỏ sự ảnh hưởng của dược liệu như HPLC, LC-MS, từ đó cho kết quả chính xác hơn.

Chỉ nên sử dụng phương pháp HPTLC để bước đầu phát hiện và định lượng sơ bộ xem chế phẩm có bị trộn trái phép các chất và có vượt quá nồng độ cho phép hay không.

Với nhóm glucorticoid, nghiên cứu đã khảo sát 5 hệ dung môi khác nhau để có thể tách 5 chất phân tích dựa trên nghiên cứu của Lê Đào Khánh Long [26]. Tuy nhiên, cả 5 hệ đều không tách được 5 chất phân tích thành các vết gọn, riêng biệt, có R_f nằm trong khoảng 0,2 - 0,8. Có thể do điều kiện độ ẩm và nhiệt độ khác nhau giữa hai nghiên cứu dẫn đến kết quả khác nhau. Tuy sắc ký đồ của hệ 2: Cloroform - aceton

- H_2O (8:2:5) tách được 5 chất nhưng R_f của các vết còn thấp. Nghiên cứu cũng đã tiến hành thay đổi tỷ lệ dung môi của hệ 2 nhưng vẫn không tăng được R_f của các vết, mặt khác việc hệ dung môi có cả pha thân dầu và thân nước, khi pha hệ dung môi phải sử dụng bình gạn để tách riêng 2 lớp, gây bất tiện trong quá trình phân tích. Nhận thấy hệ 1 và 3 đều có ethyl acetat và đều tách được dexamethason acetat và hydrocortison acetat; hệ 5 thì tách được 3 chất betamethason, prednisolon và prednison nhưng không tách được 2 chất còn lại, các vết đều có R_f cao. Do đó nhóm nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm khảo sát tiếp hệ A: $CHCl_3$ - EtOAc - EtOH với tỷ lệ 8:1:1, kết quả cho thấy hệ tách được các chất với R_f cao, 2 vết dexamethason acetat và hydrocortison acetat còn dính nhau. Do đó nghiên cứu lựa chọn hệ A để khảo sát dung môi, thu được hệ B: $CHCl_3$ - EtOAc - EtOH (8,5:1:1) tách được 5 chất, cho vết gọn, có R_f trong khoảng 0,2 - 0,8.

Với nhóm NSAID, Wisnuwardnani H. A.[142] đã xây dựng phương pháp phát hiện đồng thời piroxicam và paracetamol (acetaminophen) bằng HPTLC bằng hệ dung môi chloroform – methanol (9:1). Tuy nhiên, hệ này chỉ tách được 2 chất paracetamol, piroxicam tuy nhiên không tách được indomethacin và ketoprofen. Do đó, đề tài đã không sử dụng hệ này. Đề tài đã lựa chọn hệ pha động n-hexan : ethyl acetat: acid acetic (6:2,5:1,5) tách được 4 chất cần phân tích, các vết gọn, với R_f của paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen lần lượt là: 0,18; 0,30; 0,36; 0,43.

Kumasaka K. [90] đã sử dụng hệ dung môi n-butyl acetat chứa 0,4% acid formic 6 thuốc nhóm sulfonylurea tolbutamid, acetohexamid, chlorpropamid, gliclazid, glibenclamid, và glimepirid. Tuy nhiên, R_f của glipizid, glimepirid, glibenclamid, gliclazid lần lượt là 0,08; 0,23; 0,26; và 0,31; có thể tách được riêng các chất nhưng R_f nhỏ, vết glibenclamid và glimepirid không tách rõ ràng. Độ dài quãng đường triển khai dung môi và sắc kí có ảnh hưởng đến R_f và khả năng tách của các chất. Tỷ lệ acid formic cũng ảnh hưởng đến khả năng tách của các chất: nồng độ quá thấp (0,3%) thì hệ dung môi pha động không có khả năng tách được hỗn hợp chất; nồng độ cao (0,6%) thì tách được 4 chất nhưng các chất kéo vết dài. Do đó, đề tài đã tối ưu hệ dung môi này tăng tỷ lệ acid formic 0,5% để các vết có R_f cao hơn và sắc ký đồ analog của các chất rõ hơn.

Nhóm ức chế PDE-5, nghiên cứu đã tiến hành quét phổ ứng với vết của các chất phân tích trên bản mỏng ở các bước sóng từ 200-700nm, xác định độ hấp thụ cực đại của sildenafil, tadalafil, vardenafil và đã lựa chọn được bước sóng phù hợp là 251nm

đối với vardenafil, 285nm đối với tadalafil và 304nm đối với sildenafil để phát hiện khi tích phân lấy kết quả định lượng các chất.

Tác giả Khaled Al-Tahami [40] đã sử dụng TLC để phát hiện sildenafil, tadalafil và vardenafil trong các thực phẩm chức năng với hệ dung môi pha động cloroform/ methanol-NH_3 (90:1:5). Trong luận án này cũng đã khảo sát hệ dung môi pha động trên tuy nhiên R_f của tadalafil còn cao, sildenafil và vardenafil vẫn còn sát nhau nên hệ này không được lựa chọn. Kết quả cũng hoàn toàn tương tự với hai hệ ethanol-n-hexan-amoni hydroxid (70:30:1) của tác giả X, Hu [79] và hệ Terbutyl methyl ether–methanol–amoniac 28% (20 : 2 :1) của tác giả Tiên T.K. Do [60].

Đối với hệ ethylacetat-isopropanol-NH_3 25 % (45:5:1) được tham khảo từ tác giả Reni Septiani và Sophi Damayanti [123] thì cả 3 chất đều tách được nhau tuy nhiên giá trị R_f của sildenafil còn thấp. Nghiên cứu đã điều chỉnh tỉ lệ amoniac trong hệ trên thì thu được hệ ethylacetat-isopropanol-NH_3 25% (45:5:2,6) có khả năng tách cả 3 chất sildenafi, tadalafil, vardenafil cho vết gọn, rõ nét với giá trị R_f trong khoảng 0,2 - 0,8.

4.3.2. Thẩm định phương pháp HPTLC

Với nhóm glucocorticoid, nghiên cứu đã khảo sát độ đặc hiệu của phương pháp trên 3 nền mẫu tự tạo, là những nền tiệm cận gần sát các nền chế phẩm đông dược đang lưu hành trên thị trường. Phương pháp đã đạt độ đạc hiệu trên 3 nền đã khảo sát, nhưng với số lượng mẫu lớn, các nền đông dược rất đa dạng có thể dẫn đến có vết trùng với chất phân tích trên sắc ký đồ gây dương tính giả, nhiều hơn nghiên cứu của Lê Đào Khánh Long [26]. Trong nghiên cứu, Lê Đào Khánh Long sử dụng thuốc thử hiện màu nên có giới hạn phát hiện như betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison aceatat, prednisolon, prednison tương ứng là 50; 100, 16, 100, 200 ng/vết. Chutima Limmatvapirat [53] đã xây dựng phương pháp phát hiện dexamethason và prednisolon bằng TLC kết hợp thuốc thử hiện màu xanh tetralozium clorid, có giới hạn phát hiện các chất tương ứng là 10 µg/vết. Do vậy, đề tài nghiên cứu có giới hạn phát hiện các chất betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison aceatat, prednisolon, prednison từ khoảng 20-120 ng/vết là khá thấp so với các nghiên cứu trên.

Với nhóm NSAID, Wisnuwardnani H. A.[142] đã xây dựng phương pháp phát hiện đồng thời dexamethason, prednison, piroxicam và acetaminophen bằng HPTLC

đã đánh giá độ đặc hiệu trên 3 nền mẫu, nhưng chỉ lựa chọn bước sóng cực đại cho 4 chất đều là 254 nm. Đề tài đã thẩm định phương pháp trên 3 nền mẫu placebo gồm dạng viên nang, viên nén, thuốc bột, xác định giới hạn phát hiện dựa trên các bước sóng cực đại khác nhau của 4 chất nghiên cứu. Kết quả sắc ký đồ cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu đảm bảo để phân tích đồng thời paracetamol, piroxicam, ketoprofen, indomethacin trên nền các chế phẩm đông dược.

Đối với nhóm giảm glucose máu, Kenichi Kumasaka [90] đã phát hiện glibenclamid, gliclazid, glimeprid bằng đèn UV và thuốc thử hiện màu với giới hạn các chất là 250 ng/vết. Phương pháp được thẩm định trên 3 nền mẫu placebo gồm dạng viên nang, viên hoàn và viên nén. Kết quả sắc ký đồ cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu đảm bảo để phân tích đồng thời glibenclamid, glimepirid, gliclazid, glipizid trên nền các chế phẩm đông dược. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng: LOD của glipizid, glimepirid, glibenclamid, gliclazid lần lượt là 60-120 (ng/ vết) cho thấy phương pháp có độ nhạy tương đối tốt hơn nghiên cứu của Kumasaka K. [90].

Đối với nhóm ức chế PDE-5, phương pháp được thẩm định trên 3 nền mẫu placebo gồm dạng viên nang, viên hoàn và cao thuốc. Kết quả sắc ký đồ cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu đảm bảo để phân tích đồng thời sildenafil, tadalafil, vardenafil trên nền các chế phẩm đông dược. Giới hạn phát hiện của phương pháp HPTLC đối với sildenafil là 157 ng/vết, của tadalafil là 174 ng/vết và vardenafil là 188 ng/vết. Giới hạn phát hiện này cũng có sự tương đồng với tài liệu mà Reni Septiani và Sophi Damayanti [123] đã công bố.

Đặc biệt, tác giả Do.T.T.K [60] đã phân tích rất rõ hiện tượng chồng phổ ở các nồng độ khác trên toàn phổ của sildenafil 2 mg/ml với mẫu thử nồng độ gốc và nồng độ pha loãng 10 lần (mẫu thực chứa sildenafil); hay tadalafil 2 mg/ml với mẫu thử nồng độ gốc và nồng độ pha loãng 10 lần (mẫu thử chứa tadalafil). Do T.T.K đã nhận xét hệ số chồng phổ và phổ UV của mẫu thử nồng độ gốc không tốt so với chất chuẩn do nồng độ mẫu thực quá cao. Nếu pha loãng mẫu thử 10 lần thì hệ số chồng phổ rất cao, phổ UV trùng khít với chất chuẩn. Bên cạnh lý giải của tác giả, thiết nghĩ nguyên nhân còn có thể là dược liệu trong mẫu thử ảnh hưởng đến phổ tân dược có trong mẫu thử. Tương tự, tác giả Wisnuwardnani H. A.[142] đã so sánh toàn phổ của chất chuẩn piroxicam, acetaminophen, dexamethason, prednison và mẫu thử để đưa ra kết luận chặt chẽ và rõ ràng hơn. Do đó, đề tài luôn chú ý đến các mẫu dương tính giả, bên cạnh hệ số chồng phổ dao động 0,99 và luôn có sự so sánh toàn phổ UV của mẫu

chuẩn và mẫu thử ở các nồng độ, hạn chế bỏ sót những trường hợp nhầm lẫn. Ví dụ cụ thể, nếu căn cứ chỉ R_f thì có 16 mẫu dương tính với glibenclamid, nhưng khi chồng phổ UV thì chỉ còn 9 mẫu dương tính thật, nên tỷ lệ dương tính giả là 50%. Từ đó, các kết quả dương tính HPTLC được khẳng định tốt bằng phương pháp LC-MS/MS.

Tóm lại, phương pháp HPTLC phát hiện nhanh mang tính sàng lọc mẫu chế phẩm đông dược trên số lượng mẫu lớn và đa dạng về thành phần dược liệu. Kết quả định tính của phương pháp không chỉ dựa vào R_f mà còn dựa vào hệ số tinh khiết pic và hệ số chồng phổ UV của pic thử với chuẩn, nên tương tự với HPLC-DAD. Nhược điểm cơ bản là giới hạn phát hiện (LOD) còn cao, định tính dựa vào phổ UV nên đặc hiệu thấp. Do đó, phương pháp HPTLC thể hiện khả năng định tính nhanh tại địa phương, phòng thí nghiệm thiếu LC-MS/MS. Tuy nhiên, phương pháp HPTLC chưa thể định tính độc lập như phương pháp LC-MS/MS.

4.4. Phương pháp TLC-SERS

4.4.1. Lựa chọn phương pháp

- Phương pháp HPTLC mặc dù là một phương pháp đơn giản, có thể dùng để sàng lọc nhanh các mẫu chế phẩm đông dược được trộn trái phép tân dược nhưng độ nhạy và độ tin cậy của phương pháp còn chưa cao. Giới hạn phát hiện sildenafil bằng HPTLC vẫn cao (157 ng/ vết). Kết quả phân tích mẫu dựa vào việc chồng phổ UV của mẫu với phổ UV của chất chuẩn. Tuy nhiên bằng thực nghiệm nghiên cứu cho thấy có những vùng phổ UV của mẫu không trùng với phổ UV của chất chuẩn. Cụ thể, mẫu dương tính sildenafil VNP03 có một vùng phổ không trùng với vùng phổ của sildenafil chuẩn, hệ số chồng phổ chỉ bằng 0,891 và kết quả cho thấy đây là mẫu âm tính. Tuy nhiên khi pha loãng mẫu với tỉ lệ 1:10 thì phổ hoàn toàn trùng với phổ của chất chuẩn với hệ số chồng phổ đạt 0,99. Những nghiên cứu này hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu của tác giả Tiên T.K. Do [60] khi xây dựng phương pháp HPTLC để phát hiện 3 chất ức chế PDE -5 (sildenafil, vardenafil, tadalafil) và 8 chất tương tự chúng. Để khẳng định chắc chắn các kết quả HPTLC, Tiên T.K. Do đã sử dụng phương pháp đối chiếu là HPTLC/ESI-MS. Đó cũng chính là động lực cho phương pháp TLC-SERS được phát triển trong luận án.

Với các chế phẩm đông dược được trộn trái phép tân dược thì hàm lượng tân dược được trộn lẫn thường chiếm tỉ lệ thấp, nền dược liệu phát huỳnh quang mạnh và không bền với nhiệt của tia laser là một thách thức lớn với quang phổ raman. Do đó,

sự kết hợp giữa TLC – SERS trong đó SERS là một kỹ thuật nhạy trên bề mặt, có thể tăng cường từ 10^4 – 10^6 lần so với quang phổ Raman bình thường và TLC có khả năng tách tốt các dược chất ra khỏi nền mẫu sẽ khắc phục các nhược điểm trên của quang phổ raman. Nghiên cứu này đã tiến hành xây dựng phương pháp TLC – SERS cùng với phương pháp HPTLC với mục đích là phát triển thêm một phương pháp đơn giản, nhanh chóng với độ nhạy và độ tin cậy cao để có thể khẳng định chắc chắn thêm các kết quả trong HPTLC. Mẫu sau khi cố định trên tấm TLC, quét phổ UV để sàng lọc nhanh có thể tiếp tục được sử dụng để đo phổ SERS. Một phổ SERS có thể thu được một cách nhanh chóng và vẫn bao gồm tất cả các ưu điểm của quang phổ Raman bình thường. Phổ là duy nhất cho các hợp chất duy nhất và do đó cho phép phương pháp này được sử dụng như là một kỹ thuật để nhận dạng với độ chính xác cao. Phương pháp TLC – SERS sẽ giúp giảm lượng nguyên vật liệu, thiết bị và thời gian cần thiết để phân tích chất được kiểm soát khi so sánh với các phương pháp hiện đại mà vẫn tuân thủ các tiêu chuẩn do SWGDRUG đưa ra.

Do thời gian nghiên cứu có hạn, đề tài mới xây dựng được quy trình phát hiện sildenafil trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược bằng TLC – SERS.

4.4.2. Xây dựng quy trình định tính sildenafil bằng TLC – SERS

Dựa theo tài liệu tham khảo [108] nghiên cứu đã điều chế được hỗn dịch keo bạc trong nước có các yêu cầu sau: các hạt keo có kích thước đồng đều, kích thước trung bình 33,7 nm; keo có cực đại hấp thụ ở 413 nm, nồng độ keo là nồng độ ban đầu sau khi chế tạo. Keo được điều chế đã thành công trong việc phát hiện sildenafil trộn trái phép các chế phẩm đông dược với độ nhạy cao.

Kết quả phổ UV của keo bạc và hình ảnh TEM có kết quả cực đại UV của keo bạc là 417 nm, dao động trong khoảng kích cỡ keo bạc 50-60 nm của nhiều nghiên cứu [108], [140], [95], [144]. Các đặc trưng phổ hấp thụ và ảnh TEM của keo Ag, đỉnh hấp thụ của keo Ag ở tại bước sóng 417 nm với độ bán rộng (FWHM) gần khoảng 77 nm. Điều này chỉ ra rằng kích thước trung bình của hạt nano lớn và sự phân bố kích thước hẹp [125], [96]. Từ Ảnh TEM cho thấy kích thước hạt trung bình khoảng gần 30 nm, và sự phân bố kích thước hạt được thể hiện như đồ thị nhỏ bên trong Ảnh TEM. Kết quả này góp phần quan trọng cho sự tăng cường tín hiệu của SERS [151].

✓ Phương pháp tiến hành: dung dịch chuẩn sildenafil được tiến hành TLC với hệ dung môi pha động ethylacetat – isopropanol – amoniac 25% (45: 5: 2,6). Sau khi rửa giải, tấm TLC được để làm khô tự nhiên, các điểm phân tách được quan sát và đánh dấu ở bước sóng 254 nm. Hỗn dịch keo bạc (1,5 µl) được nhỏ trực tiếp tới mỗi điểm được đánh dấu trên tấm TLC. Phổ SERS cho mỗi điểm phân tách được ghi lại bằng máy quang phổ Raman, với bước sóng kích thích 632,8 nm, thời gian ghi tín hiệu 60s, vị trí chiếu tia laser là 0,35mm tính từ tấm vết.

✓ Các đỉnh đặc trưng của phổ SERS của sildenafil: 1232; 1268; 1398; 1485; 1527; 1580 cm^{-1} với dao động tỉ lệ các đỉnh tương ứng là 1,00; 0,33-0,36; 0,26-0,36; 0,24-0,26; 0,56-0,70; 1,56-2,01. Các đỉnh này hoàn toàn tương đồng với các đỉnh mà tác giả Hang Zhao [149] đã sử dụng lý thuyết phiếm hàm mật độ (DFT) để xác định. Các đỉnh đặc trưng của sildenafil là 1527 cm^{-1} (δ NH+ δ CH), 1580 cm^{-1} (vòng thơm C=C), tương tự với Dan-Zhuo Mao [102]. Một số đỉnh 1232, 1485, 1527 cm^{-1} lặp lại so với Hu.X. [79] và các đỉnh này đã được tác giả sử dụng phần mềm toán học để xác định, xem Bảng 4.1.

✓ Phổ SERS của sildenafil trong methanol ở các nồng độ khác nhau từ 0,02-0,2 mg/ml chấm trên bản mỏng TLC với một số đỉnh lý thuyết của sildenafil trong một số nghiên cứu [149], [102]. Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn nồng độ sildenafil dựa trên cơ sở giảm dần đến một nồng độ nhỏ nhất mà vẫn còn có thể phát hiện được bằng SERS. Kết quả cho thấy cường độ đỉnh Raman đặc trưng cho sidenafil giảm khi giảm nồng độ. Chẳng hạn ở đây xét hai đỉnh cao nhất đặc trưng là 1232 và 1580 cm^{-1} được phóng đại để quan sát được. Sự thay đổi cường độ đỉnh Raman theo nồng độ khác nhau được làm khớp theo mô hình tuyến tính với hệ số tương quan tương ứng với đỉnh 1232 cm^{-1} và 1580 cm^{-1} lần lượt là 0,976 và 0,989. Điều này đã chỉ ra rằng cường độ của các đỉnh đặc trưng cho sidenafil tăng tuyến tính khi tăng nồng độ, tương tự như nghiên cứu của Zhengjun Xie trên histamin bằng TLC-SERS [143]. Đây cũng là một kết quả khá quan trọng cho thấy phương pháp SERS cũng là một cách tiếp cận có tiềm năng cho việc ứng dụng phát hiện và phân tích định tính hoặc bán định lượng sildenafil.

Bảng 4.1. Các đỉnh và dao động trên lý thuyết và thực nghiệm của sildenafil

Lý thuyết/cm^{-1}	Bột/cm^{-1}	SERS/cm^{-1}	Mô tả
638	648	649	δ(Ring 2)+$\nu(C_{28}-O_5)$
709	736	-	
-	749	-	
-	782	781	

801	816	816	δ(Ring 3)+$\nu(C_{23}-O_4)$+$\delta(N_8=C_{21}=N_{11})$
913	926	921	$\delta(C_{31}-C_{29}-C_{27})$
1040	1101	1088	$\delta(C_{30}-H_x)$+δ(Ring 4)
1177	-	1145	δ(Ring 1)+δ(Ring 2)
-	1223	-	
1242	1238	1232	$\delta(C_{23}=C_{19}-C_{21})$
1277	1270	1269	$\delta(C_{18,20,24,27,29,31}-H_x)+\nu(N_8-H_{48})$
1316	-	1314	$\nu(C_{26}-C_{28})$+ δ(Ring 1)
1394	1404	1399	$\nu(C_{32}-C_{33})+\delta(C_{16}=C_{18}=C_{19})+\delta$(Ring 1)
1435	1441	-	$\nu(C_{26}=N_{33})+\delta(C_{27,30}-H_x)$
1457	1465	-	$\delta(C_{17,29,30,32}-H_x)$
1482	1485	1483	$\delta(C_{30,32}-H_x)$
1533	1529	1529	$\nu(C_{21}=N_{11})+\nu(C_{26}=N_9)+\delta(C_{22}=C_{25})$
1567	1563	1560	δ(Ring 2)+δ(Ring 3)
1578	1581	1582	δ(Ring 3)+$\delta(C_{25}=C_{22}=C_{26})+\nu(C_{21}=N_8)$
1603	1601	1596	δ(Ring 3)+$\delta(N_8-C_{21})$

Lưu ý: ν-dao động kéo; δ-dao động uốn.

Các kết quả cho thấy cường độ của hai đỉnh này tăng khá nhanh tương ứng với thể tích từ 0,5 µl đến 1,5 µl, và bắt đầu tăng chậm khi thể tích lớn hơn 1,5 µl. Điều này là do khi nhỏ tăng dần dung dịch keo Ag lên bản mỏng silicagel thì số lượng hạt nano Ag được kết tụ càng nhiều nên nó tăng cường cường độ Raman. Tuy nhiên, khi tăng dần dung dịch keo Ag trên 1,5 µL thì do "hiệu ứng giọt cà phê" và làm giảm số lượng kết tụ của các hạt nano Ag đồng thời có kéo theo các vết sildenafil ra biên vành của vết loang nên đã dẫn đến cường độ SERS tăng chậm. Hơn nữa với thể tích keo lớn hơn 3 µL, vết loang dung dịch bị tràn ra khỏi biên vòng tròn giới hạn đánh dấu vết của mẫu trên bản mỏng. Khi một giọt dung dịch lỏng được nhỏ và làm khô trên bề mặt một bản mỏng rắn, vật chất huyền phù của nó bị kết tủa trên bản mỏng như kiểu vòng tròn. Các kết quả cho thấy cường độ hai đỉnh 1232 cm^{-1}; 1580 cm^{-1} của vết sildenafil thay đổi theo các vị trí khác nhau; cường độ tăng dần từ vị trí 1 đến vị trí 5 và sau đó giảm dần đến vị trí thứ 9, Hình 3.45. Vị trí có cường độ cực đại nằm tại giữa vành tròn của "hiệu ứng giọt cà phê" (CRE). Điều này đã chỉ ra rằng sau khi được nhỏ dung dịch keo bạc, do hiệu ứng giọt cà phê kép CRE đã làm phân bố lại các hạt keo Ag và phân tử sildenafil trên bản mỏng. Trong quá trình cô cạn trên bản mỏng, các cạnh giọt gắn vào bề mặt của đế, và dòng mao dẫn chảy ra bên ngoài từ tâm của giọt di chuyển các hạt huyền phù đến các biên như quá trình bay hơi. Sau khi bay hơi,

các hạt huyền phù được giữ lại với nồng độ cao dọc theo biên giọt ban đầu. CRE xảy ra trong các hệ với các thành phần khác nhau trong dải các chất keo lớn đến các hạt nano [152]. Hiện tượng này được biết đến trong nghiên cứu của Zhu Q. [152], nhưng chỉ mới thấy được vết loang của keo bạc mà clozapine không loang trên bản mỏng. Đây là điểm mới của luận án trong quá trình xây dựng TLC-SERS so với các nghiên cứu trước.

4.4.3. Thẩm định phương pháp TLC-SERS

✓ ***Độ đặc hiệu:*** Phương pháp được thẩm định trên 3 nền mẫu placebo gồm dạng viên nang, viên hoàn và cao thuốc. Kết quả phổ SERS thu nhận được cho thấy cho thấy sildenafil có các tín hiệu đặc trưng tái lặp quanh các dịch chuyển SERS chính của chất chuẩn. Nền mẫu ảnh hưởng không đáng kể đến vị trí các đỉnh đặc trưng của sildenafil. Do đó, phương pháp có độ đặc hiệu cao đảm bảo để phát hiện sildenafil trong các chế phẩm đông dược,

✓ ***Giới hạn phát hiện:*** Phương pháp được thẩm định theo AOAC, có giới hạn phát hiện là 2 ng/vết. Giới hạn phát hiện này tương tự so với tài liệu mà các tác giả Hu Xiaopeng [79] và tác giả Zhao Hang [149]. Bên cạnh đó, giới hạn này thấp hơn so với mức nhỏ nhất (1%) mà sildenafil thường được trộn vào trong thuốc đông dược để cho hiệu quả cao và tức thì. Do đó, phương pháp xây dựng được đảm bảo để phát hiện sildenafil trộn trái phép trong các thuốc đông dược.

Như vậy, phương pháp TLC-SERS đã được xây dựng và thẩm định đạt theo tiêu chuẩn AOAC 2016, với giới hạn phát hiện thấp hơn phương pháp HPTLC trên cùng dược chất sildenafil trong chế phẩm đông dược. Lần đầu tiên, hiệu ứng giọt cà phê kép đã được mô tả cụ thể giúp cho quy trình xây dựng đạt yêu cầu phân tích. Từ đó, phương pháp TLC-SERS thể hiện tính khả thi của mình trên nhiều nhóm dược chất khác trong quá trình ứng dụng thực tiễn.

4.5. Đánh giá khả năng ứng dụng của các phương pháp

4.5.1. Ứng dụng phương pháp HPTLC để phân tích mẫu thực

4.5.1.1. Nhóm glucocorticoid

Do chỉ đóng vai trò kiểm định lại phương pháp, nên cách thu thập mẫu chưa được hệ thống hóa, chưa có hệ thống tìm mẫu, nên nghiên cứu chỉ thu thập những chế phẩm đông dược trên thị trường đang điều trị về các bệnh xương khớp. Quá trình

thu thập mẫu chỉ là ngẫu nhiên dựa trên các sản phẩm đã có và đặc biệt dựa trên các phản ứng của người bệnh gặp các tác dụng không mong muốn khi dùng thuốc. Các kết quả thu được từ 119 mẫu chỉ mang tính sơ bộ để cho các nhà chức năng sử dụng một quy trình thu thập mẫu hệ thống hơn, có thể đánh giá chính xác tình trạng trộn corticoid trong chế phẩm đông dược hiện nay. Việc khảo sát được 119 mẫu, là một số lượng mẫu khá lớn cũng cho thấy ưu điểm của phương pháp HPTLC là có thể khảo sát nhanh chóng rất nhiều mẫu, đóng vai trò như một bước sàng lọc mẫu trong việc phát hiện các thuốc tân dược trộn trái phép.

Phương pháp HPTLC còn phát hiện được nhiều các kết quả dương tính giả, một mặt cho thấy các nền mẫu rất đa dạng và phương pháp khó có thể đạt được độ chọn lọc trên tất cả các nền. Ngoài ra, các kết quả từ LC – MS/MS cũng cho thấy phương pháp HPTLC có độ tin cậy cao, loại bỏ được các trường hợp dương tính giả của TLC.

4.5.1.2. Nhóm NSAID

Đáng chú ý hơn nữa, cả 9 mẫu chế phẩm phát hiện trộn trái phép đều không có số đăng ký và có tới 6 chế phẩm của cùng các nhà thuốc gia truyền đông y. Qua đây ta có thể thấy việc trộn trái phép thuốc giảm đau chống viêm vào chế phẩm đông dược vẫn được diễn ra và phần lớn các chế phẩm này được mua ở các cơ sở gia truyền và đều không có số đăng ký. Do đó, cần đẩy mạnh việc thu thập mẫu hơn nữa tại các cơ sở thuốc gia truyền ở các tỉnh, thành phố để phát hiện sớm và có thể có các biện pháp xử lý kịp thời để bảo vệ quyền lợi và sức khỏe cho người tiêu dùng.

4.5.1.3. Nhóm giảm glucose máu

Ứng dụng phương pháp HPTLC xây dựng được phân tích 41 mẫu chế phẩm đông dược lưu hành trên thị trường, bao gồm 22 mẫu có số đăng ký được mua tại các nhà thuốc, 19 mẫu không có số đăng ký được đặt mua qua các trang mạng internet, của lương y hoặc do người dùng nghi ngờ yêu cầu kiểm tra. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu thử không phát hiện có glipizid, glimepirid, gliclazid; phát hiện 08 mẫu (VND41, HCD09, HCD18, HCD19, HCD22, HCD13, BD11, HMD10) có trộn lẫn glibenclamid. Các mẫu phát hiện có trộn lẫn glibenclamid đều là những mẫu không có số đăng ký, chiếm tỷ lệ khoảng 20% trong số các mẫu thu thập được và 42% trong số các mẫu không có số đăng ký này. Điều này cho thấy tình trạng trộn trái phép thuốc tân dược vào các chế phẩm đông dược không được quản lý là khá lớn với nhóm giảm glucose máu.

4.5.1.4. Nhóm ức chế PDE-5

Ứng dụng phương pháp HPTLC xây dựng được phân tích 24 mẫu chế phẩm đông dược lưu hành trên thị trường, bao gồm 22 mẫu có số đăng ký được mua tại các nhà thuốc, 02 mẫu không có số đăng ký được đặt mua qua các trang mạng internet, của lương y hoặc do người dùng nghi ngờ yêu cầu kiểm tra. Điều này cho thấy tình trạng trộn trái phép các thuốc tân dược vào các chế phẩm đông dược dùng để điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh lý rối loạn cương dương và tăng cường sinh lực nam giới vẫn đang diễn ra. Do đó, cần tăng cường hơn nữa công tác kiểm tra, giám sát chất lượng các chế phẩm đông dược lưu hành trên thị trường, tránh những ảnh hưởng không tốt tới sức khỏe người sử dụng.

Trong quá trình ứng dụng, nếu chỉ dựa theo R_f của TLC để kết luận mẫu thì tỷ lệ dương tính giả gặp phải ở một số dược chất như paracetamol (47%), indomethacin (75%), glibenclamid (50%), sildenafil (16%). Phương pháp HPTLC với TLC scanner cho phép quét phổ UV, độ tinh khiết pic và cho kết quả dương tính thật tốt hơn với yêu cầu hệ số match và purity lớn 0,99, xem thêm kết quả dương tính ở Phụ lục 3. Đây là ưu điểm vượt trội của HPTLC.

4.5.2. Ứng dụng phương pháp LC-MS/MS trong phân tích các mẫu thực

4.5.2.1. Nhóm giảm đau, chống viêm

Trong nghiên cứu này đã phát hiện 7 mẫu dương tính với paracetamol (31,21-1318,62 mg/liều), 3 mẫu dương tính với dexamethason acetat (0,44-0,95 mg/liều). Đồng thời phát hiện 1 mẫu dương tính với cả hai chất paracetamol (485,21 mg/liều) và indomethacin (5,64 mg/liều), 1 mẫu dương tính với hai chất paracetamol (385,37 mg/liều mg/g) và dexamethason acetat (0,95 mg/liều).

Ngoài việc dựa vào thời gian lưu và phổ khối (3 mảnh khối đặc trưng của mỗi chất gồm 1 mảnh mẹ và 2 mảnh con, trình bày trong *Bảng 3.1* và *Bảng 3.2*) của các chất phân tích như trong các nghiên cứu thường gặp [29], [48], [65], phương pháp xác định thêm tỷ lệ đáp ứng của hai mảnh ion con đặc trưng. Việc này giúp tăng độ chính xác và tin cậy của phép định tính, khẳng định đúng sự có mặt của các chất trộn lẫn. Điều đó đã cho thấy tính thích hợp của phương pháp này trong việc xác định đồng thời nhiều tân dược thuộc nhiều nhóm thuốc khác nhau trộn lẫn trong một nền mẫu đông dược phức tạp trên cùng một lần phân tích, nhằm đảm bảo kết quả phân tích chính xác, nhanh chóng và tiện lợi.

Theo Dược thư quốc gia Việt Nam [4], liều dùng của dexamethason acetat là 0,75 – 9 mg/liều/ngày, hàm lượng trộn dexamethason acetat trong BNC101 là 0,81 mg/liều, trong HCH176 là 0,95 mg/liều, là những hàm lượng có tác dụng điều trị, còn HCH175 với hàm lượng trộn 0,44 mg/liều có tác dụng như hỗ trợ điều trị. Việc trộn dexamethason acetat vào 3 chế phẩm trên có thể để thể hiện tác dụng hoặc hỗ trợ điều trị và khó phát hiện ở liều thấp, nếu không biết người dùng có thể nhầm tưởng đó chính là tác dụng của các dược liệu tự nhiên trong chế phẩm đó. Việc dùng lâu ngày dexamethason acetat có thể dẫn đến rối loạn điện giải: Hạ kali huyết, giữ natri và nước gây tăng huyết áp và phù nề, loét dạ dày tá tràng, loãng xương, teo cơ hồi phục,... rất nguy hiểm cho người dùng [4]..

Liều điều trị trong ngày của paracetamol dao động khá lớn từ 80-3900 mg/liều/ngày và của indomethacin từ 25-200 mg/liều/ngày, hàm lượng trộn paracetamol trong các mẫu BN 51, HCH 092, VNN 156, VNN 162 và HCH 176 đều nằm trong khoảng liều có tác dụng điều trị, các mẫu còn lại đều trộn với hàm lượng thấp hơn liều điều trị, có thể coi là liều có tác dụng hỗ trợ điều trị. Đối với các chế phẩm đông dược có tác dụng với bệnh xương khớp thường được sử dụng dài ngày nên với mức liều kể trên có thể gây ra hiện tượng tích lũy liều dẫn đến một số tác dụng phụ có hại cho sức khỏe của người tiêu dùng, đặc biệt paracetamol có tác dụng phụ rất nguy hiểm trên gan.

4.5.2.2. Nhóm giảm glucose máu

Áp dụng phương pháp đã xây dựng phân tích 41 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ bệnh đái tháo đường, trong đó các mẫu dương tính glibenclamid có hàm lượng glibenclamid từ 0,14-2,16 mg/liều; thấp hơn liều lượng dược lý thường từ 2,5 - 5 mg/ngày và tối đa 15 mg/ngày [4]. Do đó, mục đích trộn lẫn glibenclamid trong chế phẩm đông dược chỉ hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường và sử dụng trong thời gian đánh lừa người bệnh tin rằng tác dụng hạ đường huyết là do các thành phần có nguồn gốc từ thảo dược. Tuy nhiên, các tác dụng phụ của glibenclamid là rất rõ ràng nên người bệnh sẽ chịu đựng nhiều tác dụng như rối loạn tiêu hoá, vàng da ứ mật, mỏi cơ, viêm mạch dị ứng, chóng mặt, rối loạn tâm thần, ban da, rối loạn tạo máu.

4.5.2.3. Nhóm ức chế PDE-5

Phương pháp đã phát hiện 06/24 mẫu dương tính, có VNP03, VNP25 dương tính với 1 hoạt chất là sildenafil (15,58 – 68,77 mg/1 liều dùng); VNP04 dương

tính với tadalafil (5,89 mg/liều) và vardenafil (10,10 mg/ 1 liều dùng); VNP09, VNP15, VNP24 dương tính với sildenafil (58,61-70,00 mg/liều) và tadalafil (12,34-17,17 mg/liều). Điều này cho thấy tình trạng trộn trái phép các thuốc tân dược vào các chế phẩm đông dược dùng để điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh lý rối loạn cương dương và tăng cường sinh lực nam giới vẫn đang diễn ra. Trái ngược với nhóm giảm đau chống viêm, giảm glucose máu luôn điều trị thấp và dài ngày cho 2 bệnh mãn tính xương khớp và đái tháo đường; bệnh liệt dương nhất là đối tượng nam giới cần tác dụng trong thời gian ngắn nhất nên liều của 3 chất ức chế PDE-5 trộn lẫn trong đông dược cao và trong ngưỡng điều trị. Bên cạnh đó, số lượng mẫu phối hợp 2 hoạt chất khác nhau là cao hơn hẳn, phù hợp với nhiều nghiên cứu khác [40], [60], [55]. Kết quả hàm lượng tân dược trộn trái phép trong các mẫu dương tính cao, và đều được phát hiện bằng cả hai phương pháp LC-MS/MS và HPTLC. Tuy nhiên, điểm đặc biệt của hệ thống EVOQ được sử dụng trong luận án là phần mềm kết luận rất khách quan cho 25 mẫu dương tính (xem thêm Phụ lục 2). Hơn nữa, kết quả định danh được xuất ra đã kết hợp giữa thời gian lưu, tỷ lệ 2 mảnh con, diện tích, chiều cao pic phải pass ở cột identified, kèm theo sắc ký đồ mẫu thử, chồng phổ thử và chuẩn trong thư viện máy. Do đó, các kết quả được khẳng định chắc chắn không thể nhầm lẫn với dẫn chất hoặc dược chất có cùng công thức phân tử. Như vậy, phương pháp LC-MS/MS vẫn luôn được xem là phương pháp qui chiếu cho các phương pháp khác.

4.5.3. Ứng dụng phương pháp TLC – SERS để phân tích mẫu thực

Tại Trung Quốc năm 2017 tác giả Hu.X [79] đã tiến hành phát hiện 6 chất nhóm PDE-5 trong đó có sildenafil bằng TLC-SERS và có sử dụng phần mềm toán hóa để xử lý số liệu. Tuy nhiên, khảo sát trên 50 chế phẩm đông dược chưa phát hiện mẫu dương tính sildenafil và kết quả mới chỉ được kiểm chứng bằng HPLC. Đây là điểm mới của đề tài nên chỉ mới dừng lại khảo sát trong 24 mẫu chế phẩm nhằm phát hiện sildenafil. Nghiên cứu này đã trình bày chi tiết cách đo mẫu nhằm đạt tín hiệu cao nhất và loại bỏ các dương tính giả với thời gian đo 60 giây. Kết quả đã phát hiện được 05 mẫu dương tính với sildenafil (VNP03, VNP09, VNP15, VNP24, VNP25) trên tổng số 24 mẫu chế phẩm được khảo sát, các kết quả này đã được kiểm chứng với phương pháp LC-MS/MS, đảm bảo kết quả chính xác và đáng tin cậy. Đồng thời phương pháp TLC-SERS đã loại trừ các kết quả dương tính giả trong phương pháp

TLC. Phương pháp TLC-SERS đã mở ra hướng ứng dụng mới trong phát hiện tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược.

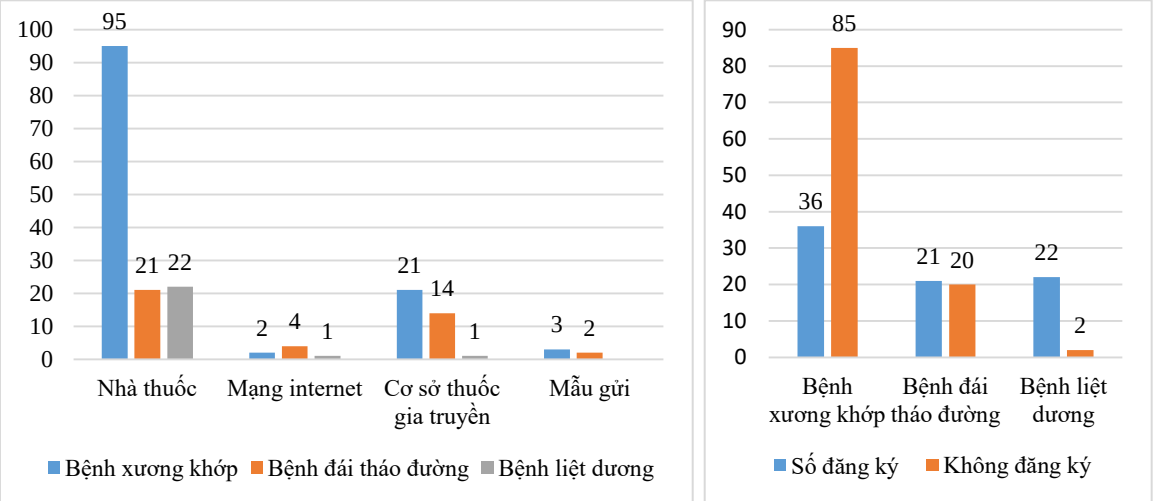
4.5.4. Bước đầu đánh giá tình hình các dược chất được trộn lẫn trong các mẫu thực

Các phương pháp đã được triển khai trên 184 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm chức năng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp, bệnh liệt dương và bệnh đái tháo đường từ các nguồn khác nhau trên thị trường xem hình *Hình 4.1*, danh mục theo Phụ lục 6, được phân loại như sau:

- Số đăng ký: 79 chế phẩm có số đăng ký và 107 chế phẩm không số đăng ký.

- Cách thức thu thập: 138 chế phẩm được mua tại nhà thuốc hoặc cửa hàng bán chế phẩm bảo vệ sức khỏe, 36 chế phẩm được mua tại cơ sở gia truyền, 7 chế phẩm được mua qua internet và 5 chế phẩm được gửi kiểm nghiệm.

- Dạng bào chế: 82 chế phẩm viên nang, 24 viên nén, 65 viên hoàn, 6 thuốc bột, 4 chế phẩm trà túi lọc, 1 cao thuốc, 2 viên ngậm, 2 thuốc nước.



Hình 4.1. Phân loại các mẫu chế phẩm theo nhóm bệnh và cách thức thu thập; phân loại các mẫu chế phẩm theo nhóm bệnh với số đăng ký và không đăng ký

Phương pháp HPTLC đã phát hiện nhiều mẫu dương tính giả khi phát hiện trên TLC thông qua nhiều nhóm hoạt chất khác nhau. Tuy nhiên, đối với một số mẫu thực hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường với glibenclamid thấp thì phương pháp LC-MS/MS chiếm ưu thế hơn hẳn. Đặc biệt, nhóm ức chế PDE-5 thường được trộn lẫn các dẫn chất thì phương pháp HPTLC chỉ mang tính sàng lọc và định hướng các mẫu

dương tính. Để khẳng định các mẫu dương tính thật thì LC-MS/MS vẫn là phương pháp trọng tài. Phương pháp TLC-SERS chỉ được triển khai trên mẫu thực hỗ trợ bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lực để phát hiện sildenafil. Với hỗ trợ của SERS, phương pháp đã phát hiện sildenafil với các dẫn chất sildenafil trong thời gian 60 giây, có độ chính xác tương đương bằng với phương pháp LC-MS/MS. Ưu thế của TLC trong việc triển khai trên cỡ mẫu lớn, TLC-SERS lại có giới hạn phát hiện thấp hơn HPTLC. Do đó, phương pháp này có nhiều hứa hẹn triển khai trên nhiều nhóm hoạt chất khác nhau, đóng góp thêm 1 kỹ thuật mới trong phát hiện các hoạt chất hóa dược trộn trái phép trong đông dược. Như vậy, tình hình trộn trái phép các dược chất của nhiều nhóm hoạt chất khác nhau vào chế phẩm đông dược vẫn được diễn ra và phần lớn các chế phẩm này được mua ở các cơ sở gia truyền, mạng internet, hình ảnh mẫu dương tính xem Phụ lục 4. Do đó, cần đẩy mạnh việc thu thập mẫu hơn nữa tại các tỉnh, thành phố để phát hiện sớm và có thể có các biện pháp xử lý kịp thời để bảo vệ quyền lợi, sức khỏe người tiêu dùng.

4.6. Ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn của luận án

Hiện nay, tình trạng các thuốc tân dược trộn lẫn trái phép trong các chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe ngày càng được phát hiện. Với việc tiến hành luận án "**Xây dựng quy trình xác định một số tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược**", luận án đã có những đóng góp nhất định.

Về mặt khoa học, luận án đã xây dựng được 3 phương pháp LC-MS/MS, 4 phương pháp HPTLC nhằm phát hiện 16 dược chất trong các nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu và ức chế PDE-5 gồm paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison, glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid, sildenafil, tadalafil và vardenafil. Đặc biệt, đề tài là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam, đã xây dựng thành công phương pháp mới TLC-SERS định tính sildenafil trong chế phẩm đông dược và phát hiện 5 mẫu thực dương tính với sildenafil tại Việt Nam.

Về mặt thực tiễn, luận án đã phát hiện được 25 trong 184 chế phẩm đông dược trộn lẫn 7 dược chất paracetamol, indomethacin, dexamethason acetat, glibenclamid, sildenafil, tadalafil và vardenafil. Trong đó 19 mẫu phát hiện chứa 1 hoạt chất gồm 7 mẫu có paracetamol (31,21-1318,62 mg/liều), 2 mẫu có dexamethason acetat (0,44-0,81 mg/liều), 8 mẫu có glibenclamid (0,14-2,16 mg/liều), 2 mẫu có sildenafil (15,58 – 68,77 mg/ liều). Đồng thời 6 mẫu phát hiện cùng chứa 2 hoạt chất gồm 1

mẫu có paracetamol (485,21 mg/liều) và indomethacin (5,64 mg/liều), 1 mẫu có paracetamol (385,37 mg/liều mg/g) và dexamethason acetat (0,95 mg/liều), 1 mẫu có tadalafil (5,89 mg/liều) và vardenafil (10,10 mg/ liều); 3 mẫu có sildenafil (58,61-70,00 mg/liều) và tadalafil (12,34-17,17 mg/liều). Như vậy, luận án đã đóng góp nhiều điểm mới cả thực tiễn và khoa học trong việc định tính, định lượng các tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành các mục tiêu đề ra và thu được các kết quả như sau:

1. Đã xây dựng được quy trình định tính, định lượng 16 dược chất trộn lẫn trong chế phẩm đông dược điều trị, hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp, bệnh đái tháo đường và bệnh lý liệt dương bằng LC-MS/MS.

Các hoạt chất gồm paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison, glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid, sildenafil, tadalafil và vardenafil. Mẫu thử được nghiền mịn, đồng nhất, chiết siêu âm bằng methanol, pha loãng thích hợp. Các chất trong dung dịch mẫu thử được tách bằng cột Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm), pha động gồm acetonitril và nước đều chứa acid formic 0,1% theo chế độ gradient. Phát hiện bằng detector MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+); mảnh khối lựa chọn (ion mẹ→ion định lượng/ion định tính).

Đã thẩm định quy trình theo hướng dẫn của AOAC 2016, ICH 2005 trên 9 nền mẫu tự tạo có độ đặc hiệu cao và LOD từ 0,076 đến 1,300 ng/ml, đạt yêu cầu phân tích.

2. Xây dựng quy trình phát hiện nhanh tân dược trên trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và TLC-SERS.

Đã xây dựng quy trình HPTLC phát hiện nhanh 16 dược chất trên với xử lý mẫu là chiết siêu âm bằng methanol, chấm trực tiếp hoặc pha loãng hay cô đặc tùy từng nhóm**.** Thể tích chấm 5µl trên bản mỏng silica gel 60 F_{254}. Pha động của nhóm glucocorticoid gồm cloroform - ethyl acetat - ethanol (8,5:1:0,5); nhóm NSAID gồm n-hexan: ethyl acetat :acid acetic (6:2,5:1,5); nhóm giảm glucose máu gồm n-butyl acetat - acid formic (100:0,5); nhóm ức chế PDE-5 gồm ethylacetat – isopropanol – amoniac 25% (45: 5: 2,6) tính theo thể tích. Thẩm định theo AOAC, ICH về tính chọn lọc trên 9 nền mẫu tự tạo, LOD từ 20-188 ng/vết.

Đã xây dựng được quy trình định tính sildenafil bằng TLC – SERS với xử lý mẫu bằng methanol, pha động ethylacetat – isopropanol – amoniac 25% (45: 5: 2,6; v/v/v). Đánh dấu điểm phân tách ở bước sóng 254 nm, ghi phổ SERS bằng máy Raman, ở bước sóng 632,8 nm, thời gian 60 giây. Phương pháp có độ chọn lọc cao với 3 nền mẫu tự tạo và LOD= 2 ng/vết theo AOAC 2016.

3. Áp dụng các quy trình đã xây dựng để kiểm tra các chế phẩm đông dược

Các quy trình HPTLC: phân tích 184 mẫu chế phẩm đông dược, trong đó 25 mẫu dương tính với paracetamol, indomethacin, dexamethason acetat, glibenclamid, sildenafil, tadalafil, vardenafil.

Các quy trình LC-MS/MS: phân tích 184 mẫu chế phẩm đông dược phát hiện 25 mẫu chứa hoạt chất với 9 mẫu có paracetamol (31,21-1318,62 mg/liều), 1 mẫu có indomethacin (5,64 mg/liều), 3 mẫu có dexamethason acetat (0,44-0,95 mg/liều), 8 mẫu có glibenclamid (0,14-2,16 mg/liều), 5 mẫu có sildenafil (15,58 – 70,00 mg/ liều), vardenafil (10,10 mg/ liều), tadalafil (12,34-17,17 mg/liều).

Quy trình TLC-SERS: phát hiện 5 mẫu dương tính với sildenafil trong 24 mẫu hỗ trợ điều trị bệnh liệt dương; phù hợp với kết quả phân tích bằng LC-MS/MS.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục phát triển phương pháp để phát hiện thêm các hoạt chất nhóm dị ứng, giảm huyết áp, phát huy tối đa ưu thế của UV scanner trong sàng lọc và detector khối phổ trong khẳng định kết quả.

Tiếp tục nghiên cứu các điều kiện để phát triển quy trình TLC-SERS phát hiện tadalafil và vardenafil trong các chế phẩm đông dược. Xây dựng được phần mềm toán hóa để xử lý số liệu trong TLC – SERS.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

1.**Đào Thị Cẩm Minh**, Thái Khoa Bảo Châu, Trần Tuấn Phong, Nguyễn Phúc Khánh Nhi, Trần Hữu Dũng, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh, (2018), "Xây dựng phương pháp phát hiện đồng thời một số thuốc giảm đau, kháng viêm trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS", *Tạp chí Dược học*, 58(503), trang 18-22.

2.**Đào Thị Cẩm Minh**, Nguyễn Thị Thanh Huyền, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh, (2018), "Xây dựng phương pháp xác định chất ức chế phosphodiesterase-5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC)", *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học,* 23(5), trang 11-19.

3. **Đào Thị Cẩm Minh**, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh (2018), "Nghiên cứu phát hiện các dược chất giảm glucose máu tổng hợp trộn không khai báo trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS", *Tạp chí Nghiên cứu dược & Thông tin thuốc*, 9(6), trang 2-8.

4.**Đào Thị Cẩm Minh**, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh (2019), "Nghiên cứu phát hiện các thuốc giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu trộn trái phép trong chế phẩm Đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Dược học*, 59(516), trang 57-62.

5. **Dao Thi Cam Minh**, Le Anh Thi, Nguyen Thi Thanh Huyen, Le Van Vu, Nguyen Thi Kieu Anh, Pham Thi Thanh Ha, (2019), "Dectection of sildenafil adulterated in herbal products using thin layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy: "Double Coffee-ring effect" based enhancement", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, pp.340-347.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1.Trần Tử An, (2011), *Kiểm nghiệm dược phẩm*, Nhà xuất bản Y học, tr. 84-110.

2. Trần Tử An, (2012), *Hóa phân tích tập 2: Phân tích dụng cụ*, Nhà xuất bản Y học, tr. 107-215.

3. Bộ Y tế, (2007), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

4. Bộ Y tế, (2009), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

5. Bộ Y tế, (2010), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

6. Bộ Y tế, (2012), *Dược lý học* (Vol. Tập 2), Nhà xuất bản Y học, tr. 290-294.

7. Bộ Y tế, (2014), *Thông tư qui định về quản lý thực phẩm chức năng*, số 43/2014/TT-BYT.

8. Thông tư số 01/2016/TT-BYT, Quy định về kê đơn thuốc y học cổ truyền, kê đơn thuốc y học cổ truyền kết hợp với thuốc tân dược trong các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh (2016).

9. Bộ Y tế, (2018), *Dược Điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

10. Trần Thị Hoàng Chi, Trần Ngọc Thu, Huỳnh Ngọc Thụy, Trần Hùng, (2011), "Định tính-định lượng dexamethason acetat và betamethason trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng HPLC", *Tạp chí Dược liệu*, 16(3).

11. Đỗ Trung Đàm, (2012), "Các cây thuốc có tác dụng làm hạ glucose huyết và điều trị đái tháo đường", *Tạp chí Dược học*, 432(4), tr. 06-10.

12. Đỗ Trung Đàm, (2012), "Các cây thuốc có tác dụng làm hạ glucose huyết và điều trị đái tháo đường (tiếp theo)", *Tạp chí Dược học*, 433(5), tr. 02-06.

13. Đào Văn Đôn, Nguyễn Hồng Hải, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Thị Thanh Phương, (2013), "Định lượng đồng thời dexamethason acetat, betamethason và prednisolon bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao để kiểm tra một số chế phẩm đông dược", *Y-Dược học quân sự*, 1, tr. 18-25.

14. Hiệp hội Thực phẩm chức năng Việt Nam, (2013), *Quyết định Chiến lược Thực phẩm chức năng giai đoạn 2013 – 2020 và tầm nhìn 2030*, số 468/QĐ-VAFF, Hà Nội.

15. Đặng Thi Mai Hoa, (2015), *Sưu tầm, biên dịch và đề xuất hướng sử dụng các bài thuốc của Thái y viện triều Nguyễn*, Đề tài khoa học công nghệ cấp tỉnh Thừa Thiên Huế.

16. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Thị Phương Lân, Nguyễn Xuân Thắng, (2010), "Tác dụng hạ glucose huyết của diệp hạ châu đắng (Phyllanthus amarus Schum et Thonn.) trên chuột nhắt trắng thực nghiệm", *Tạp chí Dược học*(1), tr. 30-35

17. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Thị Thu Hiền, (2009), "Tác dụng của dịch chiết lá bằng lăng nước (lagerstroemia speciosa (L.) Pers.) trên chuột cống đái tháo đường tuýp 2", *Tạp chí Dược học*(9), tr. 19-22

18. Phùng Thanh Hương, Phạm Hà Thanh Tùng, (2014), "Đánh giá tác dụng hạ glucose máu trên thực nghiệm của 4 loài Gymnema R. Br. ở Việt Nam", *Tạp chí Dược học,* 462 tr. 42-47.

19. Phùng Thanh Hương, Trần Văn Ơn, Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Văn Tuấn, (2010), "Tác dụng hạ glucose huyết của 3 bài thuốc dân gian ở miền núi phía Bắc Việt Nam", *Tạp chí Dược học*(8), tr. 28-32

20. Cao Công Khánh, Nguyễn Tường Vy, Hoàng Quỳnh Trang, (2013), "Nghiên cứu quy trình xác định đồng thời sibutramine, furosemid, dexamethason và piroxicam trong thực phẩm chức năng bằng kỹ thuật HPLC", *Tạp chí Dược học,* 445, tr. 40-44.

21. Nguyễn Đăng Lâm, (2012), "Chất lượng dược liệu, Đông dược trên thị trường hiện nay, những thách thức", *Cây thuốc quý,* 216, tr. 4.

22. Nguyễn Thị Lâm, (2001), "Một số kinh nghiệm về việc phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép vào thuốc tân dược", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc, tr.*95-98.

23. Đặng Thị Ngọc Lan, Đoàn Cao Sơn, Thái Nguyễn Hùng Thu, (2016), "Nghiên cứu xác định bộ dịch chuyển Raman cơ bản của sildenafil, ibuprofen và lamivudin để sàng lọc nhanh thuốc giả", *Tạp chí Dược học*(483), tr. 16-20.

24. Đặng Thị Ngọc Lan, Đoàn Cao Sơn, Thái Nguyễn Hùng Thu, (2016), "Ứng dụng công nghệ thông tin để xác định bộ dịch chuyển Raman cơ bản của một số dược chất", *Tạp chí Dược học*(488), tr. 52-55.

25. Trịnh Văn Lẩu, Trần Việt Hùng, Lê Thị Phương Chi, (2008), "Nghiên cứu phân tích phát hiện các chất chống rối loạn cương dương trộn trái phép trong thuốc đông dược và thực phẩm chức năng", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc,* 3A, tr. 113-118.

26. Lê Đào Khánh Long, Vũ Văn Hiếu, Trương Ngọc Huyền, Trần Hùng, (2011), "Phát hiện corticoid pha trộn trong các chế phẩm đông dược bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng", *Y học thành phố Hồ Chí Minh,* Phụ bản số 1(15), tr. 617-621.

27. Phạm Luận, (2014), *Phương pháp phân tích Phổ nguyên tử,* Nhà xuất bản Bách khoa Hà Nội, tr. 355-375.

28. Phạm Luận, (2014), *Phương pháp phân tích Sắc ký và chiết tách*, Nhà xuất bản Bách khoa Hà Nội, tr. 102-134.

29. Nguyễn Quang Nam, Trần Hùng, (2011), "Phát hiện nhanh một số corticoid pha trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng kĩ thuật khối phổ với chế độ tiêm mẫu trực tiếp", *Y học thành phố Hồ Chí Minh*, Phụ bản số 1(15), tr. 633-641.

30. Hải Thượng Lãn Ông, Lê Hữu Trác, (2005), *Hải Thượng Y Tông Tâm Lĩnh*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội

31. Quốc hội nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam, (2010), *Luật An toàn thực phẩm*, số 55/2010/QH12, Hà Nội.

32. Quốc hội nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam, (2016), *Luật Dược*, số 105/2016/QH13, Hà Nội.

33. Trịnh Thị Quy, Đoàn Cao Sơn, (2013), "Nghiên cứu phát hiện một số Glucocorticoid trộn trái phép trong thuốc đông dược bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 3, tr. 13-18.

34. Phan Nguyễn Trường Thắng, Trần Việt Hùng, Lê Thanh Hoàng, Trần Thị Bạch Mai, (2018), "Phân tích phát hiện một số tân dược chống tiểu đường trộn trái phép trong thuốc đông dược và thực phẩm chức năng", *Tạp chí Dược học*, 58(7), tr. 68-72.

35. Vũ Ngọc Thắng, Tô Minh Hùng, Vương Thị Phương Dung, Vương Duy Chí, (2017), "Xây dựng phương pháp HPLC để phân tích đồng thời một số thuốc hóa dược điều trị đái tháo đường có thể trộn trong một số chế phẩm từ dược liệu", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 15(55), tr. 16-21.

36. Mai Tất Tố, Vũ Thị Trâm, (2007), *Dược lý tập 2*, Nhà xuất bản Y học. tr. 301-303.

37. Đái Thị Xuân Trang, Nguyễn Thị Mai Phương, Võ Thị Ngọc Diễm, Quách Tú Huê, (2012), "Khảo sát hiệu quả hạ đường huyết và chống oxy hóa của cao chiết cây Nhàu (Morinda citrifolia L.) ở chuột bệnh tiểu đường", *Tạp chí Khoa học*, 23, tr. 115-124.

38. Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương, (2010). "*Công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2010, định hướng năm 2011*". Hội nghị Kiểm nghiệm.

Tiếng Anh

39.Abourashed Ehab, Abdel-Kader Maged, et al, (2005), "HPTLC determination of sildenafil in pharmaceutical products and aphrodisiac herbal preparations", *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 18(105), pp. 372-376.

40.Al-Tahami K., (2014), "Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements sold in the Yemeni market", *Internationa journal of scientific research*, 3(4), pp. 403-405.

41.Alharbi O., Xu Y., Goodacre R., (2015), "Detection and quantification of the opioid tramadol in urine using surface enhanced Raman scattering", *The Royal Society of Chemistry*.

42.Andola H.C., Purohit V.K., (2010), "High performance thin layer chromatography (HPTLC): A modern analytical tool for biological analysis", *Nature and Science*, 8(10), pp. pp.58-61.

43.AOAC Official Methods of Analysis, (2016). "*Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*".

44.Ariburnua E., Uludag M.F., Yalcinkaya H., Yesilada E., (2012), "Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 64- 65, pp. 77- 81.

45.Balayssac S., Trefi S., Gilard V., et al., (2009), "2D and 3D DOSY 1H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction", *J Pharm Biomed Anal,* 50(4), pp. 602-612.

46.Bogusz M.J., Hassan H., Al-Enazi E., Ibrahim Z., Al-Tufail M., (2006), "Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 41, pp. 554–564.

47.British Pharmacopoeia Commission Secretariat, (2018), *Bristish Pharmacopoeia 2018*

48.Bruker, (2013). "*Functional Description*".

49.Burnett AL, (1997), "Nitric oxide in the penis physiology and pathology", *Journal Urol,* 157, pp. 320 – 324.

50.Cailletaud J., De Bleye C., Dumont E., et al., (2017), "Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field", *J Pharm Biomed Anal,* 147, pp. 458-472.

51.Cho S.H., Park H.J., Lee J.H., et al., (2014), "Monitoring of 35 illegally added steroid compounds in foods and dietary supplements", *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess,* 31(9), pp. 1470-1475.

52.Christa L. Brosseau, Kari S. Rayner, Francesca Casadio, Cecily M. Grzywacz, Duyne R.P.V., (2009), "Surface-enhanced Raman spectroscopy: a direct method to identify colorants in various artist media.", *Analytical Chemistry,* 81(17), pp. 7443-7447.

53.Chutima L., Burana-osot J., Laopoonpat P., Phattanwasin P., (2012), "Determination of Dexamethasone and Prednisolone Adulterated in Herbal Medicines Using Thin-layer Chromatography", *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences,* 3 (4), pp. 1353-1358.

54.Commission of the european communities, (2002), "COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC)", *Official Journal of the European Communities*.

55.Cui M., Li N., Qin F., Li F., Xiong Z., (2010), "Simultaneous Determination of 14 Illegal Adulterants in Chinese Proprietary Medicines Using Reversed-Phase Ion-Pair LC", *Chromatographia,* 72, pp. 1189–1194.

56.Dallas F.A.A., Read H., Ruane R.J., Wilson I.D., (1988), *Recent advances in thin layer chromatography*, Plenum Press, New York.

57.Dana K., Shende C., Huang H., Farquharson S., (2015), "Rapid Analysis of Cocaine in Saliva by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", *J Anal Bioanal Tech,* 6(6), pp. 1-5.

58.de Veij M., Deneckere A., Vandenabeele P., de Kaste D., Moens L., (2008), "Detection of counterfeit Viagra with Raman spectroscopy", *J Pharm Biomed Anal,* 46(2), pp. 303-309.

59.Deconinck E., Sacre P.Y., Courselle P., De Beer J.O., (2012), "Chemometrics and chromatographic fingerprints to discriminate and classify counterfeit medicines containing PDE-5 inhibitors", *Talanta,* 100, pp. 123-133.

60.Do T.T.K., Theocharis G., Reich E., (2015), "Simultaneous Detection of Three Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors and Eight of Their Analogs in Lifestyle Products and Screening for Adulterants by High-Performance Thin-Layer Chromatography", *Journal of AOAC International,* 98(5), pp. 1226-1232.

61.E.A. A., (2005), *An Introduction to Mass Spectrometry*, Astbury Centre for Structural molecular Biology, The University of Leeds.

62.Fan M., Andrade G.F.S., Brolod A.G., (2011), "A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry", *Analytica Chimica Acta,* 693, pp. 7–25.

63.Fang F., Qi Y., Lu F., Yang L., (2016), "Highly sensitive on-site detection of drugs adulterated in botanical dietary supplements using thin layer chromatography combined with dynamic surface enhanced Raman spectroscopy", *Talanta,* 146, pp. 351-357.

64.Gao Y., Hu Z., Wu J., et al., (2019), "Size-tunable Au@Ag nanoparticles for colorimetric and SERS dual-mode sensing of palmatine in traditional Chinese medicine", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 174, pp. 123-133.

65.Gilard V., Balayssac S., Tinaugus A., et al., (2015), "Detection, identification and quantification by 1H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance", *J Pharm Biomed Anal,* 102, pp. 476-493.

66.Gu X., Jin Y., Dong F., et al., (2018), "Toward rapid analysis, forecast and discovery of bioactive compounds from herbs by jointly using thin layer chromatography and ratiometric surface-enhanced Raman spectroscopy technique", *J Pharm Biomed Anal,* 153, pp. 9-15.

67.Gupt Y.K., Kaleekal T., Joshi S., (2000), "Missue of Coritcosteroids in some of the drugs dispensed as preaparations from alternative systems of medicine in India", *Pharmacoepidemiology and drug safety,* 9, pp. 599-6002.

68.Haneef J., Shaharyar M., Husain A., et al., (2013), "Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants", *Drug Testing and Analysis,* 5, pp. 607–613.

69.Haneef J., Shaharyar M., Husain A., et al., (2013), "Application of LC–MS/MS for quantitative analysis of glucocorticoids and stimulants in biological fluid", *Journal of Pharmaceutical Analysis,* 3(5), pp. 341–348.

70.Havel S.S., Dhaneshwar S.R., (2011), "Application of High performance thin layer chromatography-densitometry for the simultaneous determination of Metformin hydrochloride and Glipizide in bulk drug and tablet formulation", *Der Pharmacia Sinica,* 2(1), pp. 40-48.

71.Health Sciences Authority, (2009), HSA warns consumers not to take an illegal product- "HUO LUO JING DAN 活絡金丹" [Press release], Singapore, pp. 1-5.

72.Health Sciences Authority, (2011), REN SEM TU CHON CHIN KUO PILL [人参杜仲筋骨丸] And HUO LI BAO [活力宝] found to contain undeclared western medicines [Press release], Singpore, pp. 1-6

73.Health Sciences Authority, (2014), HSA alerts public to three illegal products purchased from overseas which contain undeclared potent western medicinal ingredients [Press release], Singapore, pp. 1-5

74.Health Sciences Authority, (2016), HSA alerts public to three health products found to contain undeclared western medicinal ingredients [Press release], Singapore, pp. 1-5

75.Health Sciences Authority, (2017), HSA alert: Consumer developed diabetes and other adverse reaction after taking "PHQ 1001 Khasiat Penawar Herba Qaseh Serata Herb" which contains undeclared potent western medicines [Press release], Singapore, pp. 1-6

76.Heman Burhanalden Abdulrahman, Jan Krajczewski, Dorota Aleksandrowska, Kudelsk A., (2015), "Silica-Protected Hollow Silver and Gold Nanoparticles: New Material for Raman Analysis of Surfaces", *The Journal of Physical Chemistry C,* 119(34), pp. 20030–20038.

77.Heo S., Yoo G.J., Choi J.Y., et al., (2016), "A rapid method for the simultaneous determination of 25 anti-hypertensive compounds in dietary supplements using ultra-high pressure liquid chromatography", *Food Additives & Contaminants: Part A,* pp. 17 - 36.

78.Hicks C.J., (2001), "Surface Enhanced Raman Spectroscopy", *MSU CEM 924.*

79.Hu X., Fang G., Han A., et al., (2017), "Rapid detection of six phosphodiesterase type 5 enzyme inhibitors in health care products using thin-layer chromatography and surface enhanced Raman spectroscopy combined with BP neural network", *Journal of Separation Science,* 40(11), pp. 2316-2521.

80.Hu X., Fang G., Han A., Liu J., Wang S., (2017), "Rapid detection of Pericarpium papaveris in hot pot condiments using thin-layer chromatography and surface enhanced Raman spectroscopy combined with a support vector machine", *Analytical Methods,* 9(14), pp. 2177-2182.

81.Huang C.-C., (2015). "*Applications of Raman Spectroscopy in Herbal Medicine*". University of Otago.

82.Huang R., Han S., Li X.S., (2013), "Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography", *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 405(21), pp. 6815-6822.

83.Huang Z., Xiao S., Luo D., Chen B., Yao S., (2008), "Simultaneous Determination of Sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in Dietary Supplements forWeight Control by HPLC–ESI-MS", *Journal of Chromatographic Science,* 46, pp. 707-711.

84.ICH Expert Working Group. (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Paper presented at the International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

85.Jiru M., Stranska-Zachariasova M., Dzuman Z., et al., (2019), "Analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors as possible adulterants of botanical-based dietary supplements: extensive survey of preparations available at the Czech market", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 164, pp. 713-724.

86.JNC Merck & Co., (2006), *The Merck index,* pp. 8558-8567, pp.9935, pp.9027.

87.Kesting J.R., Huang J., Sørensen D., (2010), "Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC-HRMS and LC-MS-SPE/NMR and comparative in vivo study with standards in a hypertensive rat model", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 51(3), pp. 705-711.

88.Kim H.J., Lee J.H., Park H.J., et al., (2014), "Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS", *Food Additives & Contaminants: Part A,* 31(6), pp. 973-978.

89.Kneipp K., Moskovits M., Kneipp H., (2006), "Surface-Enhanced Raman Scattering", *Topics Physics and Applications,* 103, pp. 261-278.

90.Kumasaka K., Kojima T., Honda H., Doi K., (2005)), "Screening and Quantitative Analysis for Sulfonylurea-Type Oral Antidiabetic Agents in Adulterated Health Food Using Thin-Layer Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Health Science,* 51(4), pp. 453–460.

91.Ky P.T., Huong P.T., My T.K., et al., (2010), "Dammarane-type saponins from Gynostemma pentaphyllum", *Phytochemistry,* 71(8-9), pp. 994-1001.

92.Lau A.-J., Holmes M.J., Woo S.-O., Koh H.-L., (2003), "Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 31, pp. 401-406.

93.Lee E.-S., Lee J.H., Han K.M., et al., (2013), "Simultaneous determination of 38 phosphodiestrase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 83, pp. 171– 178.

94.Lee J.H., Kim N.S., Han K.M., et al., (2013), "Monitoring by LC-MS/MS of 48 compounds of sildenafil, tadalafil, vardenafil and their analogues in illicit health food products in the Korean market advertised as enhancing male sexual performance", *Food Additives & Contaminants: Part A,* 30(11), pp. 1849–1857.

95.Lee P.C., Meisel D., (1982), "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols", *The Journal of Physical Chemítry,* 86(17), pp. 3391-3395.

96.Leopold N., Lendl B., (2003), "A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride", *J. Phys. Chem. B,* 107, pp. 5723-5727.

97.Li N., Cui M., Lu X., et al., (2010), "A rapid and reliable UPLC-MS/MS method for the identification and quantification of fourteen synthetic anti-diabetic drugs in adulterated Chinese proprietary medicines and dietary supplements", *Biomed Chromatogr,* 24(11), pp. 1255-1261.

98.Liang Q., Qu J., Luo G., Wang Y., (2006), "Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 40(2), pp. 305-311.

99.Lu Y.L., Zhou N.L., Liao S.Y., et al., (2010), "Detection of adulteration of anti-hypertension dietary supplements and traditional Chinese medicines with synthetic drugs using LC/MS", *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess,* 27(7), pp. 893-902.

100.Lucotti A., Tommasini M., Casella M., et al., (2012), "TLC-surface enhanced Raman scattering of apomorphine in human plasma", *Vibrational Spectroscopy,* 62, pp. 286-291.

101.Lv D., Cao Y., Lou Z., et al., (2015), "Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 407(5), pp. 1313-1325.

102.Mao D.-Z., Weng X.-X., Yang Y.-J., (2012), "Rapid screening of sildenafil and tadalafil adulterated in healthcare products by Micro-Raman spectroscopy", *Journal of Raman spectroscopy*.

103.Mao H., Qi M., Zhou Y., et al., (2015), "Discrimination of sibutramine and its analogues based on surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometrics: toward the rapid detection of synthetic anorexic drugs in natural slimming products", *Royal society of chemistry,* 5, pp. 5886-5894.

104.Mazurek S., Szostak R., (2006), "Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy", *J Pharm Biomed Anal,* 40(5), pp. 1225-1230.

105.Mazurek S., Szostak R., (2008), "Quantitative determination of diclofenac sodium in solid dosage forms by FT-Raman spectroscopy", *J Pharm Biomed Anal,* 48(3), pp. 814-821.

106.Mazurek S., Szostak R., (2009), "Quantification of atorvastatin calcium in tablets by FT-Raman spectroscopy", *J Pharm Biomed Anal,* 49(1), pp. 168-172.

107.McCreery R.L., (2000), *Raman spectroscpy for chemical analysis*, John Wiley and sons, Inc., Canada.

108.Meng W., Hu F., Jiang X., Lu L., (2015), "Preparation of silver colloids with improved uniformity and stable surface-enhanced Raman scattering", *Nanoscale Res Lett,* 10, pp. 34.

109.Mohammad A., Sharma S., Bhawani S.A., (2009), "Reversed phase thin layer chromatography of five co-administered drugs with surfactant modified solvent systems", *Indian Journal of Chemical Technology,* 16, pp. 344-350.

110.Moreira A.P., Martini M., de Carvalho L.M., (2014), "Capillary electrophoretic methods for the screening and determination of pharmacologic adulterants in herbal-based pharmaceutical formulations", *Electrophoresis,* 35(21-22), pp. 3212-3230.

111.Moreira A.P.L., Gobo L.A., Viana C., De Carvalho L.M., (2016), "Simultaneous analysis of antihypertensive drugs and diuretics as adulterants in herbal-based products by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", *Analytical Methods,* 8, pp. 1881–1888.

112.Nguyen Thi Hao, Nguyen Van Bach, Nguyen Van Thinh, Dao Van Don, Nguyen Thi Thanh Phuong, (2013), "Simultaneous determination of Sildenafil and Tadalafil in herbal medicines by HPLC", *Journal of military pharmaco-medicine,* 7, pp. 1-7.

113.Pang W., Yang H., Wu Z., Huang M., Hu J., (2009), "LC-MS–MS in MRM Mode for Detection and Structural Identification of Synthetic Hypoglycemic Drugs Added Illegally to 'Natural' Anti-Diabetic Herbal Products", *Chromatographia,* 70, pp. 1353–1359.

114.Pham H.T.T., Hoang M.C., Ha T.K.Q., et al., (2018), "Discrimination of different geographic varieties of Gymnema sylvestre, an anti-sweet plant used for the treatment of type 2 diabetes", *Phytochemistry*, 150, pp. 12-22.

115.Phattanawasin P., Sotanaphun U., Sukwattanasinit T., Akkarawaranthorn J., Kitchaiya S., (2012), "Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method", *Forensic Sci Int*, 219(1-3), pp. 96-100.

116.Ping H., Xiao L., (2009), "Detection glucocorticosteroid in traditional Chinese preparation by the liquid chromatography -mass spectrometry method", *Journal of Shandong university*, 47(12), pp. 138-140.

117.Posadzki P., Watson L., Ernst E., (2013), "Contamination and adulteration of herbal medicinal products (HMPs): an overview of systematic reviews", *Eur J Clin Pharmacol*, 69(3), pp. 295-307.

118.Pozzi F., Shibayama N., Leona M., Lombardi J.R., (2013), "TLC-SERS study of Syrian rue (*Peganum harmala*) and its main alkaloid constituents", *Journal of Raman spectroscopy*, 44(1), pp. 102-107.

119.Ramsay H.M., Goddard W., Gill S., Moss C., (2003), "Herbal creams used for atopic eczema in Birmingham, UK illegally contain potent corticosteroids", *Arch Dis Child*, 88, pp. 1056–1057.

120.Ru E.L., Etchegoin P., (2009), *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Elservier, Great Britain.

121.Saker M.R., (2014), "Adulteration of herbal medicines and dietary supplements with undeclared synthetic drugs: dangerous for human health", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4), pp. 1-2.

122.Savaliya A.A., Prasad B., Raijada D.K., Singh S., (2009), "Detection and characterization of synthetic steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian ayurvedic/herbal products using LC-MS/TOF", *Drug Testing and Analysis*, 1, pp. 372–381.

123.Septiani R., Damayanti S., (2015), "Simultaneous identification of caffeine¸ acetaminophen, sildenafil citrate, tadalafil and vardenafil HCl in aphrodisiac traditional herbal medicines by Thin Layer Chromatography-Densitometry", *Der Pharma Chemica*, 7(5), pp. 335-341.

124.Sequaris J.M., Koglin E., (1987), "Direct analysis of high-performance thin-layer chromatography spots of nucleic purine derivatives by surface-enhanced Raman scattering spectrometry", *Anal Chem*, 59(3), pp. 525-527.

125.Shirtcliffe N., Nickel U., Schneider S., (1999), "Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles", *Journal of Colloid and Interface Science*, 211, pp. 122–129.

126. Shobha A., Sachin D., Awanish U., et al., (2012), "Identification of Prednisolone, Methylprednisolone and Their Metabolites in Human urine using HPLC (+) ESI-MS/MS and Detection of Possible Adulteration in Indian Herbal Drug Preparations", *Ibnosina Journal of Medicine and Biomedical Sciences*, pp. 44-52.

127. Srivastava M., (2010), *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*, Springer Science & Business Media,

128. Sulk R.A., Corcoran R.C., Carron K.T., (1999), "Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Amphetamine and Methamphetamine by Modi®cation with 2-Mercaptonicotinic Acid", *Applied spectroscopy*, 53(8), pp. 954-959.

129. Sweetman S.C., Pharm B., PharmS F.R., (2009), *Martindale - the complete drug reference* (Thirty-sixth edition ed. Vol. 2), Pharmaceutical Press,

130. Szostak R., Mazurek S., (2004), "FT-Raman quantitative determination of ambroxol in tablets", *Journal of Molecular Structure*, 704(1-3), pp. 229-233.

131. Szostak R., Sylwester M., (2002), "Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetamoniphen in tablets by FT-Raman spectrosocpy", *Analyst*, pp. 144-148.

132. Tiago R., Amaral J.S., Oliveira M.B.P.P., (2016), "Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, pp. 43-62.

133. Torre C., Blanco J., J. S., (2015), "Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin", *Food safety / Scientific article*, 82, pp. 1-9.

134. Trachta G., Schwarze B., Sagmuller B., Brehm G., Schneider S., (2004), "Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine", *Journal of Molecular Structure*, 693, pp. 175–185.

135. Scientific working group for the analysis of seized drugs (SWGDRUGS) recommendations (2014).

136. United States Pharmacopeial Convention, (2018), *United States Pharmacopeia 40 National Formulary 35 through first supplement*

137. Vaclavik L., Krynitsky A.J., Rader J.I., (2014), "Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, pp. 6767-6790.

138. Vankeirsbilck T., Vercauteren A., Baeyens W., et al., (2002), "Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(12), pp. 869-877.

139. Venkata S.K., Thejaswini J.C., Raju M.V.P., et al., (2015), "RP-HPLC method development for the quantitative determination of Dexamethasone in herbal formulaltion", *World Journal of Pharmaceutical Research*, pp. 1148-1157.

140. Vizsnyiczai G., Lestyán T., Joniova J., et al., (2015), "Optically Trapped Surface-Enhanced Raman Probes Prepared by Silver Photo-Reduction to 3D Microstructures", *Langmuir*, pp. 1-37.

141. Wiest J., Schollmayer C., Gresser G., Holzgrabe U., (2014), "Identification and quantitation of the ingredients in a counterfeit Vietnamese herbal medicine against rheumatic diseases", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 97, pp. 24-28.

142. Wisnuwardnani H.A., Fidriannay I., Ibrahim S., (2013), "Method development for simultaneous analysis of steroid and non steroid antinflamatory substances in jamu pegal linu using TLC-spectrosphotodensitomometry", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), pp. 749-753.

143. Xie Z., Wang Y., Chen Y., et al., (2017), "Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish", *Food Chem*, 230, pp. 547-552.

144. Yaseen T., Pu H., Sun D.-W., (2018), "Functionalization techniques for improving SERS substrates and their applications in food safety evaluation: A review of recent research trends", *Trends in Food Science & Technology*, 72, pp. 162-174.

145. Zailina A.M., Aminah A., Ambar Y.M., (2013), "Optimization of Extraction Methods for Determination of Phosphodiesterase-5 (PDE5) Inhibitors in Premix Coffee", *Sains Malaysiana*, 42(2), pp. 135–142.

146. Zhang R., Yin L., Jin S., (2014), "Detection of illegally added drugs in dietary supplements by near-infrared spectral imaging", *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 7(6), pp. 1450032-1450039.

147. Zhang Y., Huang X., Liu W., et al., (2013), "Analysis of drugs added into Chinese traditional Patent medicine using Surface-enhanced Raman scattering", *Analytical sciences*, 29.

148. Zhang Ying, Zhiqiang Huang, Li Ding, et al., (2010), "Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Separation Science*, 33, pp. 2109–2114.

149. Zhao H., Hasi W., Bao L., et al., (2017), "Rapid Detection of Sildenafil Drugs in Liquid Nutraceuticals Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Technology", *Chinese Journal of Chemistry*, 35(10), pp. 1522-1528.

150. Zheng L., Mao H., Zhang L., et al., (2014), "Aminopyrine Raman spectral features characterised by experimental and theoretical methods: toward rapid

SERS detection of synthetic antipyretic– analgesic drug in traditional Chinese medicine", *Analytical Methods,* 6, pp. 5925–5933.

151. Zhu Q., Cao Y., Cao Y., Chai Y., Lu F., (2014), "Rapid on-site TLC-SERS detection of four antidiabetes drugs used as adulterants in botanical dietary supplements", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(7), pp. 1877-1884.

152. Zhu Q., Yu X., Wu Z., Lu F., Yuan Y., (2018), "Antipsychotic drug poisoning monitoring of clozapine in urine by using coffee ring effect based surface-enhanced Raman spectroscopy", *Anal Chim Acta*, 1014, pp. 64-70.

Trang Web

153. FDA (Food & Drug Admistration of United State of America),(2018), Tainted Products Marketed as Dietary Supplements_CDER, https://www.accessdata.fda.gov/scripts/sda/sdNavigation.cfm?sd=tainted_supplements_cder&displayAll=true, Retrieved 20/3/2018.

154. MagLab,(2014), Electrospray ionization (ESI) https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/esi, Retrieved 16/03/2018.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1. CÔNG THỨC CÁC BÀI THUỐC, CÁCH BÀO CHẾ VÀ HÌNH ẢNH CÁC NỀN MẪU PL-1

PHỤ LỤC 2. SẮC KÝ ĐỒ KHỐI PHỔ VÀ KẾT QUẢ ĐỊNH DANH MẪU DƯƠNG TÍNH..... PL-12

PHỤ LỤC 3. HÌNH ẢNH SẮC KÝ ĐỒ BẢN MỎNG, KẾT QUẢ CHỒNG PHỔ UV CỦA CÁC CHẾ PHẨM..... PL-67

PHỤ LỤC 4. HÌNH ẢNH CÁC MẪU DƯƠNG TÍNH PL-96

PHỤ LỤC 5. QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÂN DƯỢC TRỘN TRÁI PHÉP TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC PL-97

PHỤ LỤC 1. CÔNG THỨC CÁC BÀI THUỐC, CÁCH BÀO CHẾ VÀ HÌNH ẢNH CÁC NỀN MẪU

1.1. Nền mẫu hỗ trợ bệnh xương khớp

1.1.1.Nền N1: Viên nang Độc hoạt ký sinh thang

Bảng PL1.1.1. Công thức bài thuốc Độc hoạt tang ký sinh thang

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Độc hoạt	*Radix Angelicae pubescentis*	12 g
2	Tang ký sinh	*Herba Loranthi*	8 g
3	Thục địa	*Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*	8 g
4	Đỗ trọng	*Cortex Eucommiae*	8 g
5	Ngưu tất	*Radix Achyranthis bidentatae*	8 g
6	Tế tân	*Radix et Rhizoma Asarii*	8 g
7	Tần giao	*Radix Gentianae macrophyllae*	8 g
8	Bạch linh	*Poria*	8 g
9	Quế tâm	*Cortex Cinnamomi*	8 g
10	Phòng phong	*Radix Saposhnikoviae divaricatae*	8 g
11	Xuyên khung	*Rhizoma Ligustici wallichii*	8 g
12	Đảng sâm	*Radix Ginseng*	8 g
13	Cam thảo	*Radix Glycyrrhizae*	8 g
14	Đương quy	*Radix Angelicae sinensis*	8 g
15	Bạch thược	*Radix Paeoniae lactiflorae*	8 g

❖ *Cách bào chế*

Điều chế bột mịn cao dược liệu: Cân các thành phần thục địa, đỗ trọng, ngưu tất theo công thức bài thuốc và thái nhỏ. Thêm lượng nước ngập dược liệu, đun sôi. Giảm nhiệt độ (đủ để duy trì nước sôi), tiếp tục đun sôi trong 3 giờ, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau đó lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ và đun sôi tiếp trong 2 giờ, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau đó lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2 đem cô cách thủy đến cao đặc. Sấy khô cao đặc đến khi thu được cao khô. Xay và rây qua rây 200 μm thu được bột mịn cao dược liệu.

Điều chế bột mịn dược liệu: Cân các thành phần độc hoạt, tang ký sinh, tế tân, tần giao, bạch linh, quế tâm, phòng phong, xuyên khung, đảng sâm, cam thảo, đương quy, bạch thược theo công thức bài thuốc và thái nhỏ. Trộn đều, sấy khô rồi xay thành bột mịn, rây qua rây kích thước 200 µm, đồng nhất mẫu thu được bột mịn dược liệu.

Trộn bột cao dược liệu với bột dược liệu, thêm tá dược trơn (aerosil) tỷ lệ 1% trộn đồng nhất, rây qua rây kích thước 200 µm và đóng vào nang cứng số 0.

Một bài thuốc điều chế đươc 150 viên nang (0,6 g/viên)



Hình PL1.1.1. Nền viên nang

1.1.2. Nền N2: Bột Tam tý thang

Bảng PL1.1.2. Công thức bài thuốc Tam tý thang

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Đảng sâm	*Codonopsis pilosula*	24 g
2	Hoàng kỳ	*Radix Astragali membranacei*	36 g
3	Bạch linh	*Poria*	36 g
4	Cam thảo	*Radix Glycyrrhizae*	18 g
5	Đương quy	*Radix Angelicae sinensis*	36 g
6	Xuyên khung	*Rhizoma Ligustici wallichii*	36 g
7	Bạch thược	*Radix Paeoniae lactiflorae*	36 g
8	Sinh địa	*Radix Rehmanniae glutinosae*	48 g
9	Đỗ trọng	*Cortex Eucommiae*	30 g
10	Ngưu tất	*Radix Achyranthis bidentatae*	48 g
11	Tục đoạn	*Radix Dipsaci*	48 g
12	Tế tân	*Radix et Rhizoma Asarii*	12 g
13	Quế tâm	*Cortex Cinnamomi*	24 g

14	Tần giao	*Radix Gentianae macrophyllae*	36 g
15	Độc hoạt	*Radix Angelicae pubescentis*	36 g
16	Phòng phong	*Radix Saposhnikoviae divaricatae*	30 g

❖ *Cách bào chế*

Cân từng loại dược liệu theo công thức và thái nhỏ. Trộn đều, sấy khô rồi xay thành bột mịn, rây qua rây kích thước 200 µm, đồng nhất mẫu. Bột được đóng gói khối lượng 1,2g/gói.

Một bài thuốc điều chế được 380 gói (1,2 g/gói).



Hình PL1.1.2. Nền bột

1.1.3. Nền N3: Viên nén Đại tần giao thang

Bảng PL1.1.3. Công thức bài thuốc Đại tần giao thang

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Tần giao	*Radix Gentianae macrophyllae*	8 g
2	Thạch cao	*Gypsum Fibrosum*	8 g
3	Đương quy	*Radix Angelicae sinensis*	4 g
4	Bạch thược	*Radix Paeoniae lactiflorae*	4 g
5	Xuyên khung	*Rhizoma Ligustici wallichii*	4 g
6	Sinh địa	*Radix Rehmanniae glutinosae*	4 g
7	Thục địa	*Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*	4 g
8	Bạch truật	*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*	4 g
9	Bạch linh	*Poria*	4 g
10	Cam thảo chích	*Radix Glycyrrhizae praeparata*	4 g
11	Hoàng cầm	*Radix Scutellariae*	4 g

12	Phòng phong	*Radix Saposhnikoviae divaricatae*	4 g
13	Khương hoạt	*Rhizoma et Radix Notopterygii*	4 g
14	Độc hoạt	*Radix Angelicae pubescentis*	4 g
15	Bạch chỉ	*Radix Angelicae dahuricae*	4 g
16	Tế tân	*Radix et Rhizoma Asarii*	2 g

❖ *Cách bào chế*

Điều chế bột mịn cao dược liệu: Cân các thành phần dược liệu theo công thức và thái nhỏ. Thêm lượng nước ngập dược liệu, đun sôi. Giảm nhiệt độ (đủ để duy trì nước sôi), tiếp tục đun sôi trong 3 giờ, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau đó lọc qua vải thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ và đun sôi tiếp trong 2 giờ, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau đó lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2 đem cô cách thủy đến cao đặc. Sấy khô cao đặc đến khi thu được cao khô. Xay và rây qua rây 200 µm thu được bột mịn cao dược liệu. Trộn bột mịn cao dược liệu với tá dược độn (tinh bột). Thêm tá dược dính (hồ tinh bột) tạo khối ẩm. Xát hạt qua rây 1000 µm thu được hạt ướt. Sấy hạt đến hàm ẩm thích hợp rồi sửa lại hạt qua rây 1000 µm. Thêm tá dược trơn (talc, magnesi stearat) với tỷ lệ 1% vào khối hạt sau đó trộn đều và dập viên. 1 bài thuốc điều chế được 50 viên nén (0,2 g/viên).



Hình PL10.1.1. Nền viên nén

1.2. Nền mẫu hỗ trợ bệnh đái tháo đường

1.2.1.Nền N4: Viên nén hỗ trợ đái tháo đường

Bảng PL1.2.1. Công thức bài thuốc bào chế viên nén hỗ trợ điều trị đái tháo đường

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Diệp hạ châu	*Phyllanthus urinaria* L.	330 mg
2	Chè vằng	*Jasminum subtriplinerve* Blume	330 mg
3	Quả nhàu	*Morinda citrifolia* L.	330 mg
4	Lá hoàn ngọc	*Pseuderanthemum latifolium*	330 mg
5	Mướp đắng	*Momordica charantia* L.	330 mg
6	Dây thìa canh	*Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. Ex Schult	330 mg

Tiến hành bào chế theo qui trình sau:

Làm bột mịn cao dược liệu: Cân các thành phần dược liệu đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 1000 lần. Thái nhỏ. Thêm lượng nước đủ ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 3 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 3 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu lần 1 đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 2 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 2 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2. Cô cách thủy đến cao đặc. Sấy khô cao đặc đến khi thu được cao khô. Rây qua rây 200 µm thu được bột mịn dược liệu

Trộn bột mịn cao dược liệu với tá dược độn: Tinh bột. Thêm tá dược dính: hồ tinh bột tạo khối ẩm. Rây qua rây 1000 µm tạo hạt. Sấy hạt đến hàm ẩm thích hợp. Thêm tá dược trơn: Talc, Magie stearat với tỷ lệ 1%. Dập viên, đóng vỉ.



Hình PL 1.2.1. Nền viên nén hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường

1.2.2.Nền N5: Viên nang hỗ trợ đái tháo đường

Bảng PL1.2.2. Công thức bài thuốc bào chế viên nang hỗ trợ điều trị đái tháo đường

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Giảo cổ lam	*Gynostemma pentaphyllum*	300 mg
2	Bằng lăng nước	*Lagerstroemia speciosa*	300 mg
3	Tri mẫu	*Anemarrhenae Rhizome*	300

Chế tạo cao đặc dược liệu: Cân các thành phần dược liệu Giảo cổ lam, chi mẫu đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 1000 lần. Thái nhỏ,Thêm lượng nước đủ ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 3 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 3 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu lần 1 đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 2 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 2 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2. Cô cách thủy đến cao đặc

Làm bột mịn dược liệu: Cân thành phần: Bằng lăng nước đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 1000 lần. Thái nhỏ, Sấy khô, Xay, Trộn đều. Rây qua rây 200 µm thu được bột mịn dược liệu. Trộn cao đặc dược liệu với bột mịn dược liệu tạo khối ẩm. Rây qua rây 1000 µm tạo hạt. Sấy hạt đến hàm ẩm thích hợp. Trộn hạt với tá dược trơn: bột talc, Magnesi sterat tỷ lệ 1%. Đóng nang số 0.



Hình PL 1.2.2. Nền viên nang hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường

1.2.3.Nền N6: Viên hoàn thận đường hoàn

Bảng PL1.2.3. Công thức bài thuốc bào chế viên hoàn thận đường hoàn

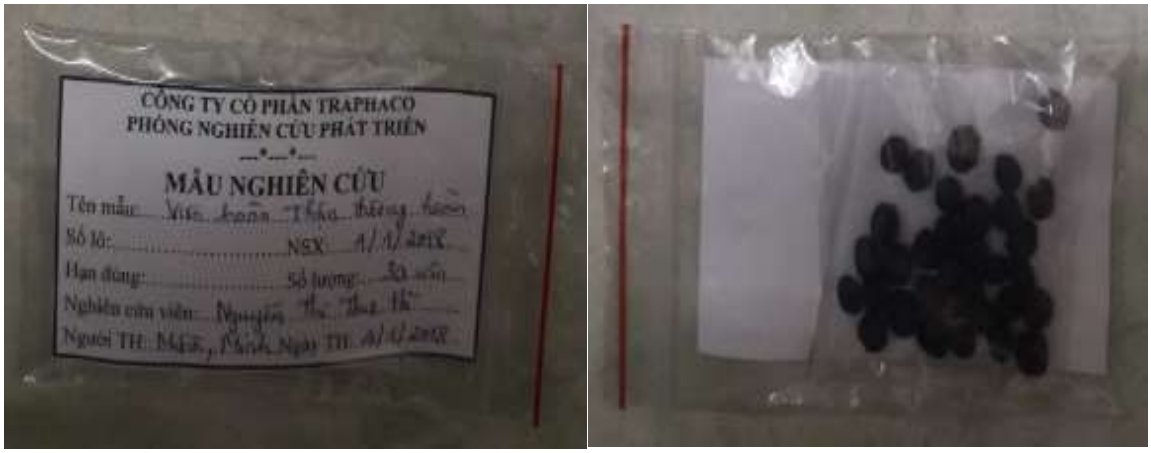
STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Đảng sâm	*Radix Codonopsis*	20g
2	Dây thìa canh	*Gymnema sylvestre (*Retz.) R. Br. Ex Schult	20 g

3	Khổ qua	*Momordica charantia L.*	20g
4	Quế nhục	*Cortex Cinnamomi*	20 g
5	Nấm linh chi	*Ganoderma lucidum* (Leyss ex. Fr.) Karst	20g
6	Kê cốt thảo	*Abrus mollis Hance*	20 g
7	Mạch môn	*Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker-Gawl	20 g
8	Hải mã	*Hippocampus sp.*	1 con
9	Đinh lăng	*Panax fruticosum* L.	20 g

Tiến hành bào chế theo qui trình sau:

Chế tạo cao đặc dược liệu: Cân các thành phần dược liệu đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 1000 lần. Thái nhỏ. Thêm lượng nước đủ ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 3 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 3 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu lần 1 đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 2 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 2 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2. Cô cách thủy đến cao đặc. Vê viên: dùng cao đặc vê thành viên hình tròn. Sấy khô viên

Dịch bao màu: Cân than hoạt, bột Talc, tinh bột, nước. Tạo hồ tinh bột. Hòa than hoạt, bột talc vào hồ tinh bột tạo dịch bao màu. Bao màu đến khi viên có màu đồng nhất. Sấy khô viên. Đóng gói.



Hình PL 1.2.3. Nền viên hoàn

13. Nền mẫu hỗ trợ bệnh lý liệt dương

1.3.1.Nền N7: Viên nang Sâm Nhung bổ thận

Bảng PL1.3.1. Công thức bài thuốc Sâm Nhung bổ thận

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Ba kích	*Radix Morindae officinalis*	30g
2	Hà thủ ô chế	*Radix Polygoni multiflori praeparata cum succo Glycines Sotae*	29 g
3	Bách hợp	*Bulbus Lilii*	30 g
4	Nhân sâm	*Radix Ginseng*	3,6 g
5	Bạch linh	*Poria*	29 g
6	Bạch truật	*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*	18 g
7	Nhung hươu	*Cornu Cervi pantotrichum*	1,2 g
8	Cam thảo	*Radix Glycyrrhizae*	2,5 g
9	Hạt sen	*Semen Nelumbinis*	44 g
10	Thỏ ty tử	*Semen Cuscutae*	20 g
11	Câu kỷ	tử *Fructus Lycii*	20 g
12	Thục địa	*Radix Rehmanniae praeparata*	120 g
13	Cẩu tích	*Rhizoma Cibotii*	15 g
14	Trạch tả	*Rhizoma Alismatis*	15g
15	Củ mài	*Rhizoma Dioscoreae persimilis*	38 g
16	Tục đoạn	*Radix Dipsaci*	29 g
17	Đảng sâm	*Radix Codonopsis*	12g
18	Đỗ trọng	*Cortex Eucommiae*	12g
19	Viễn chí	*Radix Polygalae*	8 g
20	Đương quy	*Radix Angelicae sinensis*	20 g

Tiến hành bào chế theo qui trình sau:

Chế cao đặc dược liệu: Cân các thành phần: dược liệu Ba kích, bách hợp, bạch linh, nhục thung dung, bạch truật, cam thảo, hạt sen, thỏ ty tử, câu kỷ tử, tục đoạn, đảng sâm, xuyên khung, đỗ trọng, viễn chí, củ mài, trạch tả, cẩu tích. đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 20 lần. Thái nhỏ. Thêm lượng nước đủ ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 3 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 3 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu lần 1 đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 2 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược

liệu. Sau 2 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2. Cô cách thủy đến cao đặc

Chế bột mịn dược liệu: Cân các thành phần: đương quy, nhân sâm, nhung hươu, hà thủ ô chế theo công thức với tỷ lệ gấp 20 lần. Thái nhỏ. Sấy khô. Xay. Trộn đều, Rây qua rây 200 µm thu được bột mịn dược liệu. Trộn cao đặc dược liệu với bột mịn dược liệu tạo khối ẩm. Rây qua rây 1000 µm tạo hạt. Sấy hạt đến hàm ẩm thích hợp. Trộn hạt với tá dược trơn: bột talc, magnesi sterat tỷ lệ 1%. Đóng nang số 0.



Hình PL 1.3.1. Nền viên nang

1.3.2.Nền N8: Viên hoàn Minh Mạng

Bảng PL1.3.2. Công thức bài thuốc Minh mạng thang

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Nhân sâm	*Radix Ginseng*	30g
2	Dâm dương hoắc	*Epimedium macranthum* Morr. & Decne	29 g
3	Nhục thung dung	*Cistanche deserticola* Y.C.Ma	30 g
4	Thục địa	*Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*	3,6 g
5	Ba kích	*Radix Morindae officinalis*	29 g
6	Đương qui	*Radix Angelicae sinensis*	12 g
7	Liên nhục	*Semen Nelumbinis*	18 g
8	Viễn chí	*Radix Polygalae*	1,2 g
9	Cam thảo	*Radix Glycyrrhizae*	2,5 g
10	Xa tiền tử	*Semen Plantaginis*	44 g
11	Đỗ trọng	*Cortex Eucommiae*	3,6 g
12	Kỷ tử	*Fructus Lycii*	20 g
13	Hoàng kỳ	*Astragalus menbranaceus (Fisch) Bunge*	20 g
14	Cúc hoa	*Chrysanthemum sinense Sabine*	120 g

15	Táo nhân	*Semen Zizyphi jujubae*	15 g
16	Hoài sơn	*Radix Dioscoreae persimilis*	15g
17	Xà sàng tử	*Semen Cnidii Monnieri*	38 g
18	Đại táo	*Zizyphus sativa Mill*	29 g
19	Ngũ vị tử	*Schisandra chinensis (Turcz) Baill*	12g
20	Phá cổ chỉ	*Fructus Psoraleae*	15g

Tiến hành bào chế theo qui trình sau:

Chế cao đặc dược liệu: Cân các thành phần: dược liệu đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 50 lần. Thái nhỏ. Thêm lượng nước đủ ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 3 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 3 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu lần 1 đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 2 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 2 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2. Cô cách thủy đến cao đặc.

Vê viên: dùng cao đặc vê thành viên hình tròn. Sấy khô viên. Dịch bao màu: Cân than hoạt, bộ Talc, đường, nước, Tạo siro 1:1, Hòa than hoạt, talc vào siro tạo dịch bao màu. Bao màu đến khi viên có màu đồng nhất. Sấy khô viên. Đóng gói



Hình PL 1.3.2. Nền viên hoàn

1.3.3.Nền N9: Cao thuốc Điều nguyên cứu bản thang

Bảng PL1.3.3. Công thức cao thuốc Điều nguyên cứu bản thang

STT	Thành phần	Tên khoa học	Khối lượng
1	Bạch truật	*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*	32g
2	Hoài sơn	*Radix Dioscoreae persimilis*	20g
3	Thục địa	*Radix Rehmanniae glutinosae praeparata*	8g

4	Thỏ ty tử	*Semen Cuscutae*	16g
5	Phá cố chỉ	*Fructus Psoraleae*	12g
6	Nhục quế	*Cortex Cinnamomi*	2,4g

Tiến hành bào chế theo qui trình sau:

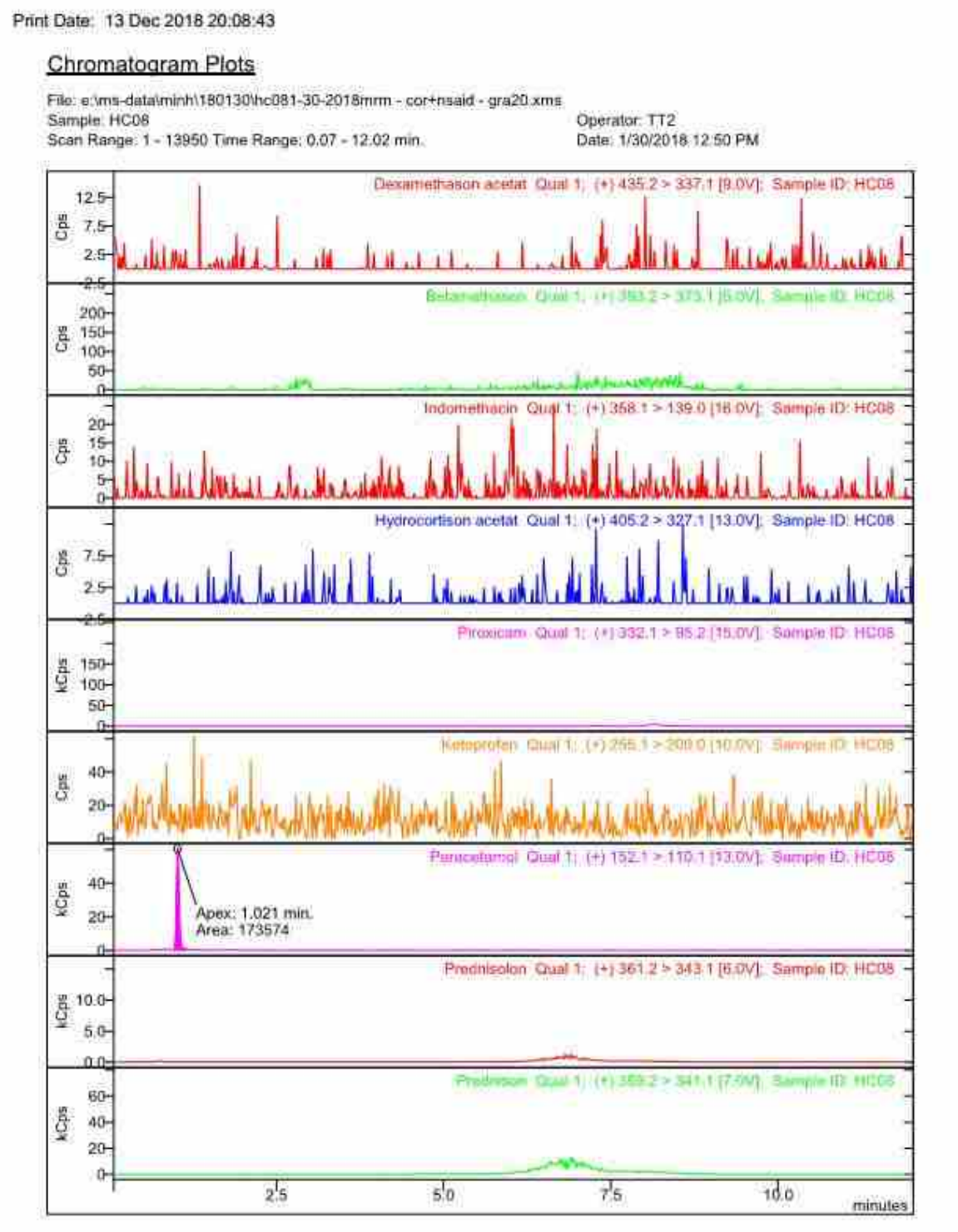
Cân các thành phần: dược liệu đã được rửa sạch, để ráo và sấy khô theo công thức với tỷ lệ gấp 20 lần. Thái nhỏ. Thêm lượng nước đủ ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 3 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 3 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 1. Thêm tiếp nước vào bã dược liệu lần 1 đến ngập, đun sôi. Giảm nhiệt độ, tiếp tục đun sôi trong 2 tiếng, thỉnh thoảng bổ sung nước để đảm bảo nước ngập dược liệu. Sau 2 tiếng, lọc qua vải lọc thu được dịch chiết lần 2. Gộp dịch lọc lần 1 và lần 2. Cô cách thủy đến cao đặc. Đóng lọ.



Hình PL 1.3.3. Nền cao thuốc

PHỤ LỤC 2. SẮC KÝ ĐỒ KHỐI PHỔ VÀ KẾT QUẢ ĐỊNH DANH MẪU DƯƠNG TÍNH

2.1. Mẫu HC08



Hình PL2.1.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính HC08

Sample ID:	HC08	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/30/2018 12:50 PM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	12/13/2018 8:05 PM	Method:	...or+nsaid - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

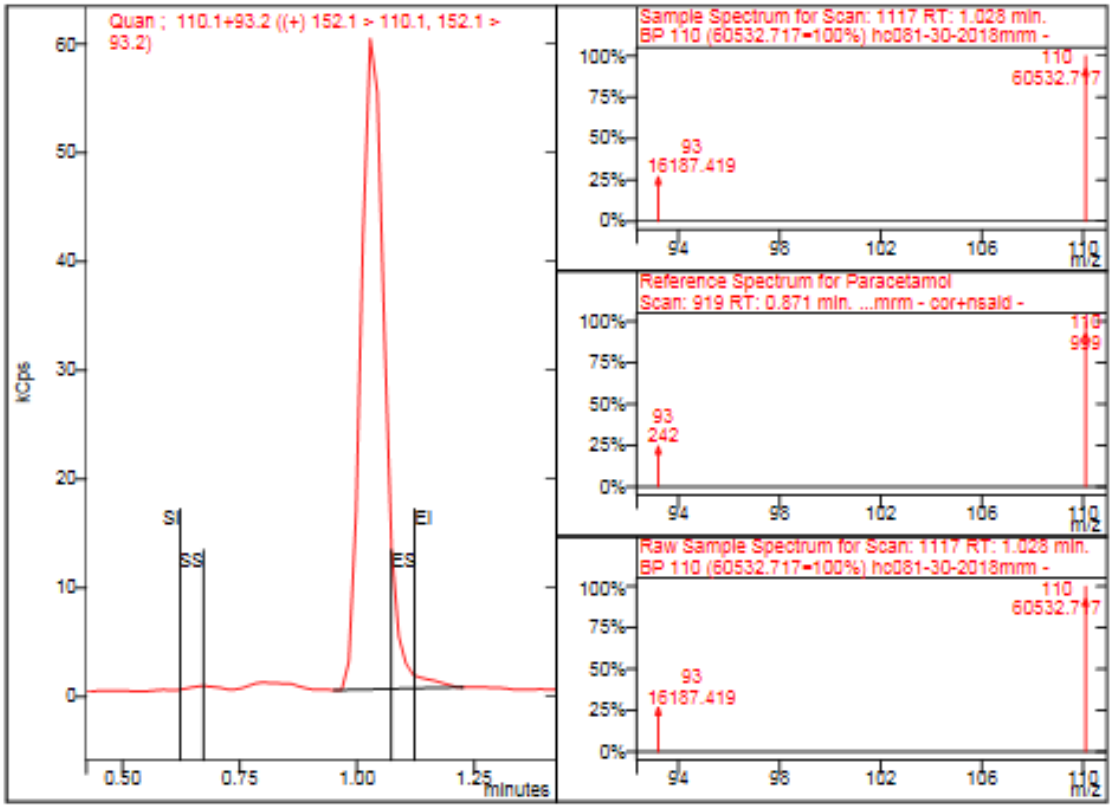
Peak Name: Paracetamol
Result Index: 7 Compound Number: 7 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Highest		
Retention Time	0.873 +/- 0.200	1.033 min.	Pass
Match Result		N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 110.1:80.5%	60.5% - 100.5% 80.1%	Pass
	m/z 93.2:19.5%	0.1% - 39.5% 20.0%	Pass

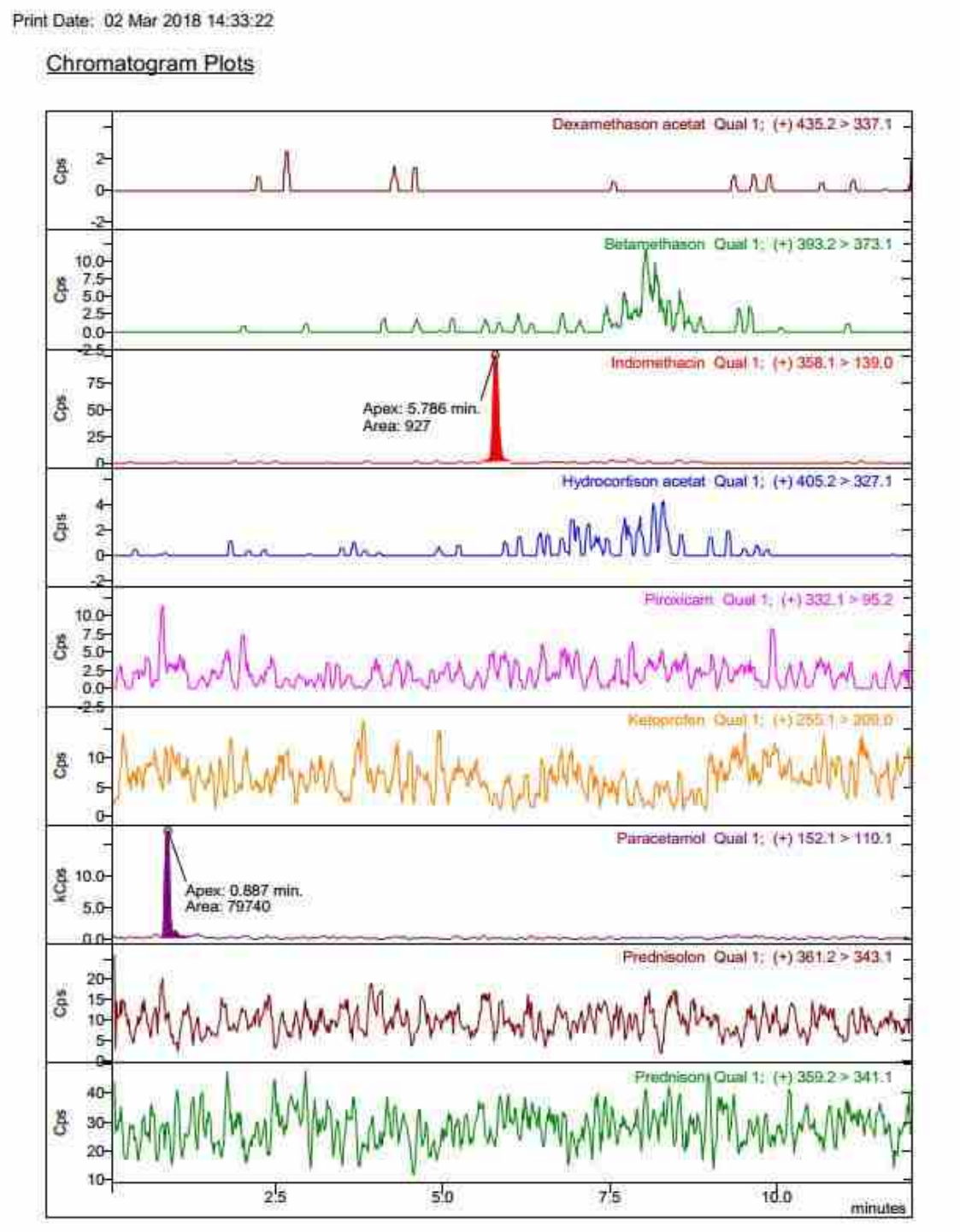
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	211813	Pass
Height		59829	
Amount (Conc.)	>= 0	211813 Counts	Pass



Hình PL2.1.1. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu HC08

2.2. Mẫu BN01



Hình PL2.2.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính BN01

Sample ID:	BN01	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 2:14 PM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 2:45 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name: Indomethacin
Result Index: 3 Compound Number: 3 CAS Number: None Identified

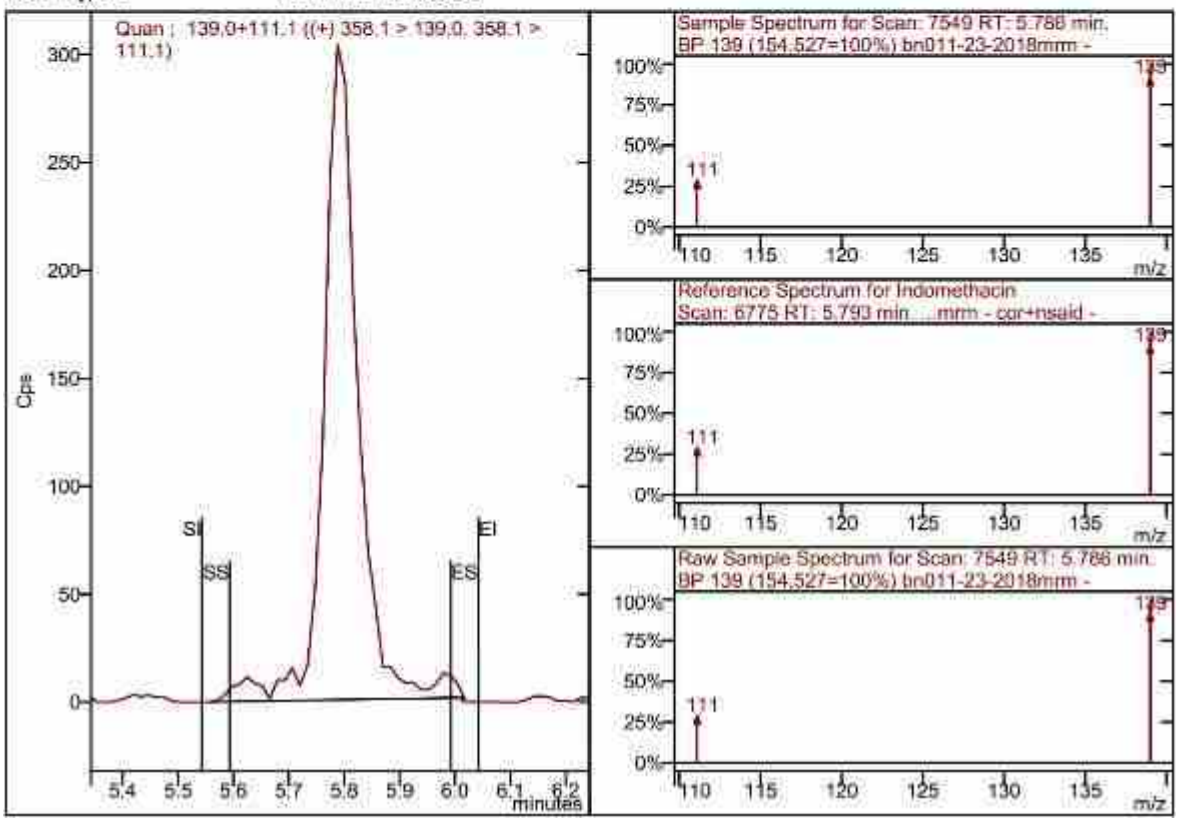
Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	5.793 +/- 0.200	5.786 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 139.0:78.8%	58.9% - 98.9%	82.6%	Pass
	m/z 111.1:21.2%	1.2% - 41.2%	17.4%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	139.0+111.1		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	1134	Pass
Height		301	
Amount (Conc.)	>= 0	1134 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.2.2. Kết quả định danh indomethacin trong mẫu BN01

Sample ID:	BN01	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 2:14 PM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 2:45 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name: Paracetamol
Result Index: 7 Compound Number: 7 CAS Number: None Identified

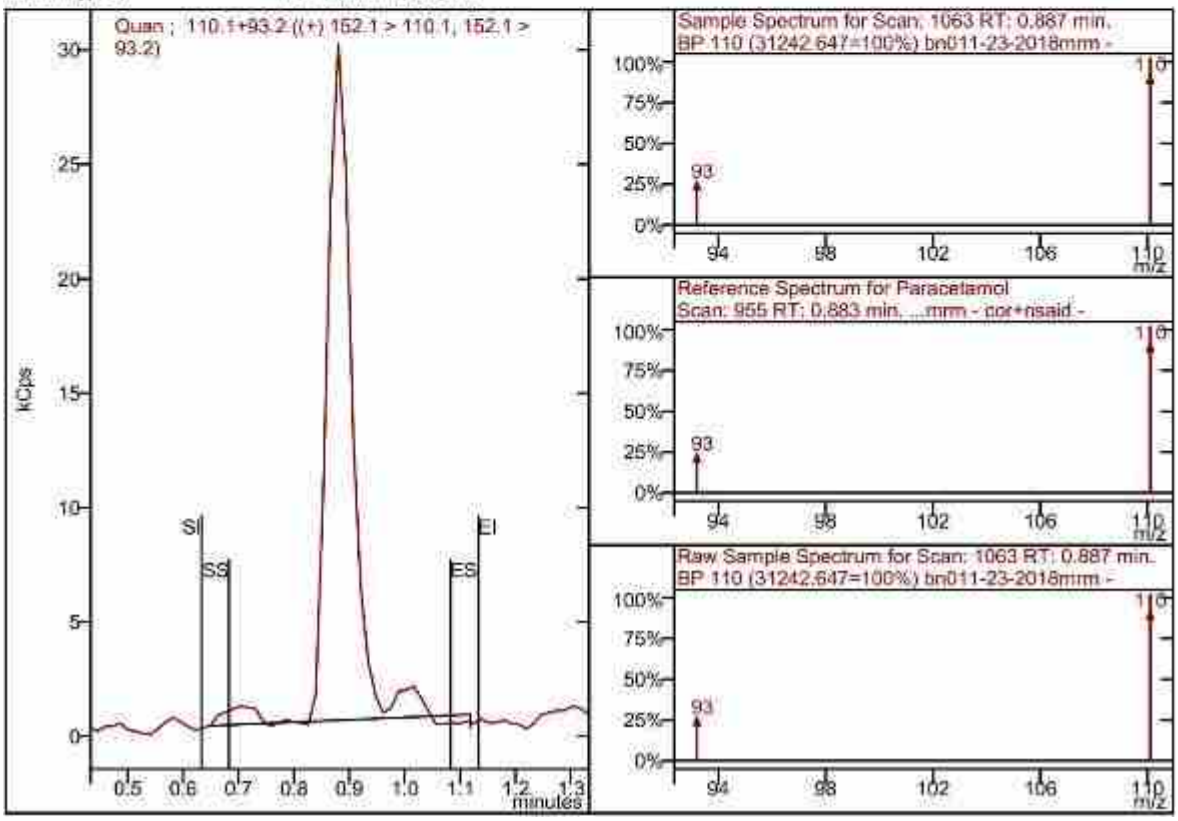
Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	0.883 +/- 0.200	0.887 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 110.1:80.4%	60.4% - 100.4%	81.9%	Pass
	m/z 93.2:19.6%	0.1% - 39.7%	21.1%	Pass

Integration and Quantitation

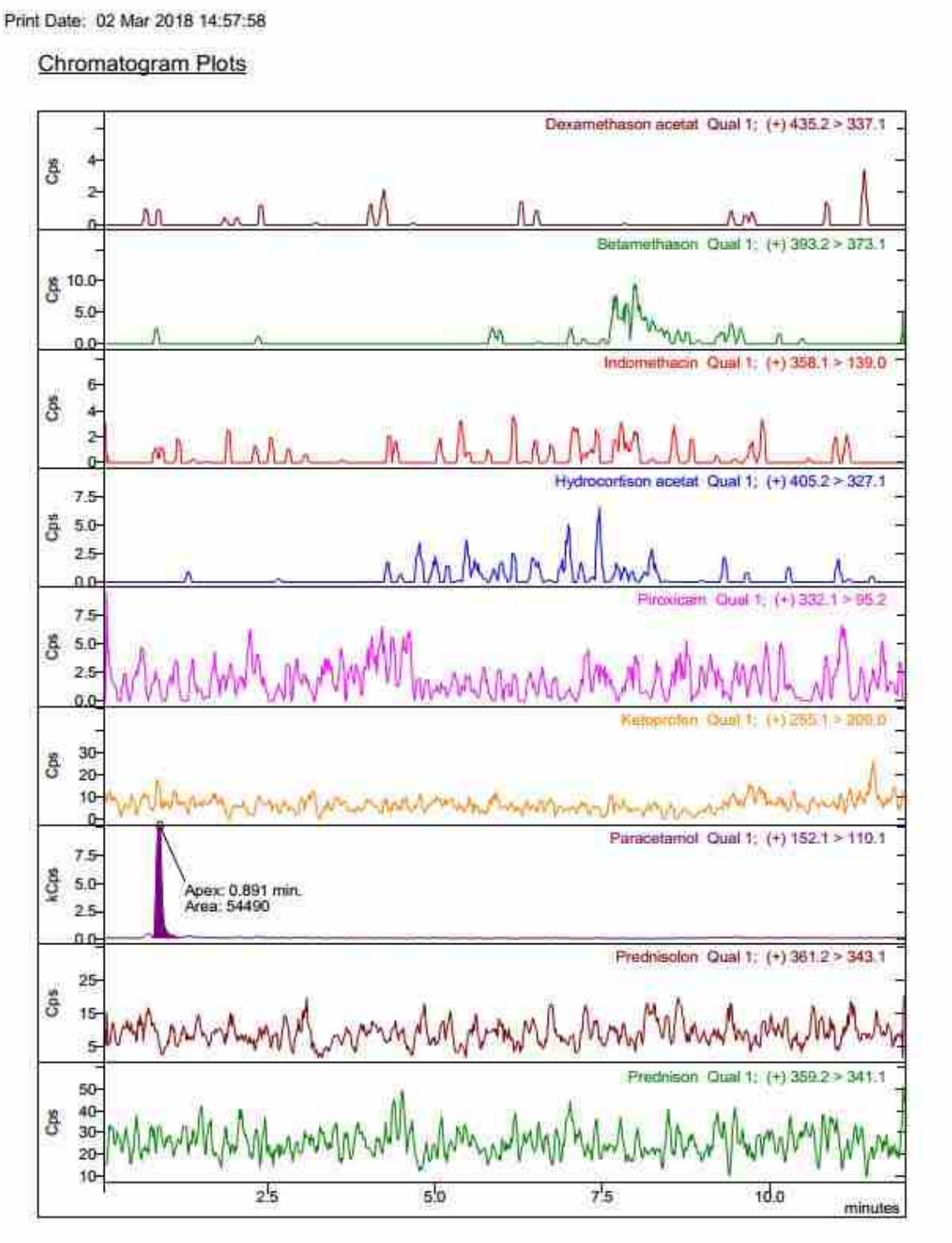
Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	97362	Pass
Height		30291	
Amount (Conc.)	>= 0	97362 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.2.3. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu BN01

2.3. Mẫu BN51



Hình PL2.3.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính BN51

Sample ID:	BN51	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 1:49 PM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 3:22 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name: Paracetamol
Result Index: 7 Compound Number: 7 CAS Number: None Identified

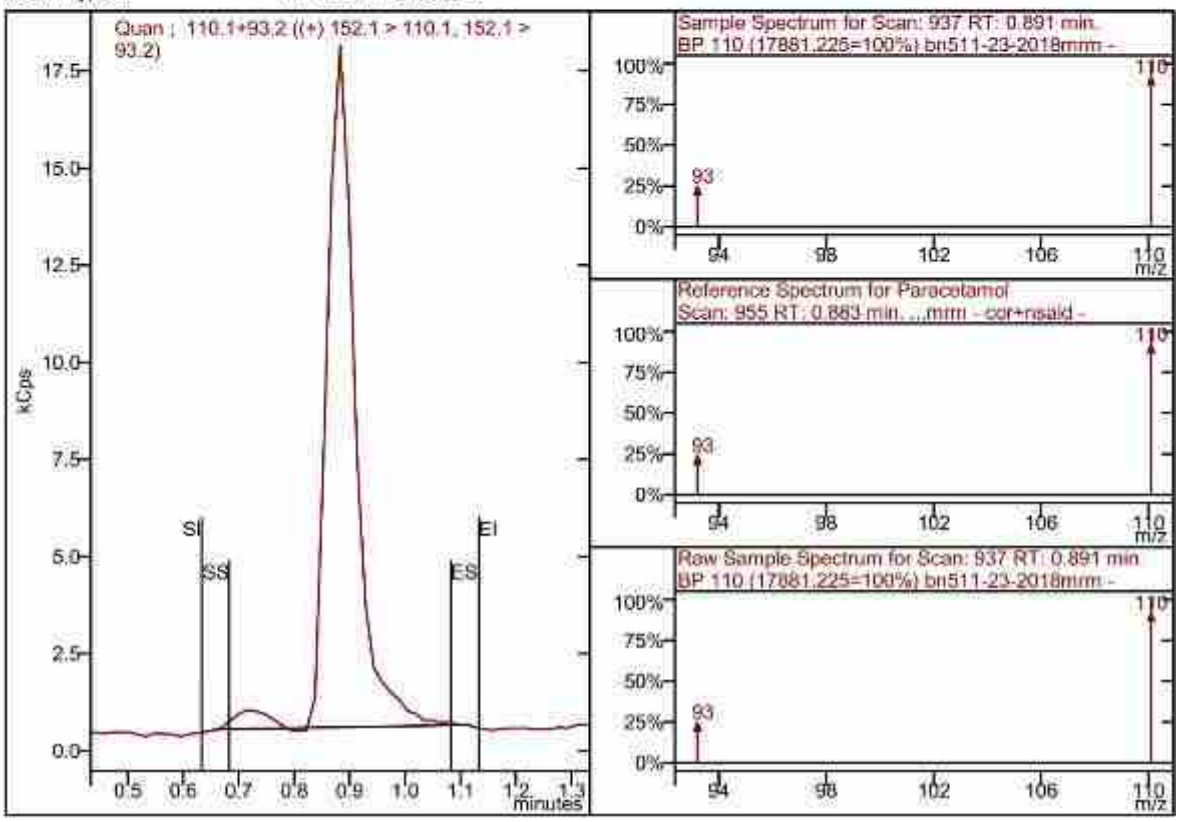
Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	0.883 +/- 0.200	0.891 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 110.1:80.4%	60.4% - 100.4%	80.1%	Pass
	m/z 93.2:19.6%	0.1% - 39.7%	19.9%	Pass

Integration and Quantitation

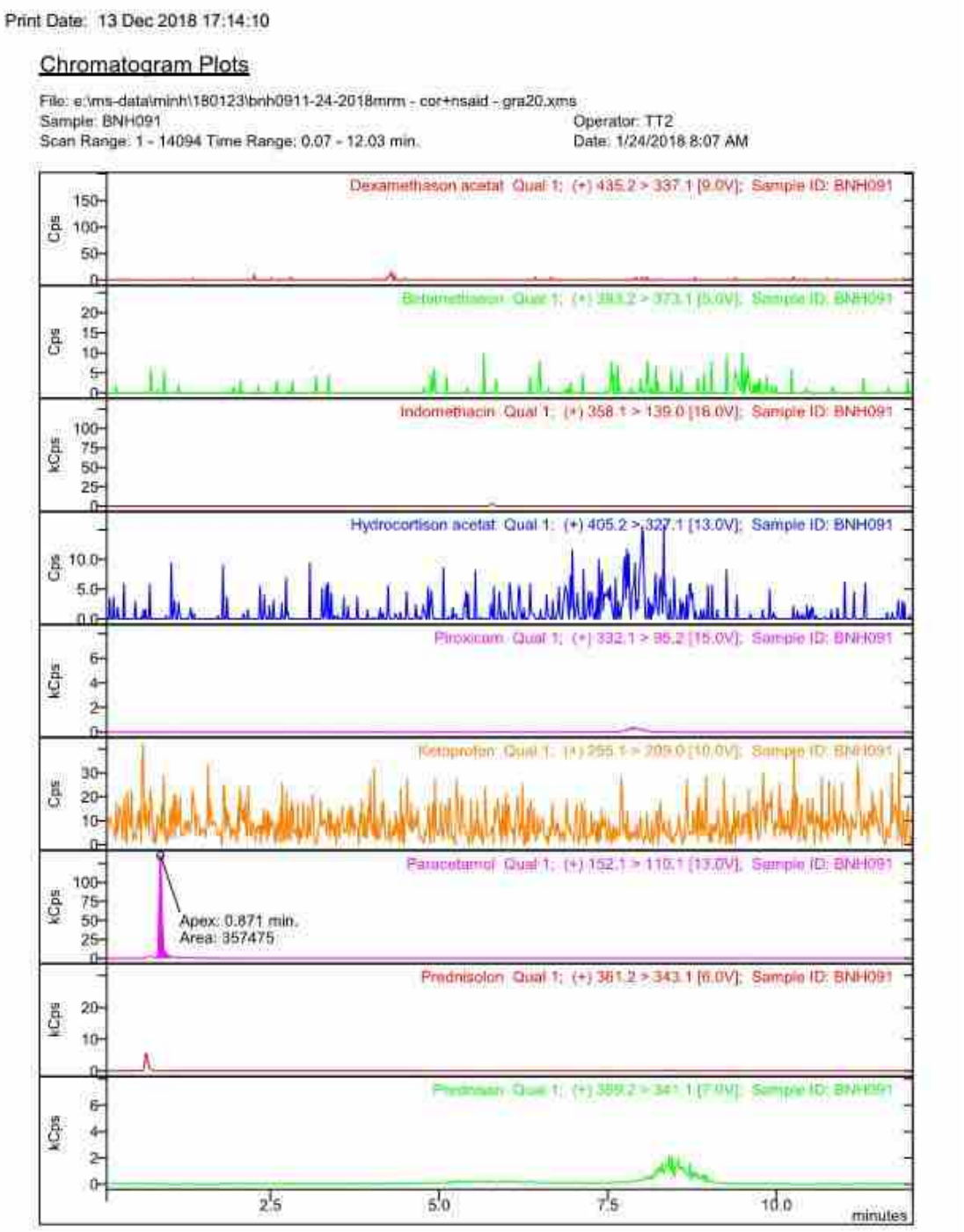
Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	68027	Pass
Height		18544	
Amount (Conc.)	>= 0	68027 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.3.2. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu BN51

2.4. Mẫu BNH091



Hình PL2.4.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính BNH091

Sample ID:	BNH091	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/24/2018 8:07 AM	Data File:	...or+nsald - gra20.xms
Calculation Date:	12/13/2018 7:54 PM	Method:	...or+nsald - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

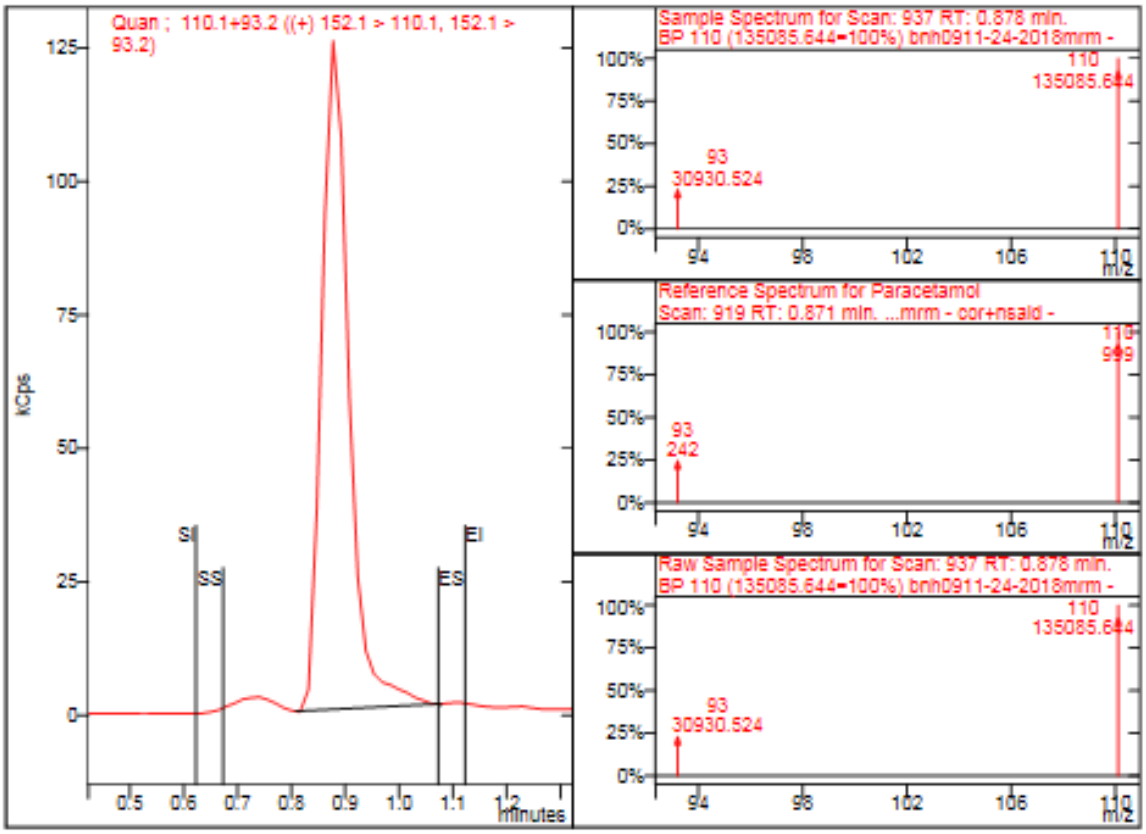
Peak Name: Paracetamol
Result Index: 7 Compound Number: 7 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	0.873 +/- 0.200	0.880 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 110.1:80.5%	60.5% - 100.5%	81.0%	Pass
	m/z 93.2:19.5%	0.1% - 39.5%	19.2%	Pass

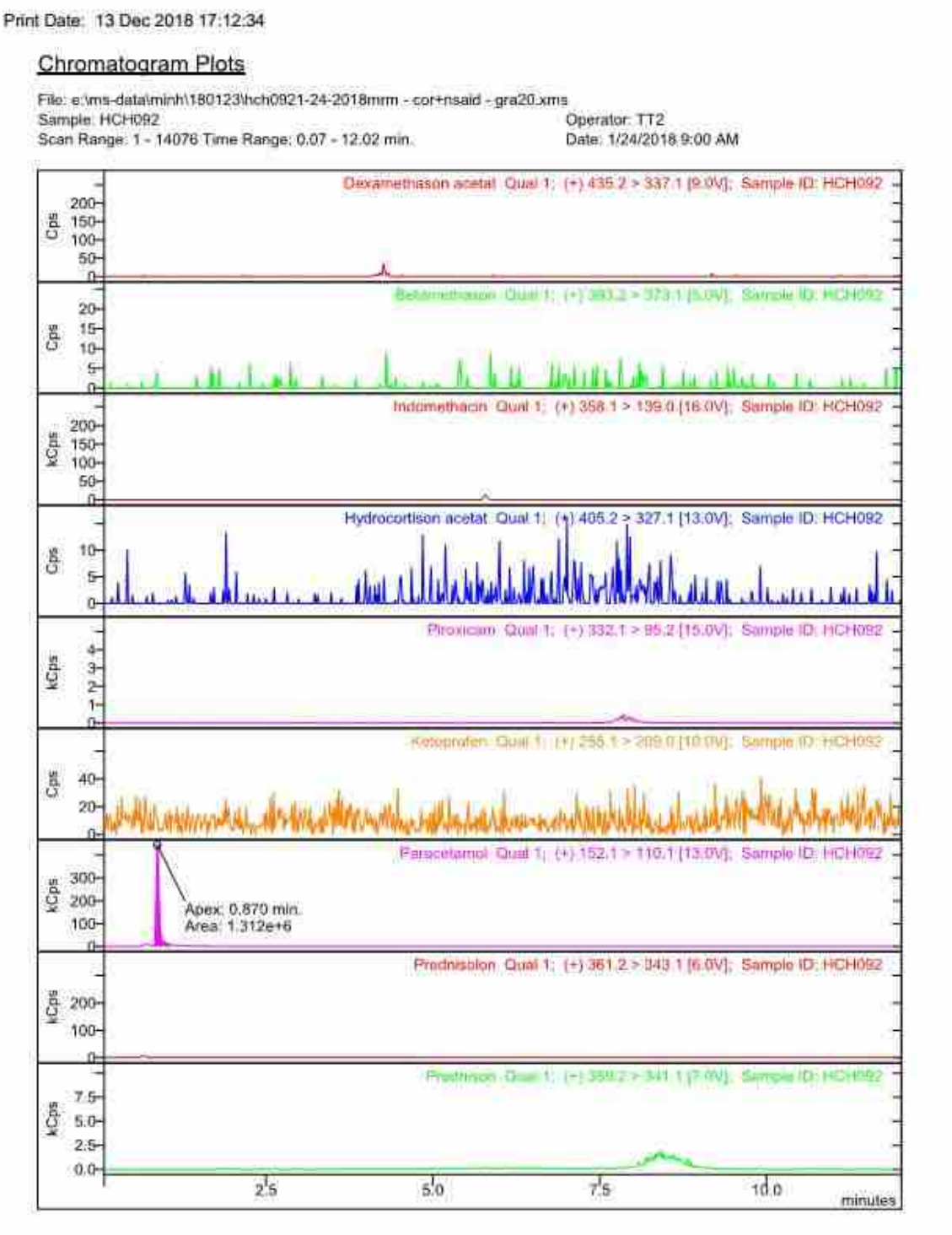
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	439840	Pass
Height		125155	
Amount (Conc.)	>= 0	439840 Counts	Pass



Hình PL2.4.2. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu BNH91

2.5. Mẫu HCH092



Hình PL2.5.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính HCH092

Sample ID:	HCH092	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/24/2018 9:00 AM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	12/13/2018 8:00 PM	Method:	...or+nsaid - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

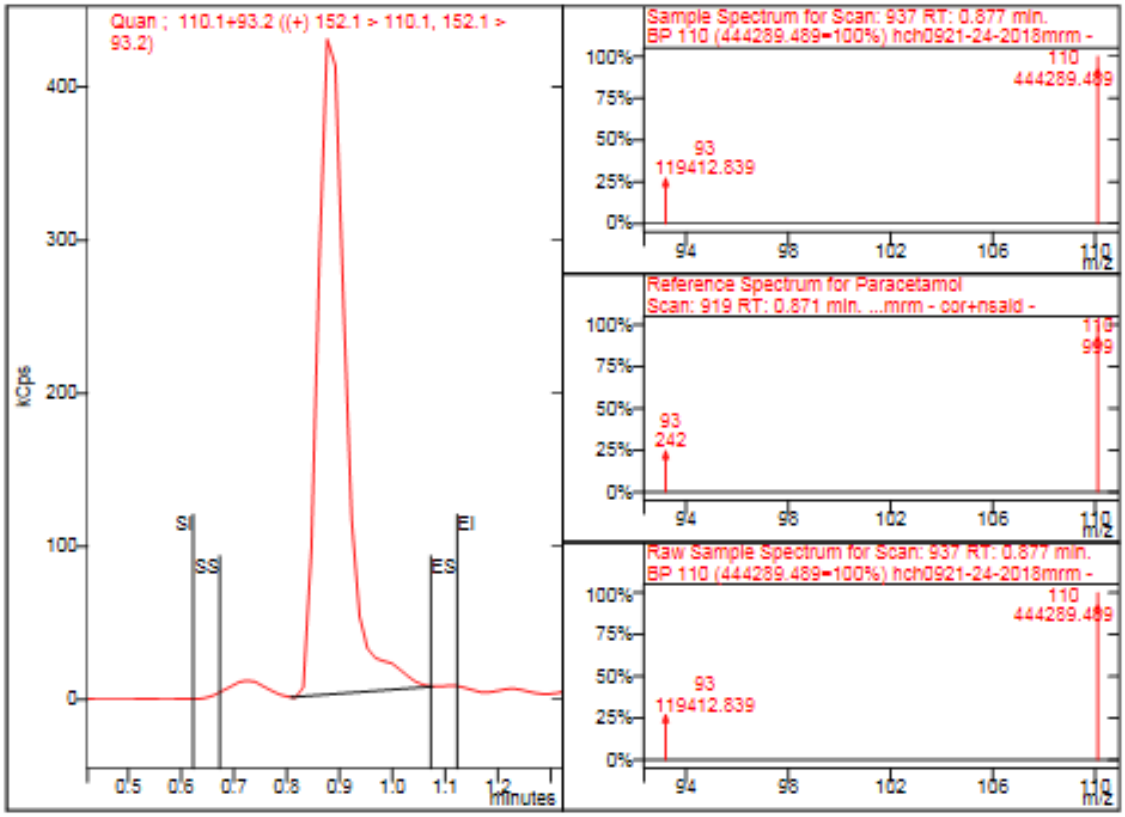
Peak Name:	Paracetamol		
Result Index:	7	Compound Number: 7	CAS Number: None

Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Highest		
Retention Time	0.873 +/- 0.200	0.883 min.	Pass
Match Result		N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 110.1:80.5%	60.5% - 100.5% 79.8%	Pass
	m/z 93.2:19.5%	0.1% - 39.5% 20.5%	Pass

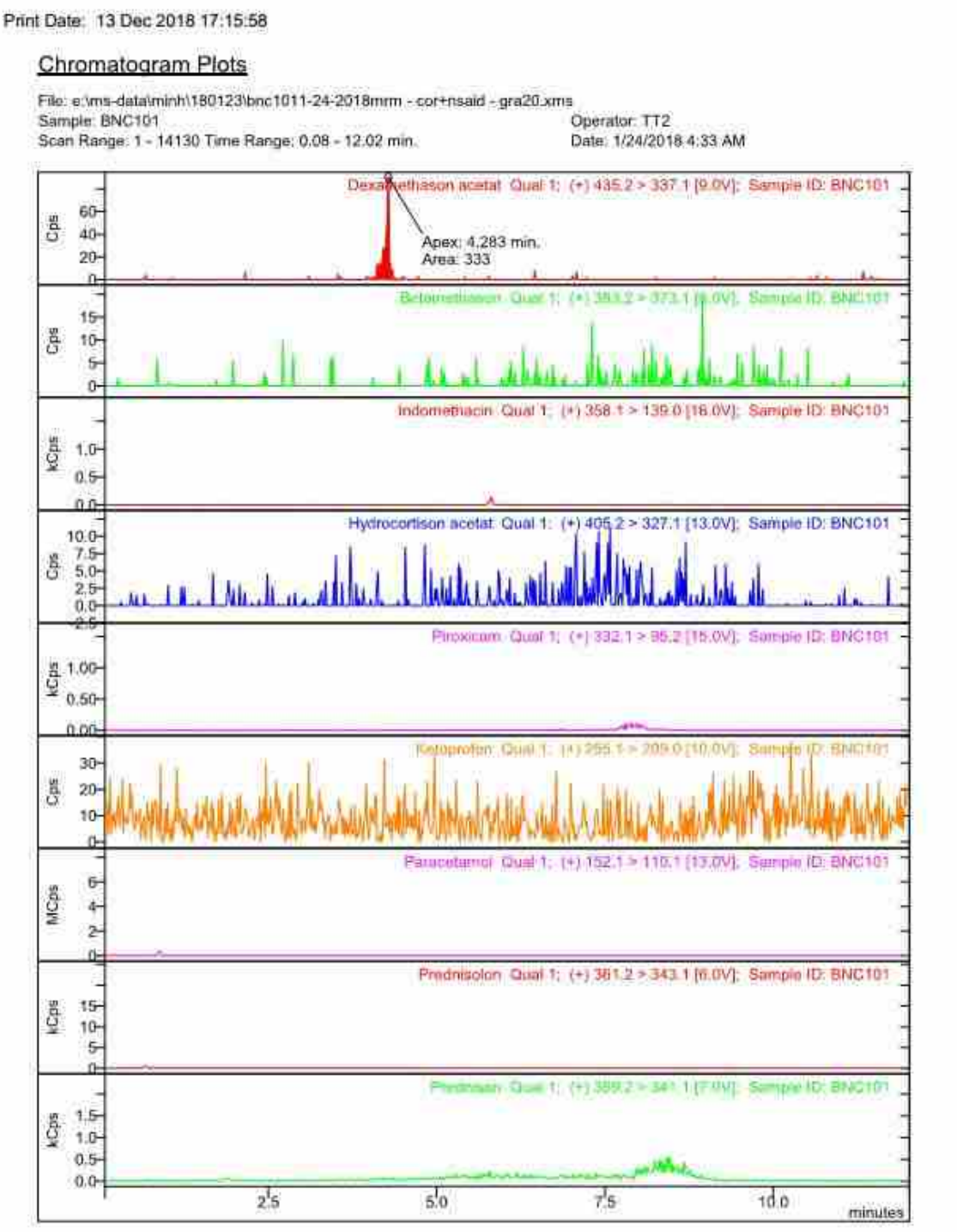
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	1.601e+6	Pass
Height		427711	
Amount (Conc.)	>= 0	1600589 Counts	Pass



Hình PL2.5.2. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu HCH092

2.6. Mẫu BNC101



Hình PL2.6.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính BNC101

Sample ID:	BNC101	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/24/2018 4:33 AM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	12/13/2018 8:55 PM	Method:	...or+nsaid - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

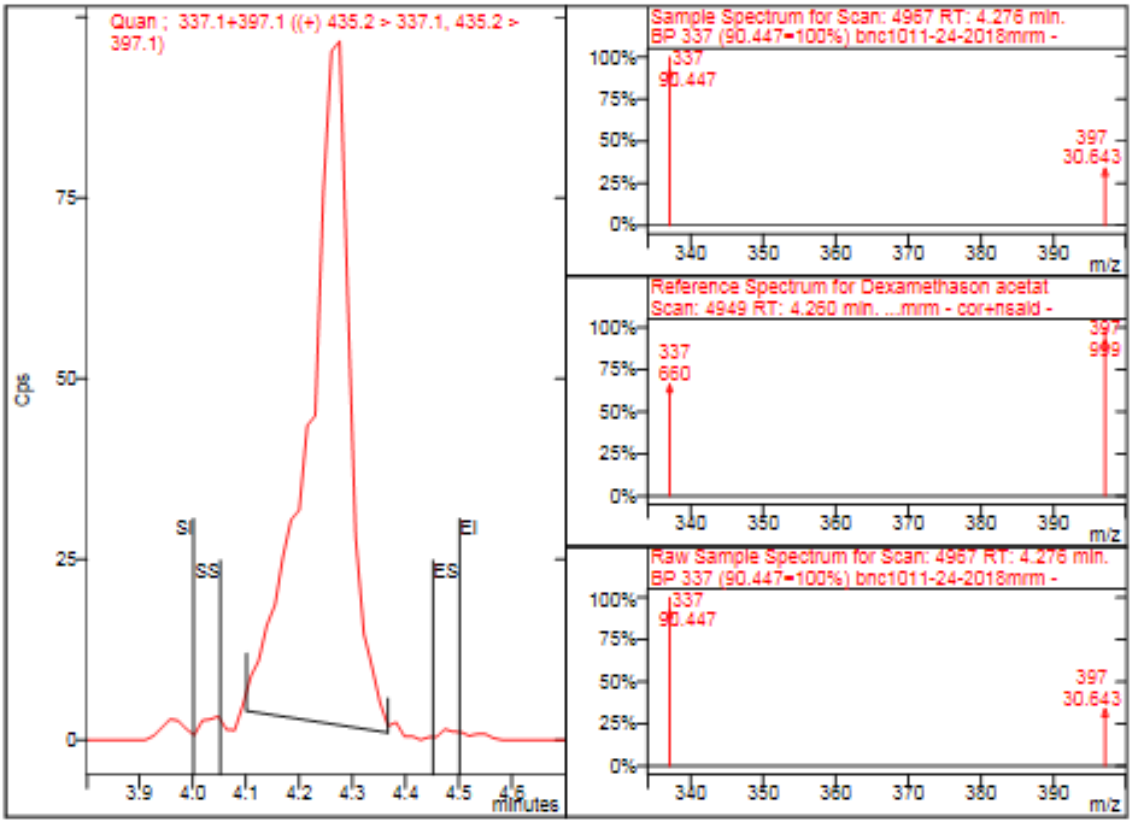
Peak Name: Dexamethason acetat
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	4.252 +/- 0.200	4.269 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 337.1:54.7%	34.7% - 74.7%	59.8%	Pass
	m/z 397.1:45.9%	25.9% - 65.9%	46.3%	Pass

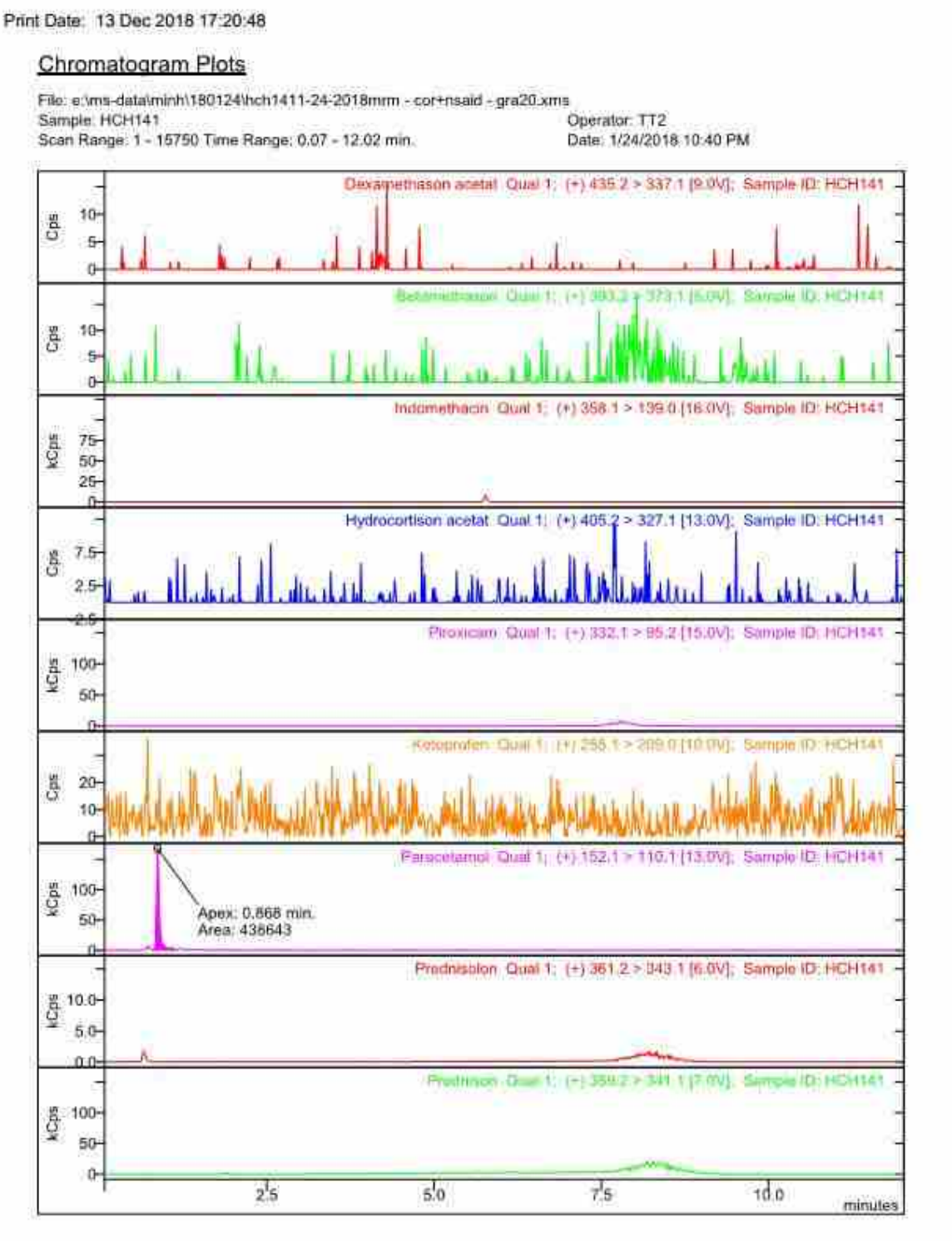
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	337.1+397.1		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	512	Pass
Height		94	
Amount (Conc.)	>= 0	512 Counts	Pass



Hình PL2.6.2. Kết quả định danh dexamethasone acetat trong mẫu BNC101

2.7. Mẫu VNN141



Hình PL2.7.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNN141

Sample ID:	HCH141	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/24/2018 10:40 PM	Data File:	...or+nsald - gra20.xms
Calculation Date:	12/13/2018 8:02 PM	Method:	...or+nsald - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

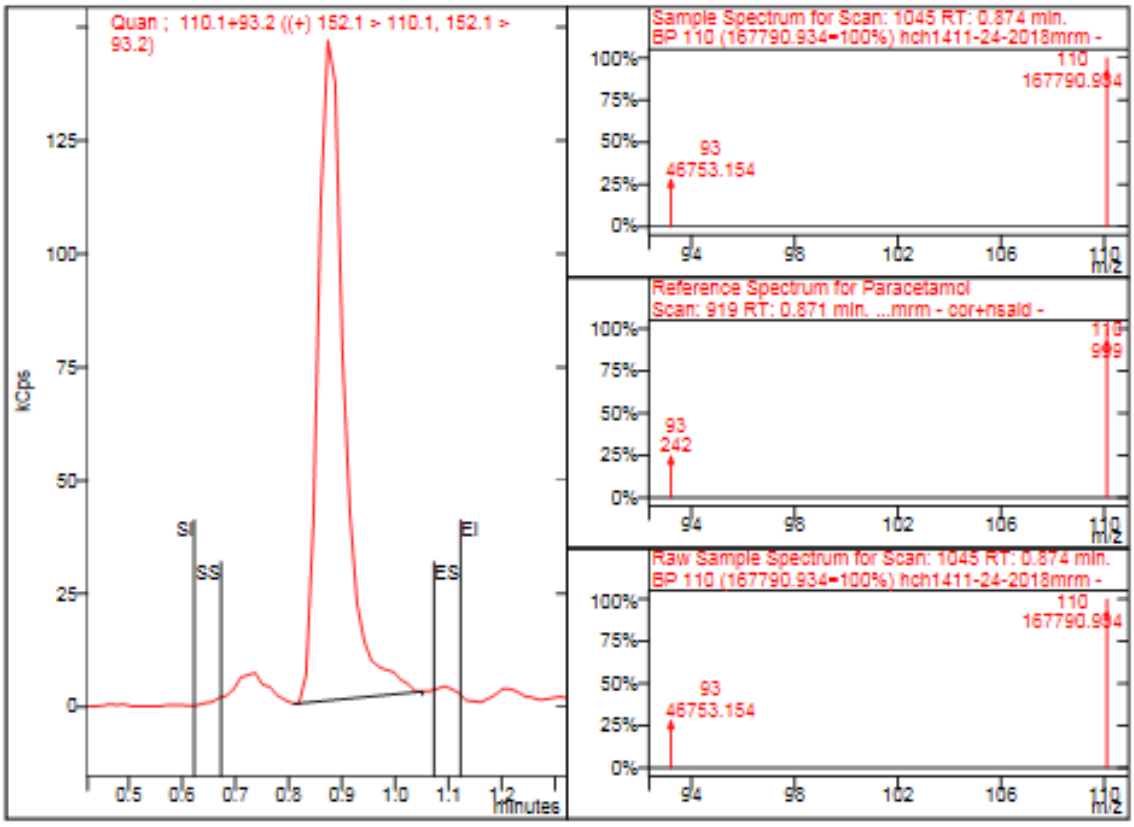
Peak Name: Paracetamol
Result Index: 7 Compound Number: 7 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	0.873 +/- 0.200	0.878 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 110.1:80.5%	60.5% - 100.5%	79.7%	Pass
	m/z 93.2:19.5%	0.1% - 39.5%	20.7%	Pass

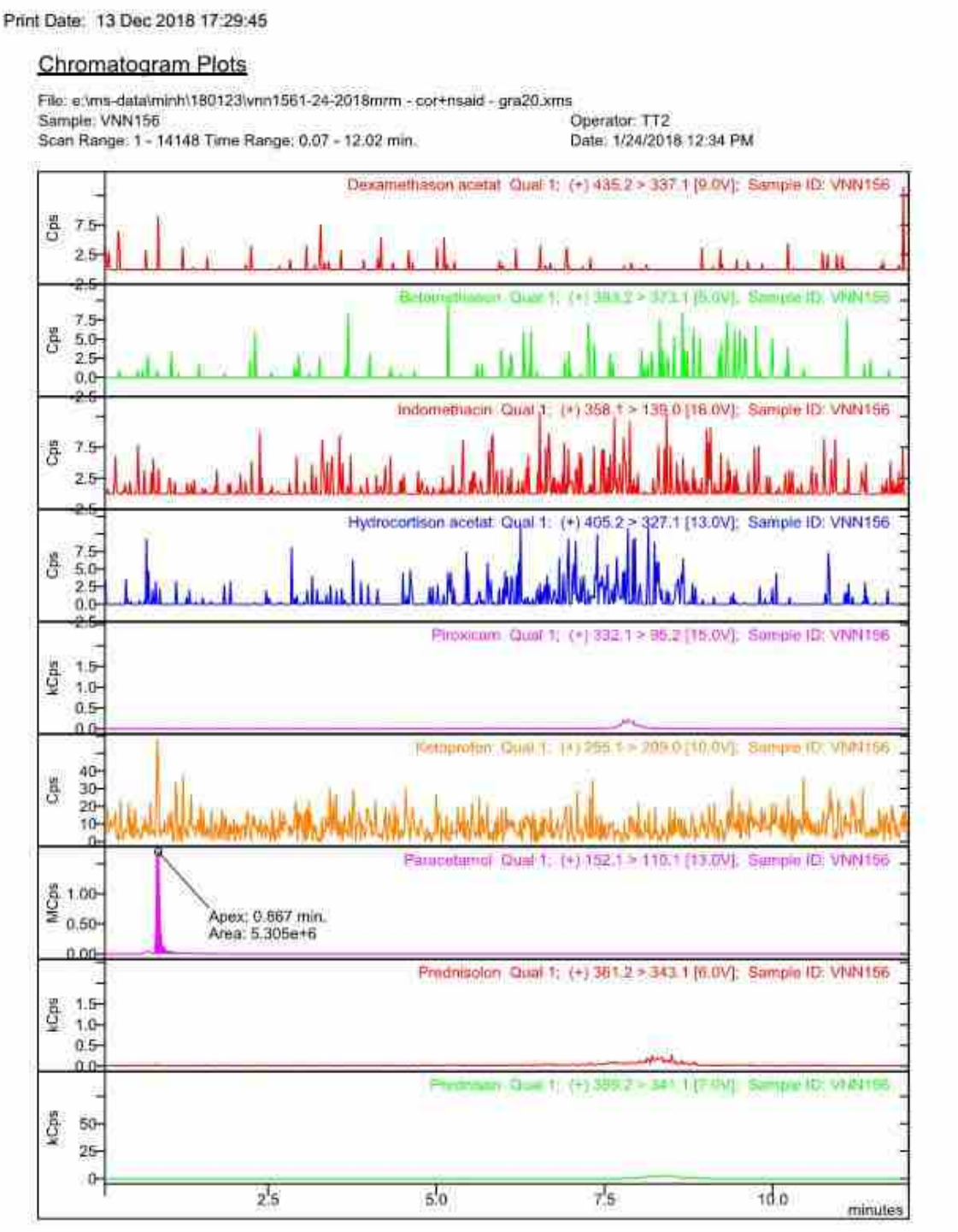
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	506074	Pass
Height		145606	
Amount (Conc.)	>= 0	506074 Counts	Pass



Hình PL2.7.2. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu VNN141

2.8. Mẫu VNN156



Hình PL2.8.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNN156

Sample ID:	VNN156	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 10:23 AM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 3:29 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name:	Paracetamol		
Result Index:	7	Compound Number: 7	CAS Number: None

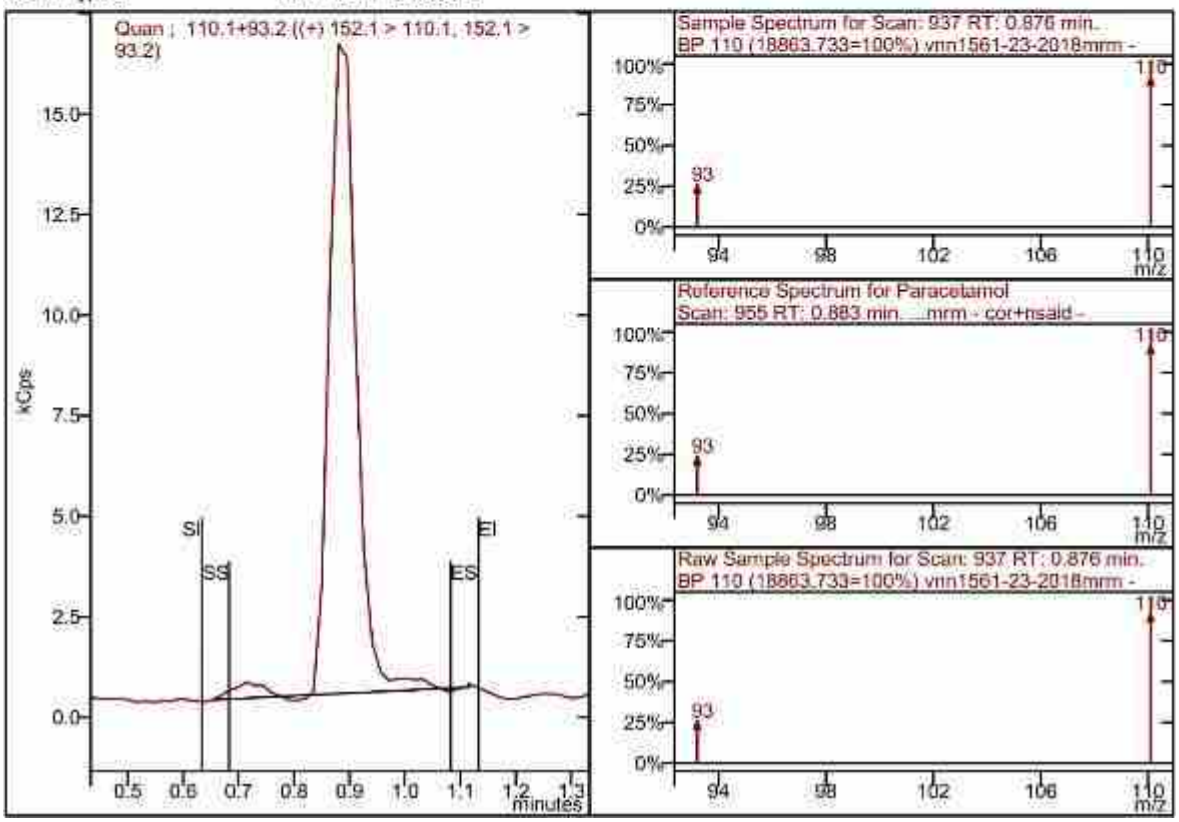
Identification: Identified

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	0.883 +/- 0.200	0.876 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 110.1:80.4%	60.4% - 100.4%	80.6%	Pass
	m/z 93.2:19.6%	0.1% - 39.7%	18.9%	Pass

Integration and Quantitation

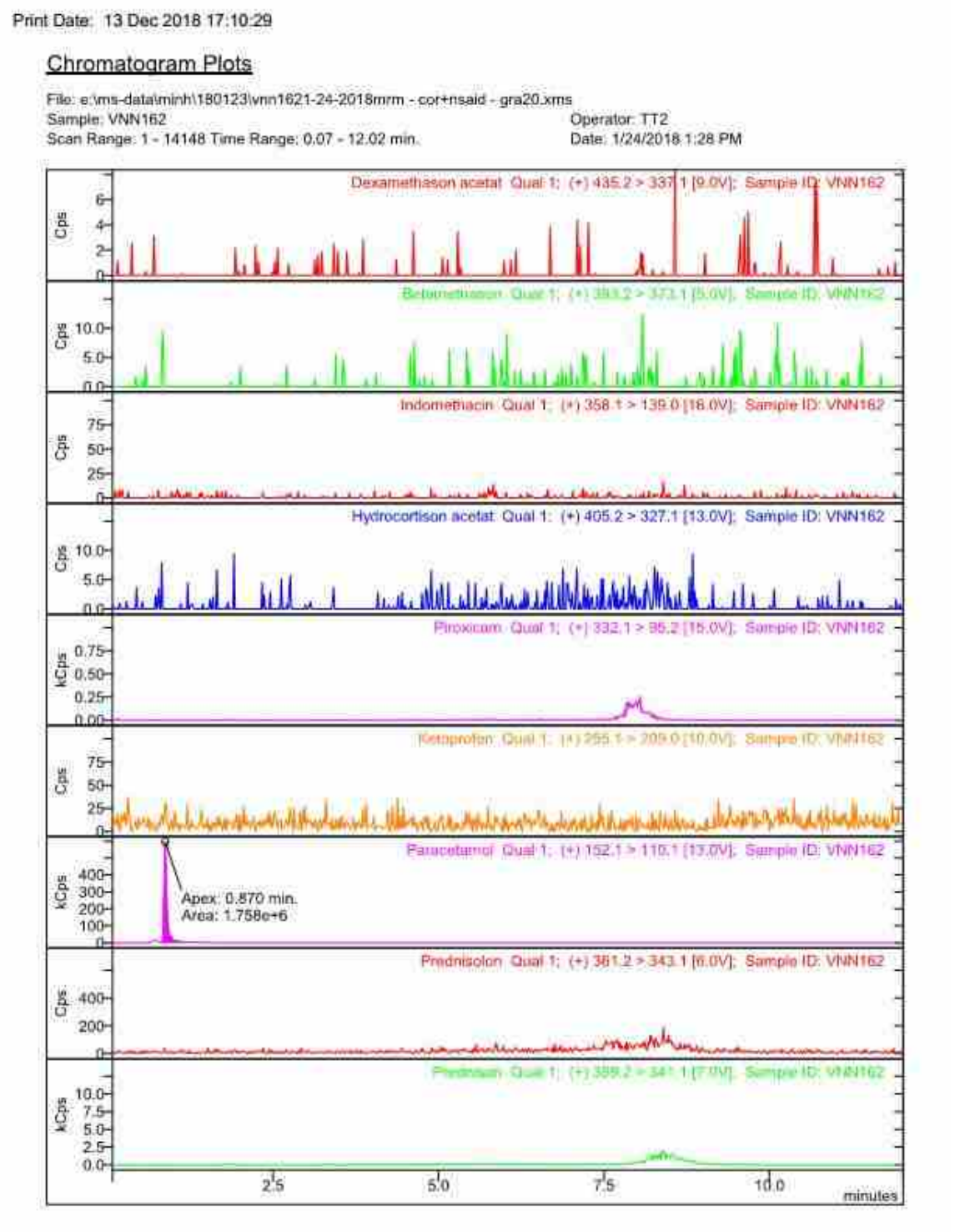
Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	59918	Pass
Height		17096	
Amount (Conc.)	>= 0	59918 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.8.2. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu VNN156

2.9. Mẫu VNN162



Hình PL2.9.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNN162

Sample ID:	VNN162	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/24/2018 1:28 PM	Data File:	...or+nsald - gra20.xms
Calculation Date:	12/13/2018 8:01 PM	Method:	...or+nsald - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

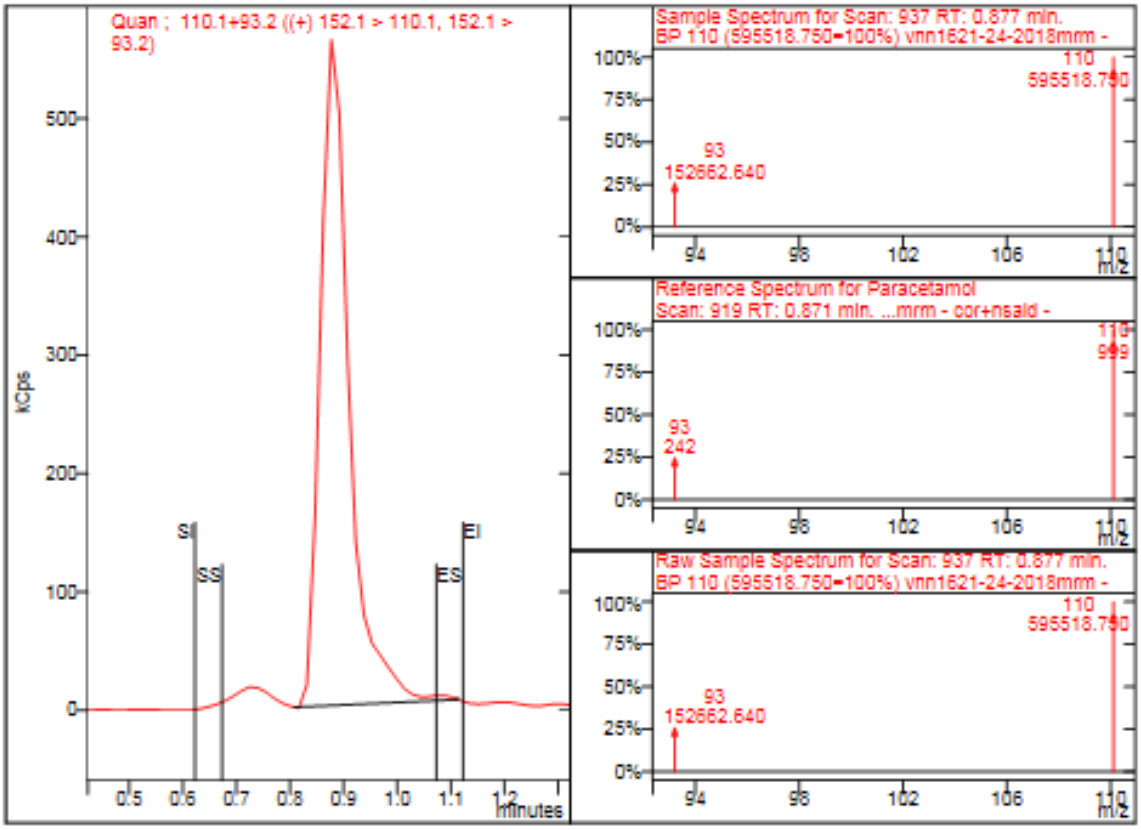
Peak Name:	Paracetamol		
Result Index:	7	Compound Number: 7	CAS Number: None

Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Highest		
Retention Time	0.873 +/- 0.200	0.880 min.	Pass
Match Result		N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 110.1:80.5%	60.5% - 100.5% 79.7%	Pass
	m/z 93.2:19.5%	0.1% - 39.5% 21.3%	Pass

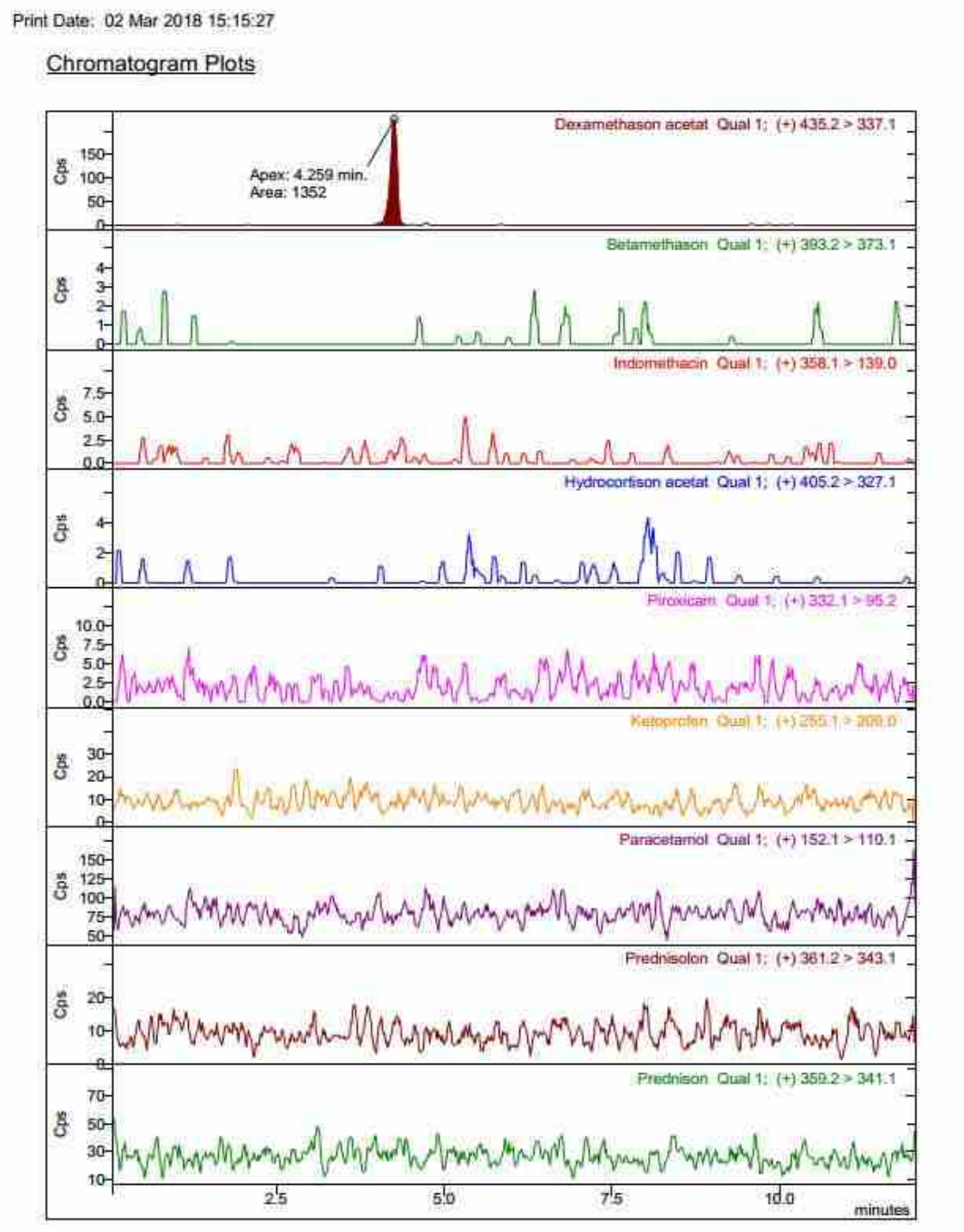
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	2.117e+6	Pass
Height		562660	
Amount (Conc.)	>= 0	2116528 Counts	Pass



Hình PL2.9.2. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu VNN162

2.10. Mẫu HCH175



Hình PL2.10.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính HCH175

Sample ID:	HCH175	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 2:56 PM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 3:37 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name: Dexamethason acetat
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

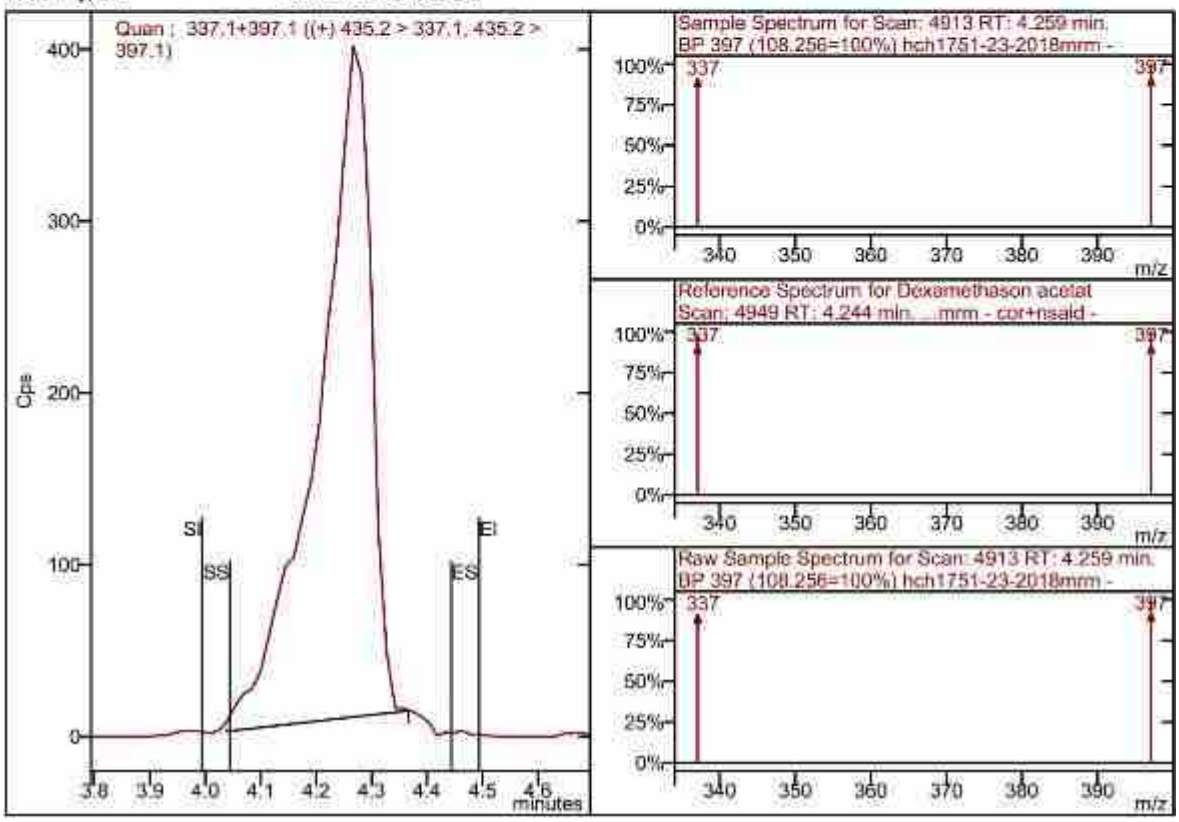
Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	4.244 +/- 0.200	4.259 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 337.1:52.8%	32.8% - 72.8%	49.1%	Pass
	m/z 397.1:47.2%	27.2% - 67.2%	50.9%	Pass

Integration and Quantitation

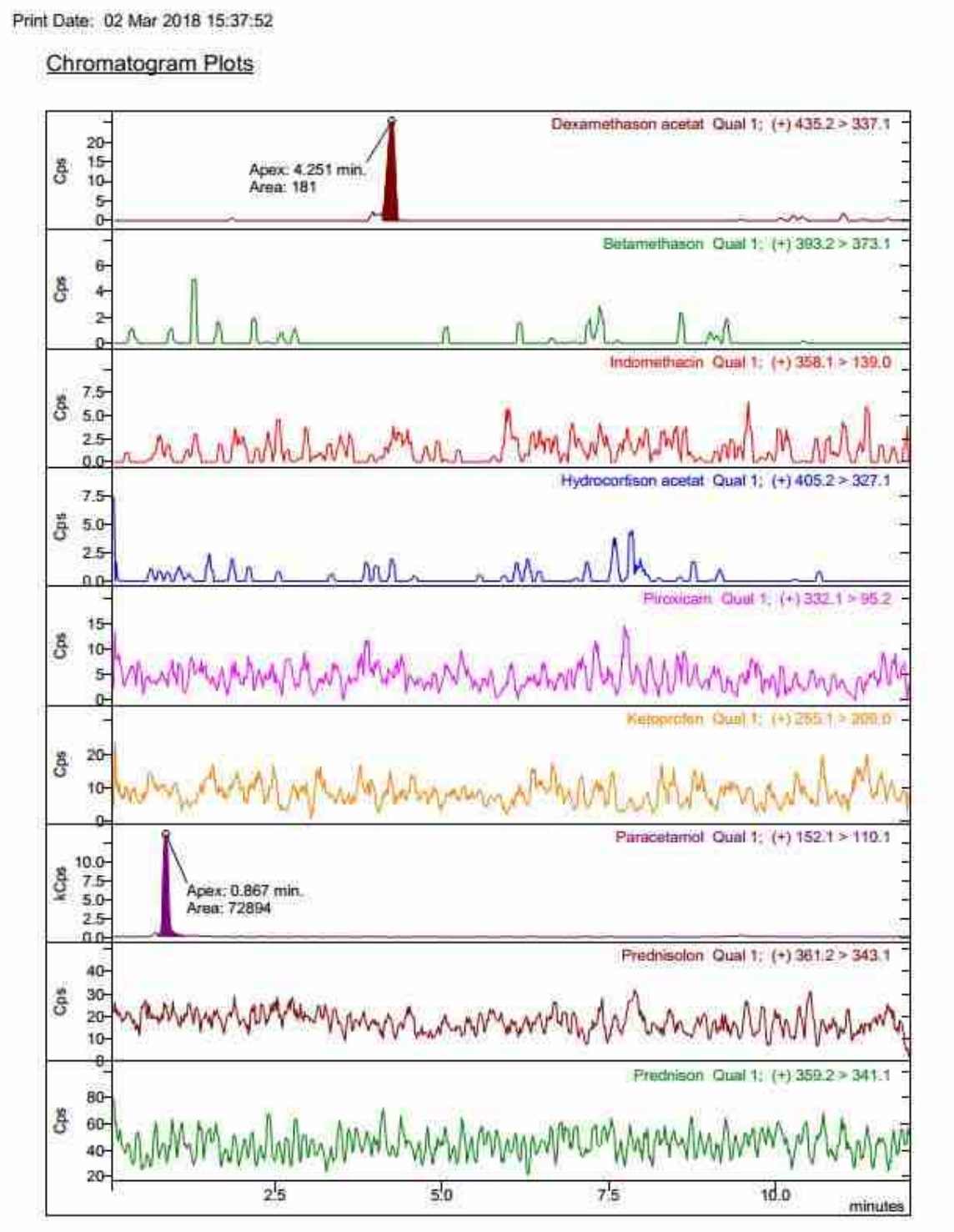
Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	337.1+397.1		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	2754	Pass
Height		415	
Amount (Conc.)	>= 0	2754 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.10.2. Kết quả định danh dexamethason acetat trong mẫu HCH175

2.11. Mẫu HCH176



Hình PL2.11.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính HCH176

Sample ID:	HCH176	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 9:02 AM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 3:46 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name: Dexamethason acetat
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

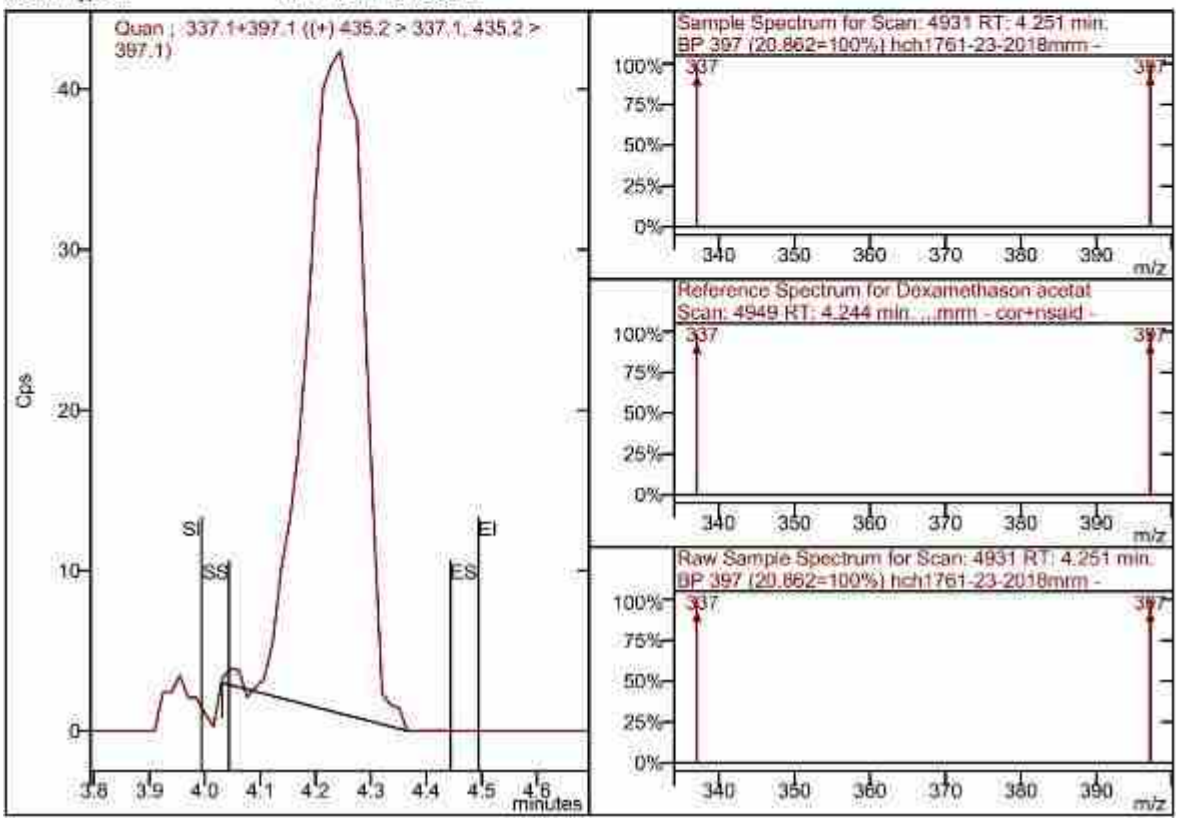
Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	4.244 +/- 0.200	4.251 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 337.1:52.8%	32.8% - 72.8%	51.8%	Pass
	m/z 397.1:47.2%	27.2% - 67.2%	48.2%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	337.1+397.1		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	319	Pass
Height		45	
Amount (Conc.)	>= 0	319 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.11.2 Kết quả định danh dexamethason acetat trong mẫu HCH176

Sample ID:	HCH176	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	External Standard
Acquisition Date:	23/01/18 9:02 AM	Data File:	...or+nsaid - gra20.xms
Calculation Date:	15/03/18 3:46 PM	Method:	...ra20 - xl - 2201.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

Peak Name: Paracetamol
Result Index: 7 Compound Number: 7 CAS Number: None Identified

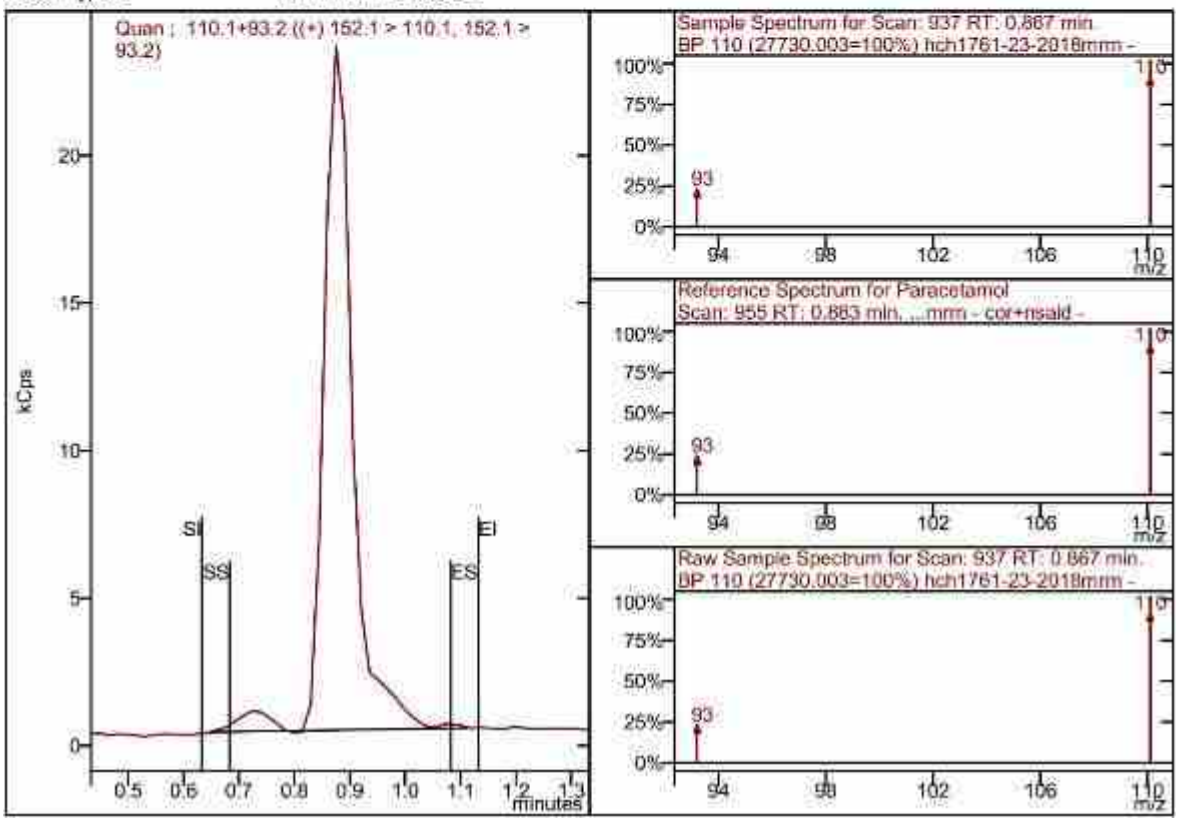
Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Spectrum			
Retention Time	0.883 +/- 0.200	0.867 min.		Pass
Match Result	N-R >= 700	999		Pass
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 110.1:80.4%	60.4% - 100.4%	80.2%	Pass
	m/z 93.2:19.6%	0.1% - 39.7%	19.8%	Pass

Integration and Quantitation

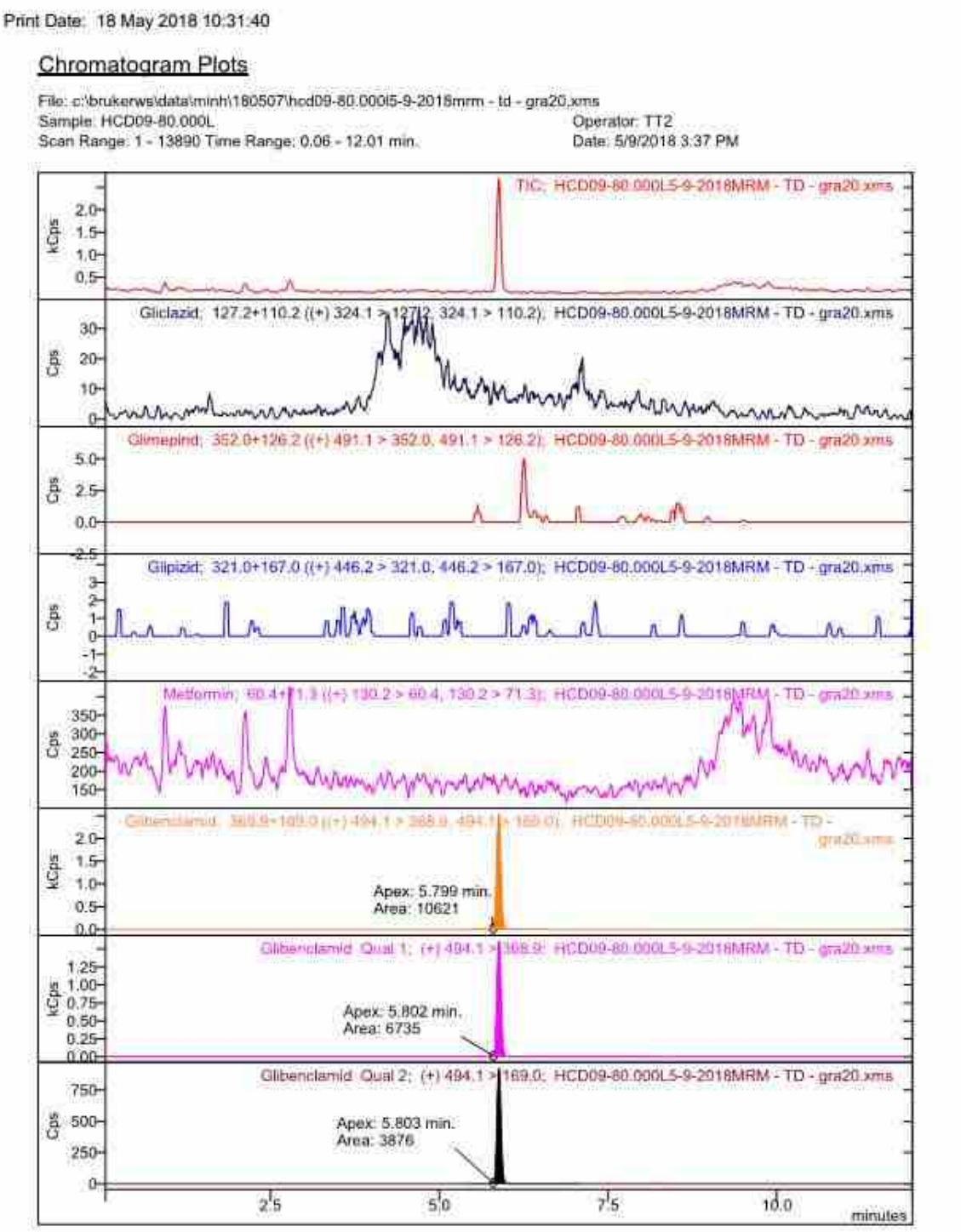
Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	110.1+93.2		
Calibration Equation	Average		
Area	>=100	90890	Pass
Height		24640	
Amount (Conc.)	>= 0	90890 Counts	Pass

Match Types: N-R : Normal-Reverse



Hình PL2.11.3. Kết quả định danh paracetamol trong mẫu HCH176

2.12. Mẫu HCD09



Hình PL2.12 Sắc ký đồ mẫu dương tính HCD09

Sample ID:	HCD09 2000 L1	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 12:24 AM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:45 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

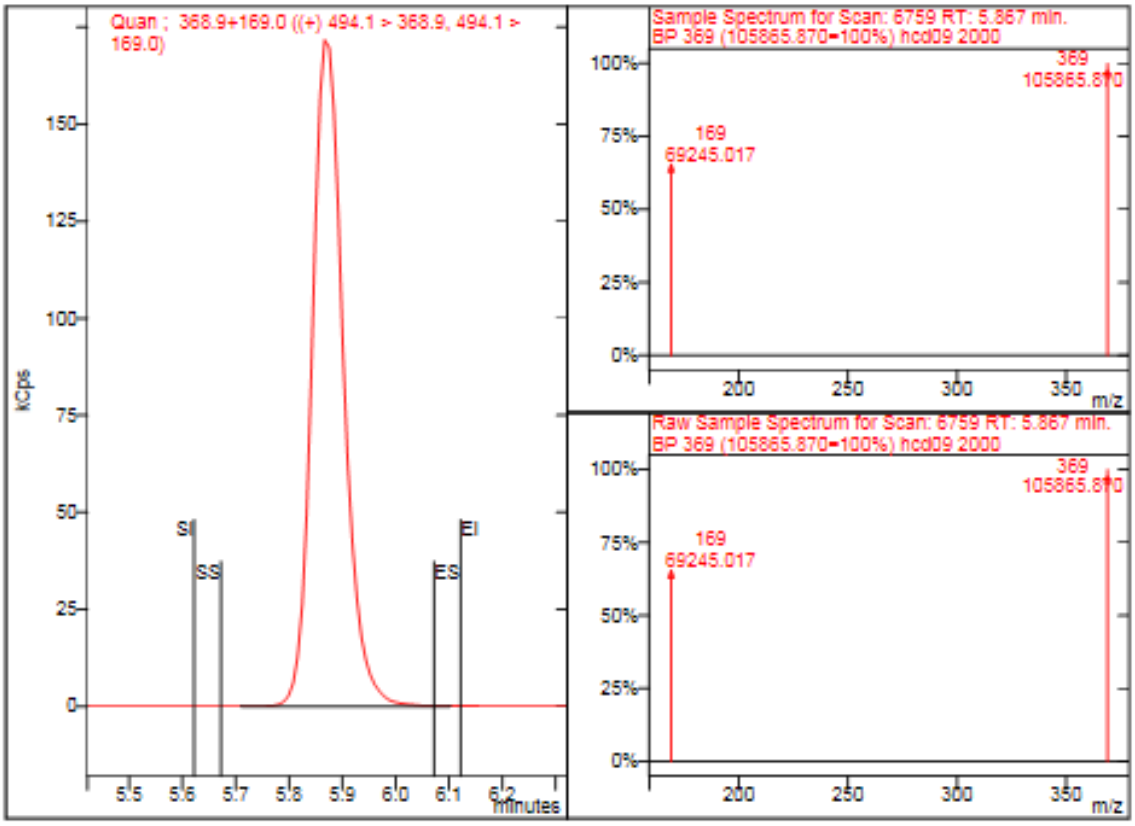
Peak Name: Glibenclamid
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.872 +/- 0.200	5.870 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:61.0%	41.0% - 81.0%	61.0%	Pass
	m/z 169.0:39.0%	19.0% - 59.0%	39.0%	Pass

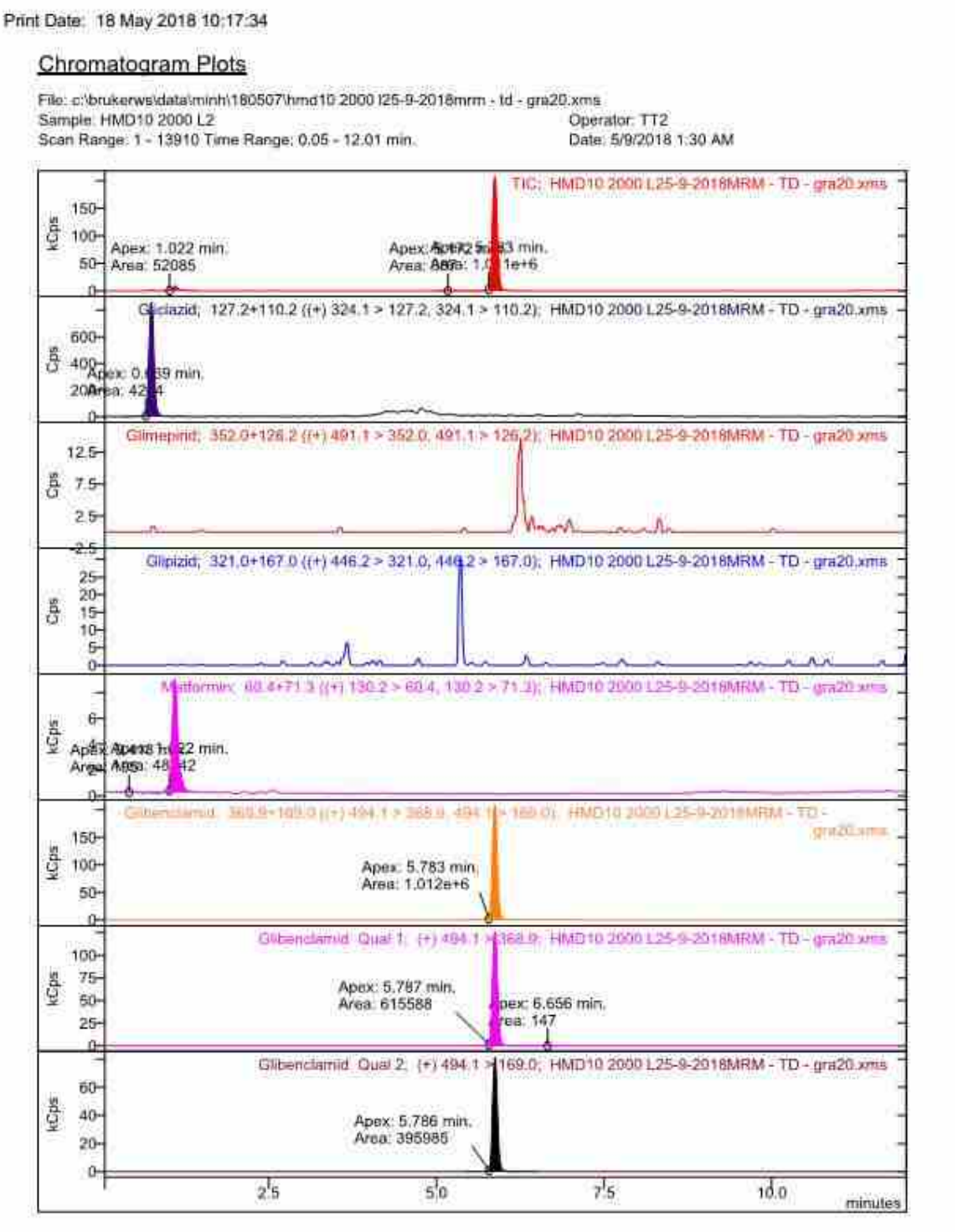
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	700768	Pass
Height		171745	
Amount (Conc.)	>= 0	700768 Counts	Pass



Hình PL2.12.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu HCD09

2.13. Mẫu HMD10



Hình PL2.13.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính HMD10

Sample ID:	HCD10-120.000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 4:30 PM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:47 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

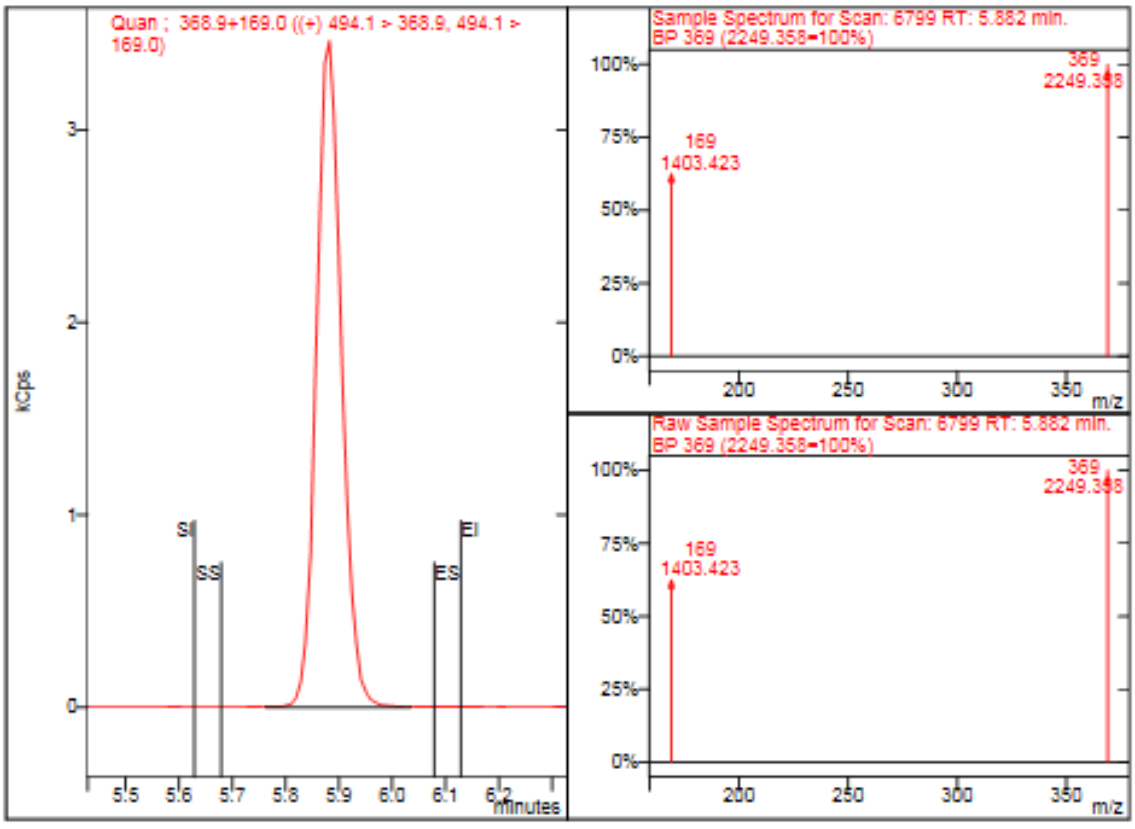
Peak Name:	Glibenclamid			
Result Index:	1	Compound Number: 1	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.879 +/- 0.200	5.880 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:63.8%	43.8% - 83.8%	63.8%	Pass
	m/z 169.0:36.3%	16.3% - 56.3%	36.3%	Pass

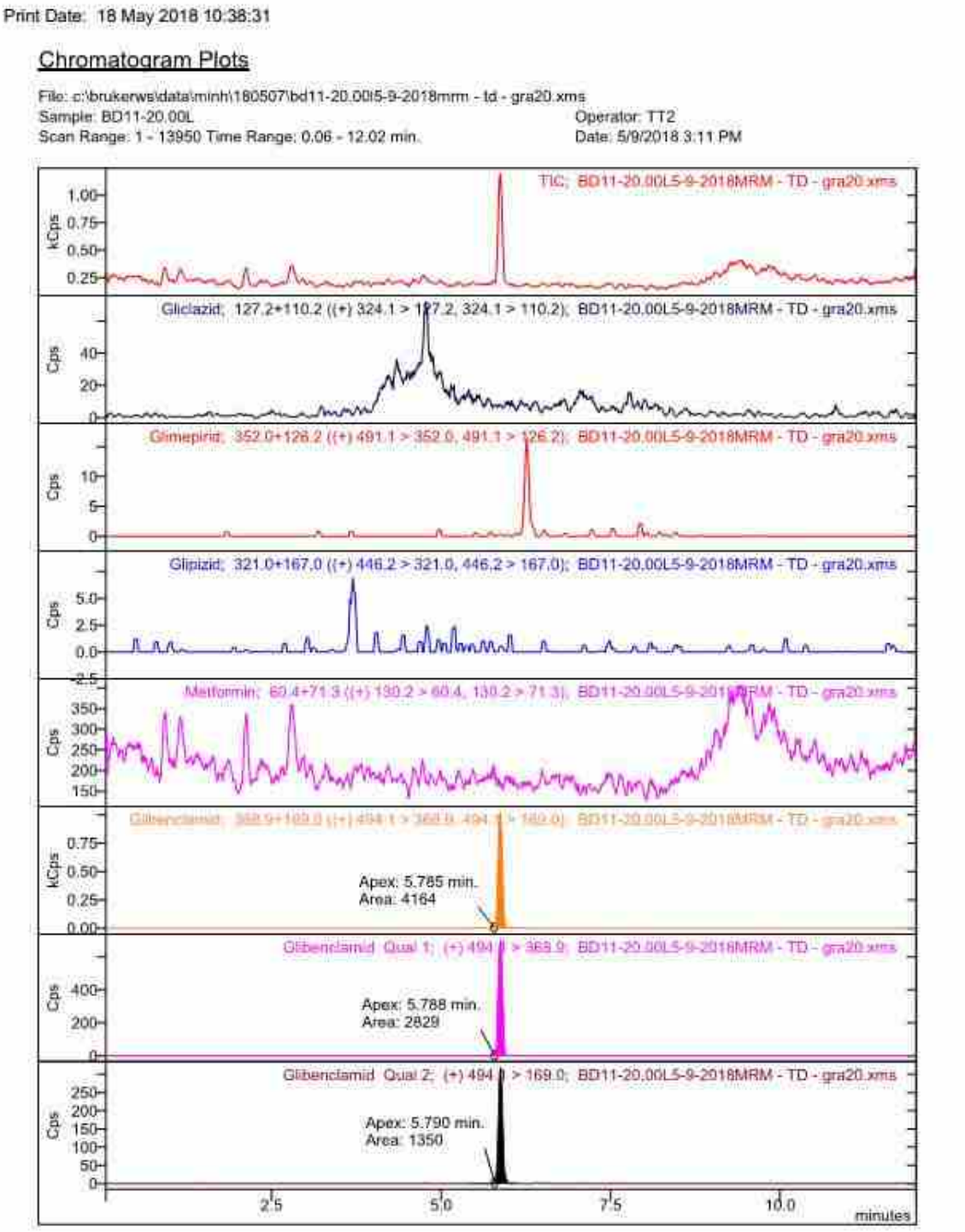
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	11333	Pass
Height		3464	
Amount (Conc.)	>= 0	11333 Counts	Pass



Hình PL2.13.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu HMD10

2.14. Mẫu BD11



Hình PL2.14.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính BD11

Sample ID:	BD11 2000 L1	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 2:10 AM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:41 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

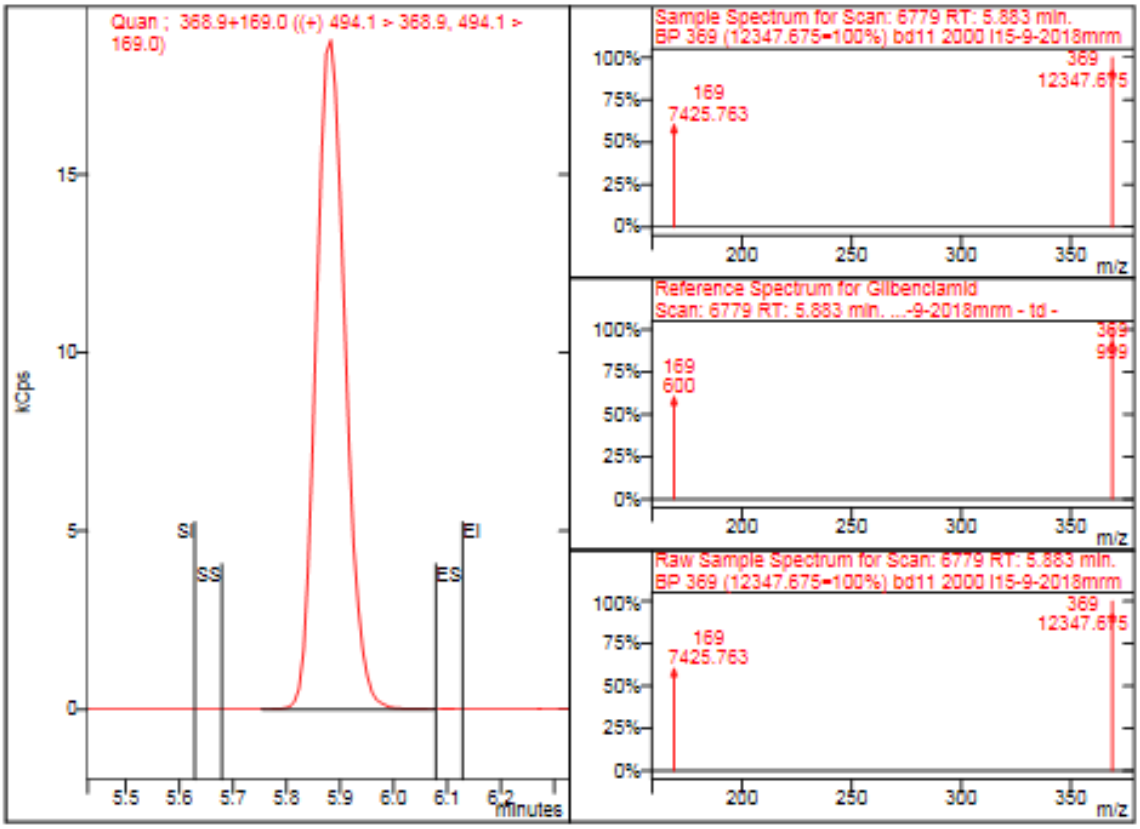
Peak Name:	Glibenclamid			
Result Index:	1	Compound Number: 1	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.879 +/- 0.200	5.880 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:62.4%	42.4% - 82.4%	62.4%	Pass
	m/z 169.0:37.6%	17.6% - 57.6%	37.6%	Pass

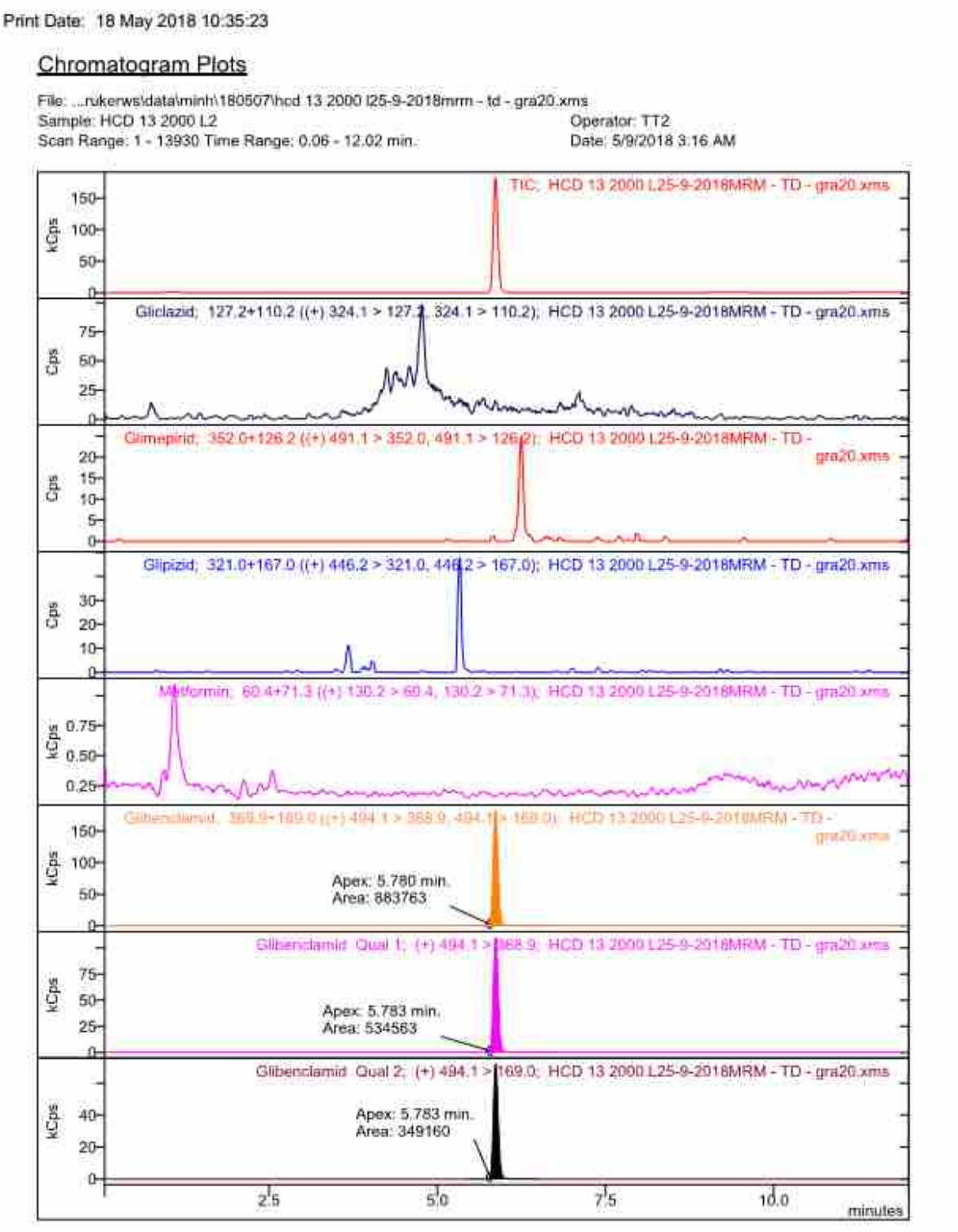
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	71499	Pass
Height		18778	
Amount (Conc.)	>= 0	71499 Counts	Pass



Hình PL2.14.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu BD11

2.15. Mẫu HCD13



Hình PL2.15.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính HCD13

Sample ID:	HCD 13 2000 L1	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 3:03 AM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:48 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

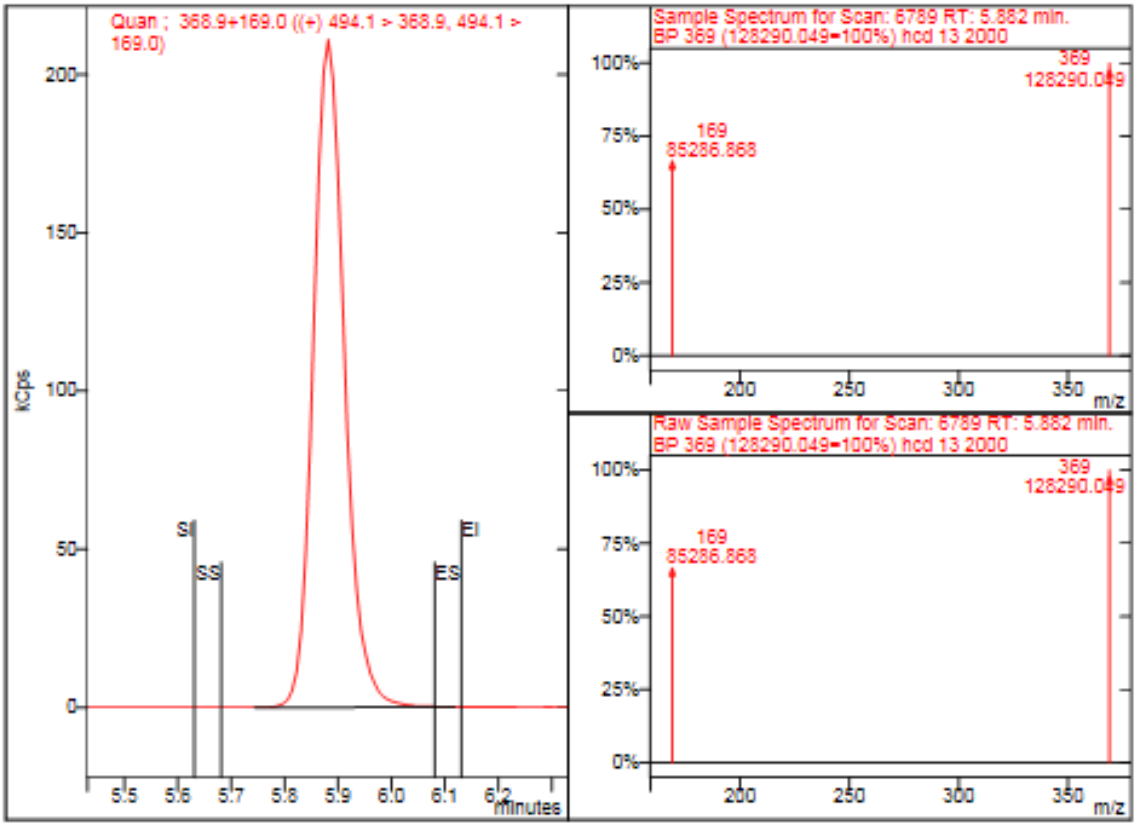
Peak Name: Glibenclamid
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.881 +/- 0.200	5.881 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:61.2%	41.2% - 81.2%	61.2%	Pass
	m/z 169.0:38.8%	18.8% - 58.8%	38.8%	Pass

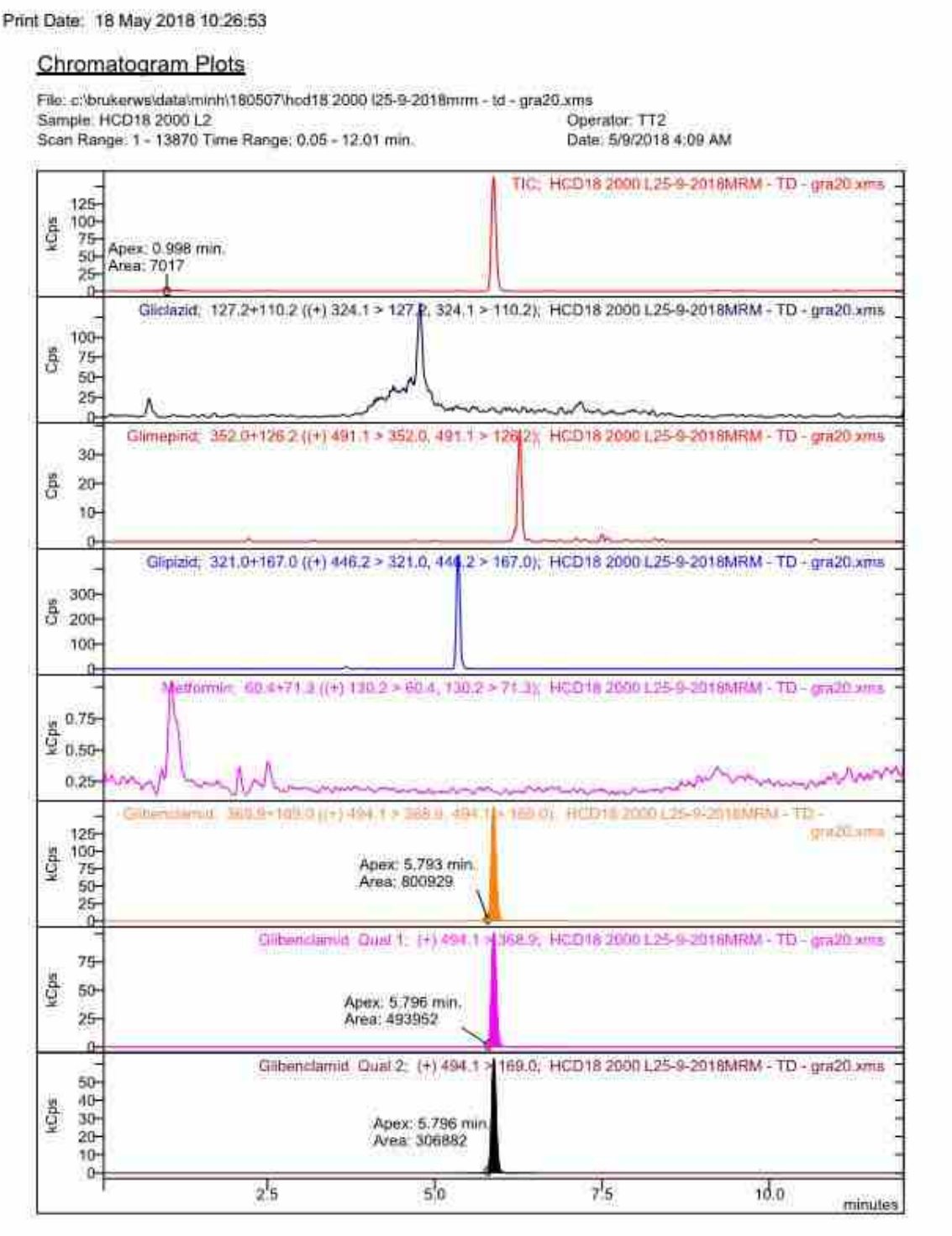
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	855483	Pass
Height		211065	
Amount (Conc.)	>= 0	855483 Counts	Pass



Hình PL2.15.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu HCD13

2.16. Mẫu HCD18



Hình PL2.16.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính HCD18

Sample ID:	HCD18 2000 L1	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 3:56 AM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:50 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

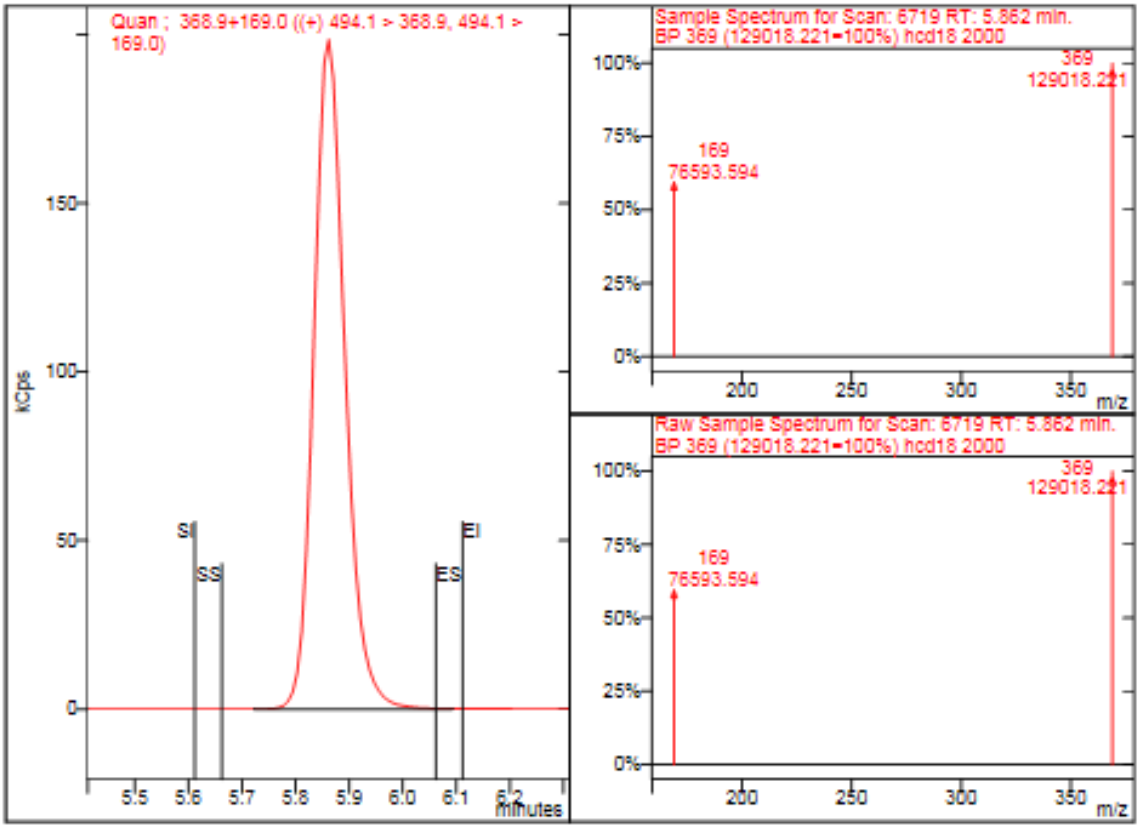
Peak Name: Glibenclamid
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.862 +/- 0.200	5.861 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:61.6%	41.6% - 81.6%	61.5%	Pass
	m/z 169.0:38.6%	18.6% - 58.6%	38.5%	Pass

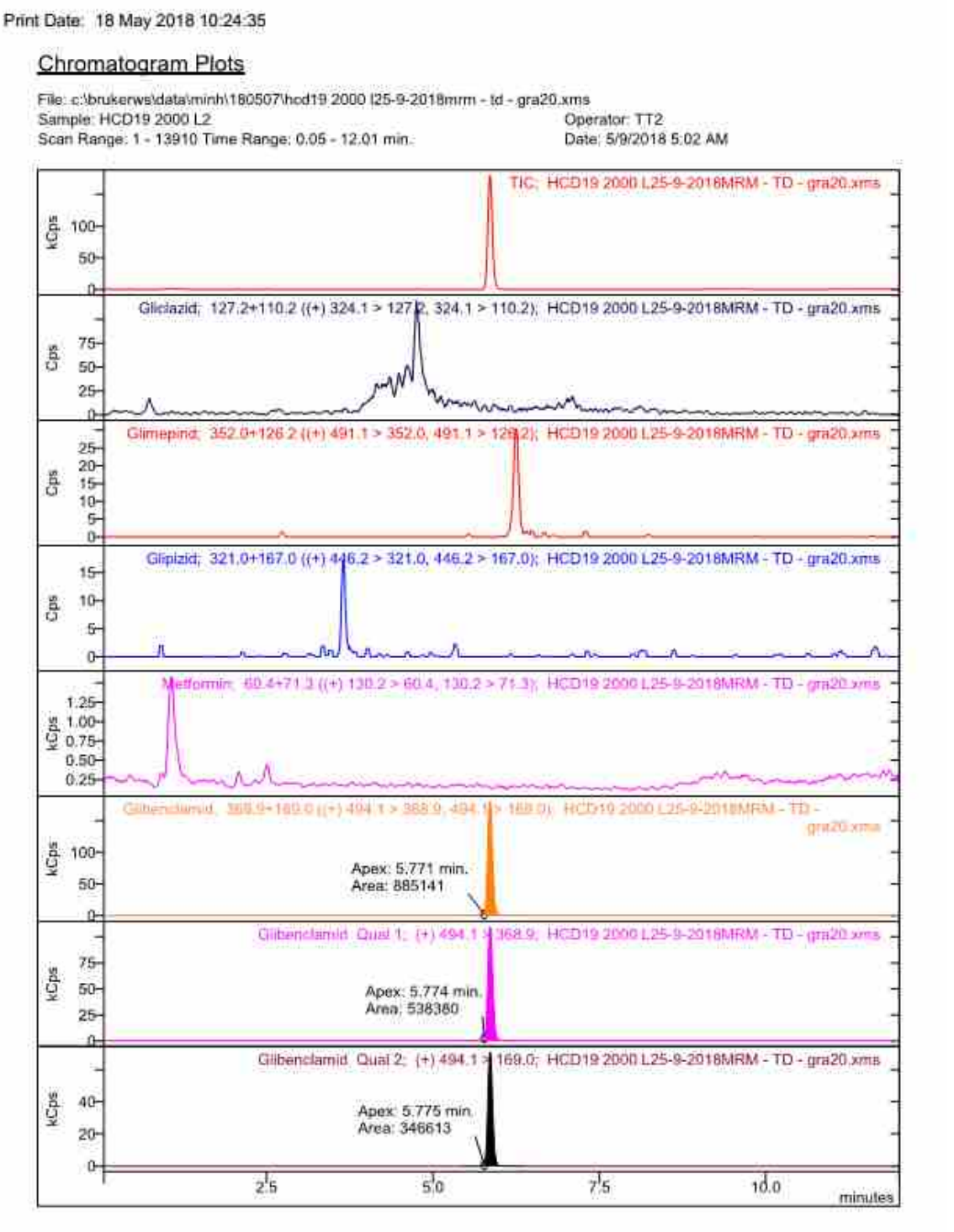
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	805945	Pass
Height		198586	
Amount (Conc.)	>= 0	805945 Counts	Pass



Hình PL2.16.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu HCD18

2.17. Mẫu HCD19



Hình PL2.17.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính HCD19

Sample ID:	HCD19 2000 L1	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 4:49 AM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:51 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

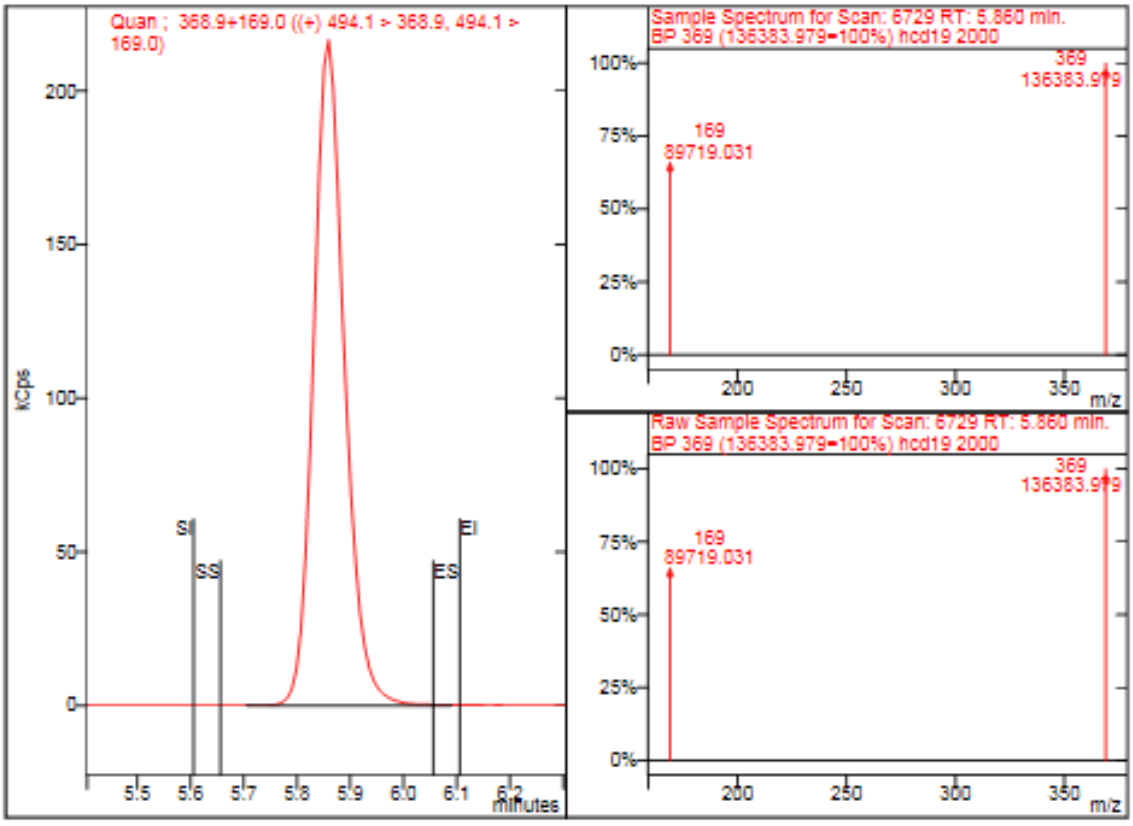
Peak Name: Glibenclamid
Result Index: 1 Compound Number: 1 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.856 +/- 0.200	5.858 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:60.9%	40.9% - 80.9%	60.8%	Pass
	m/z 169.0:39.2%	19.2% - 59.2%	39.1%	Pass

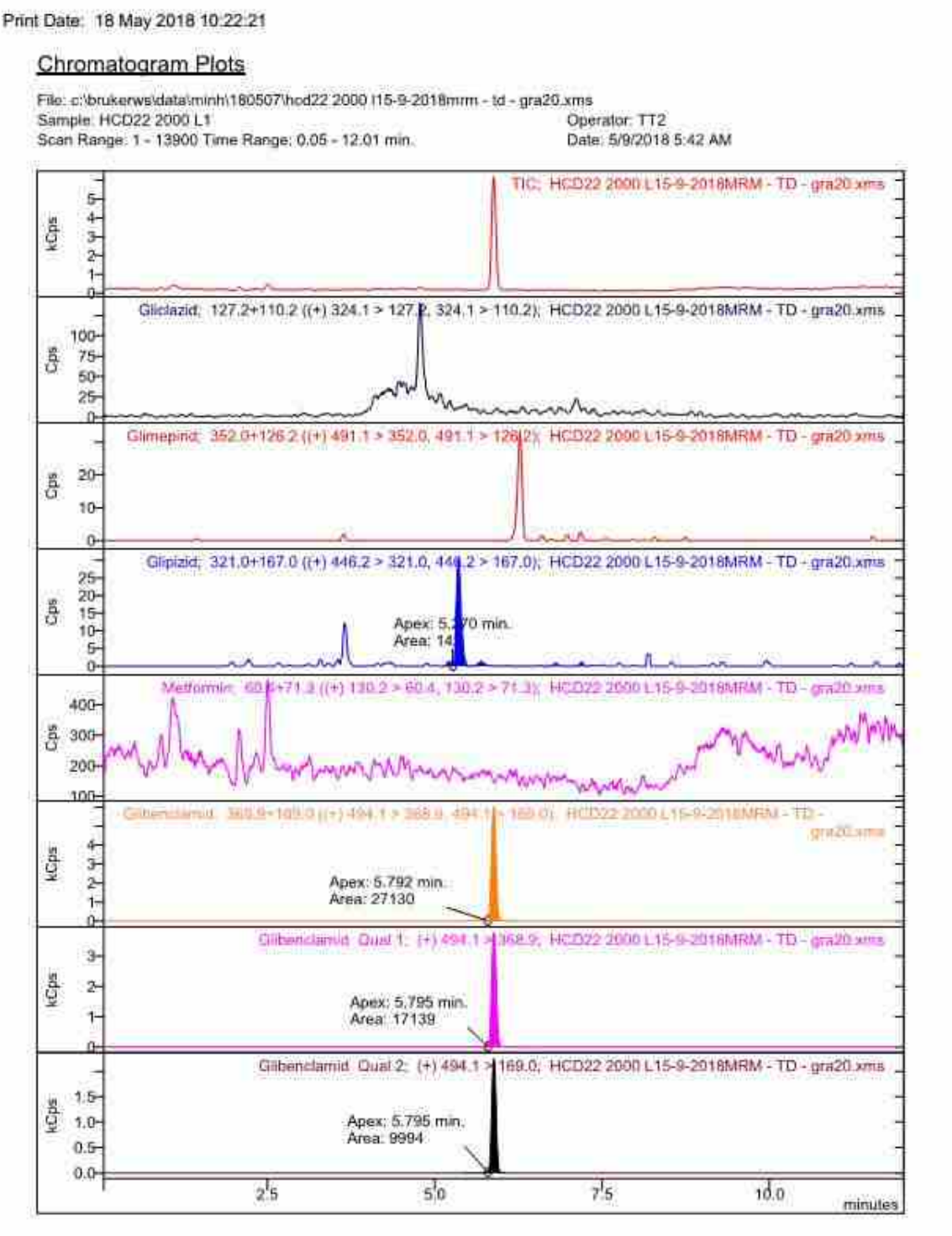
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	876649	Pass
Height		216728	
Amount (Conc.)	>= 0	876649 Counts	Pass



Hình PL2.17.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu HCD19

2.18. Mẫu HCD22



Hình PL2.18.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính HCD22

Sample ID:	HCD22 2000 L2	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	5/9/2018 5:55 AM	Data File:	...mrm - td - gra20.xms
Calculation Date:	9/29/2018 3:53 PM	Method:	...mrm - td - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

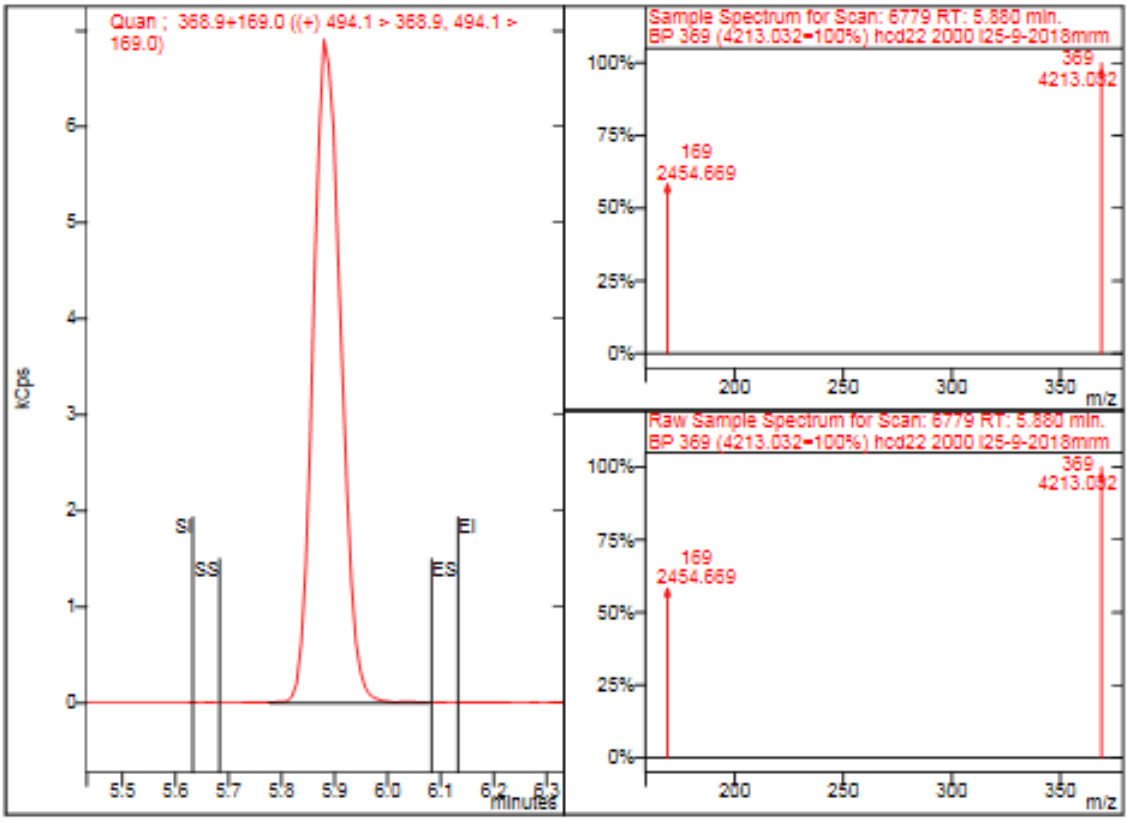
Peak Name:	Glibenclamid			
Result Index:	1	Compound Number: 1	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	5.883 +/- 0.200	5.882 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 368.9:62.9%	42.9% - 82.9%	62.9%	Pass
	m/z 169.0:37.1%	17.1% - 57.1%	37.1%	Pass

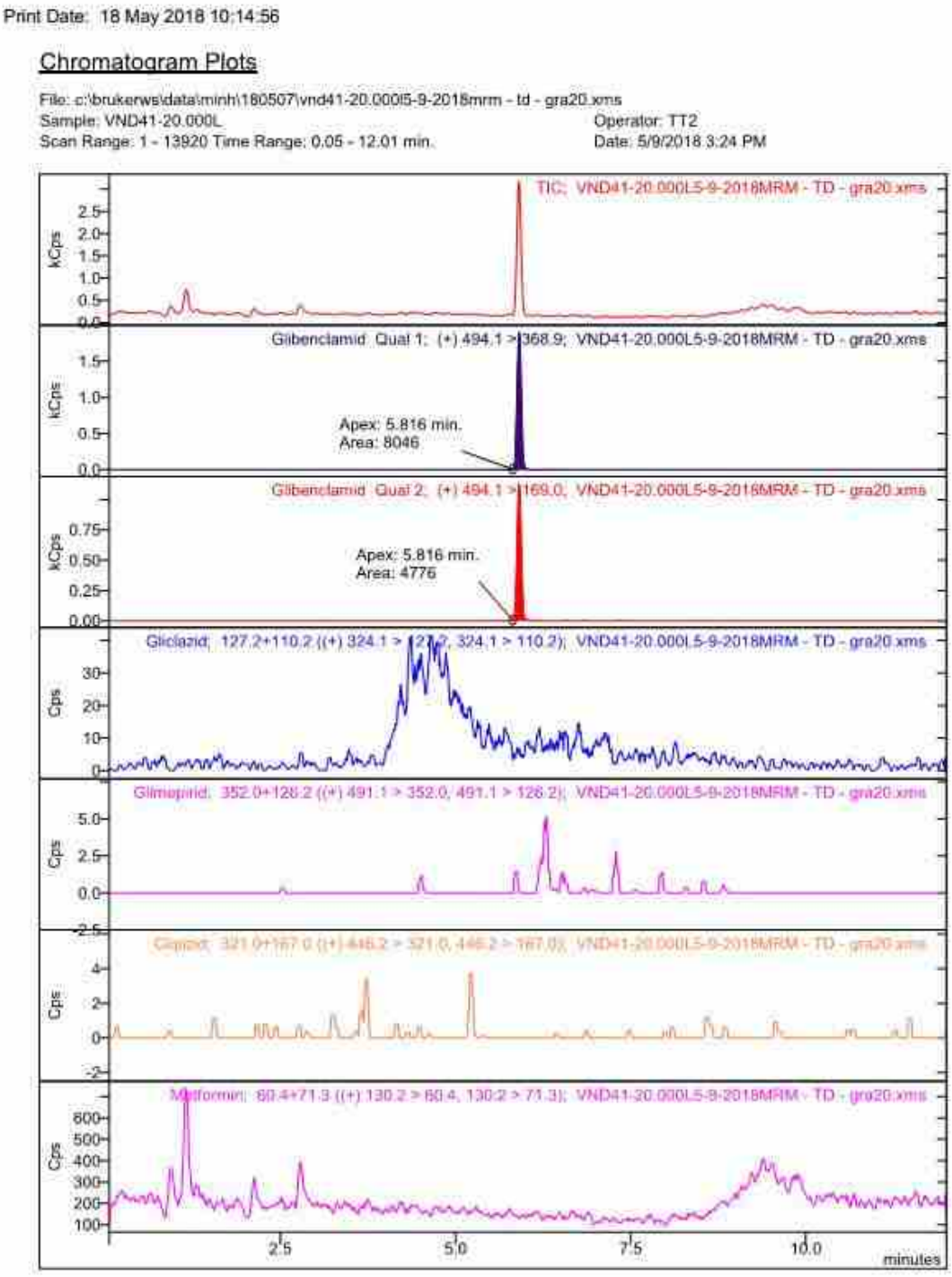
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	368.9+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	24975	Pass
Height		6908	
Amount (Conc.)	>= 0	24975 Counts	Pass



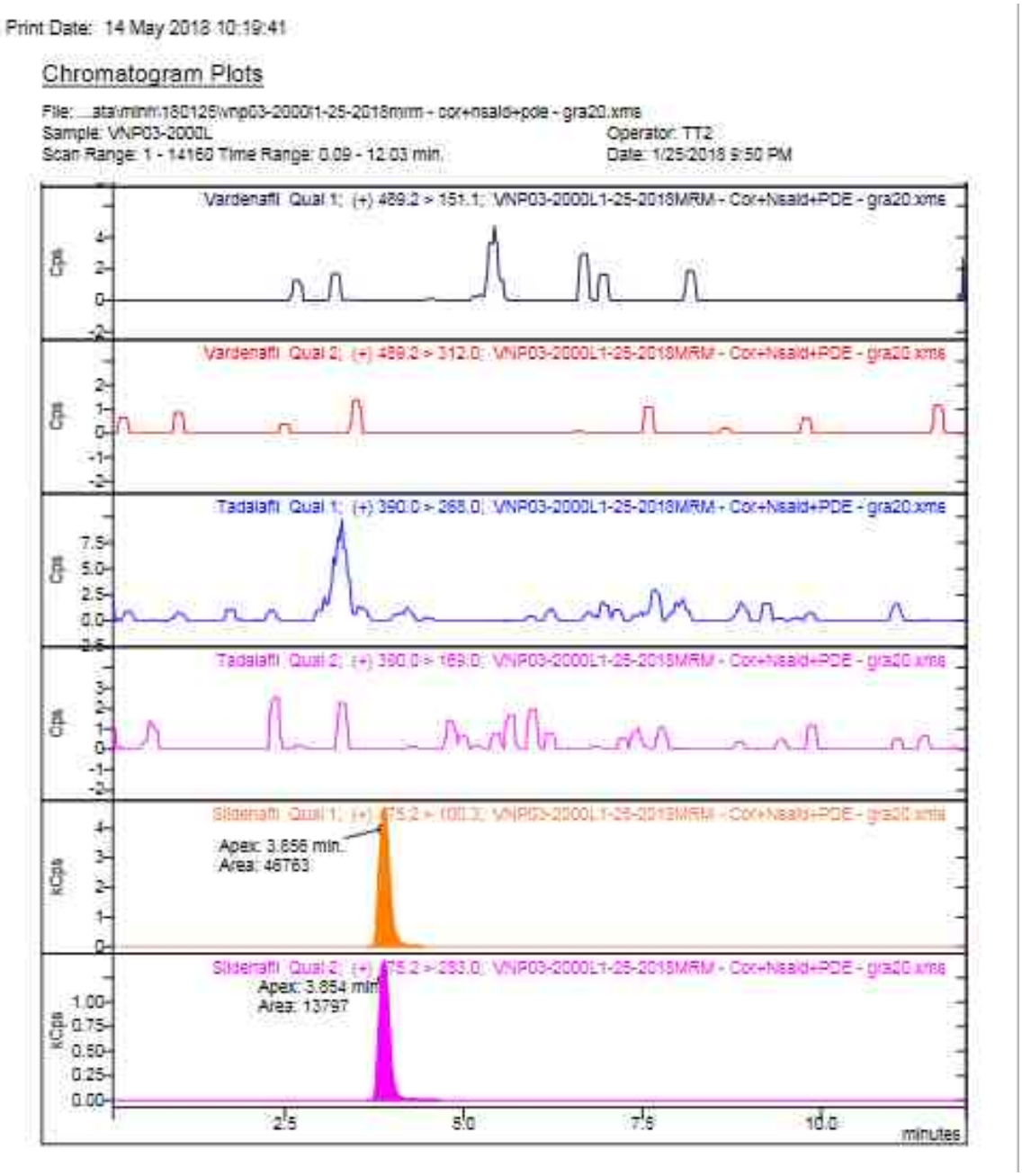
Hình PL2.18.2. Kết quả định danh glibenclamid trong mẫu HCD22

2.19. Mẫu VND41



Hình PL2.19.1 Sắc ký đồ mẫu dương tính VND41

2.20. Mẫu VNP03



Hình PL2.20.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNP03

Sample ID:	VNP03-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/25/2018 9:50 PM	Data File:	...sald+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:29 PM	Method:	...sald+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

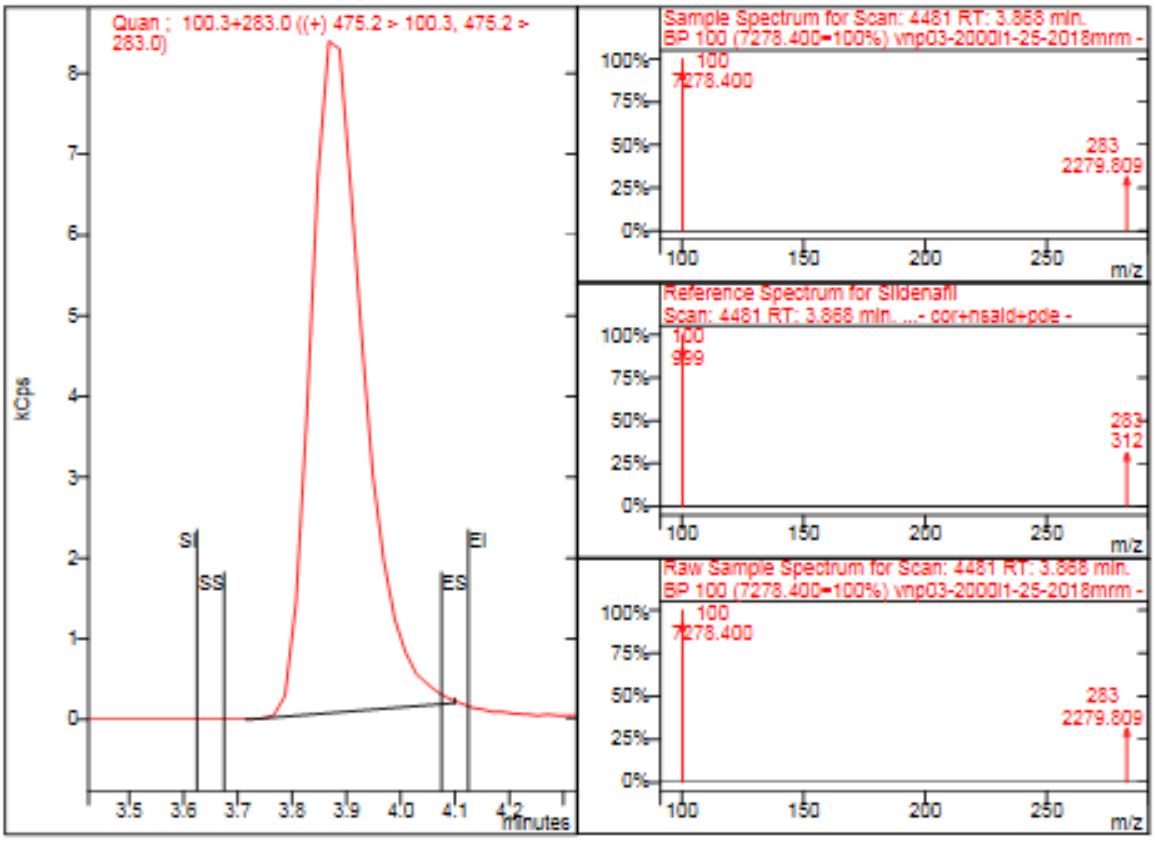
Peak Name:	Sildenafil				
Result Index:	12	Compound Number: 12		CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification		Actual	Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.875 +/- 0.200		3.877 min.	Pass
Match Result			N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 100.3:76.8%	56.8% - 96.8%	76.8%	Pass
	m/z 283.0:22.9%	2.9% - 42.9%	22.9%	Pass

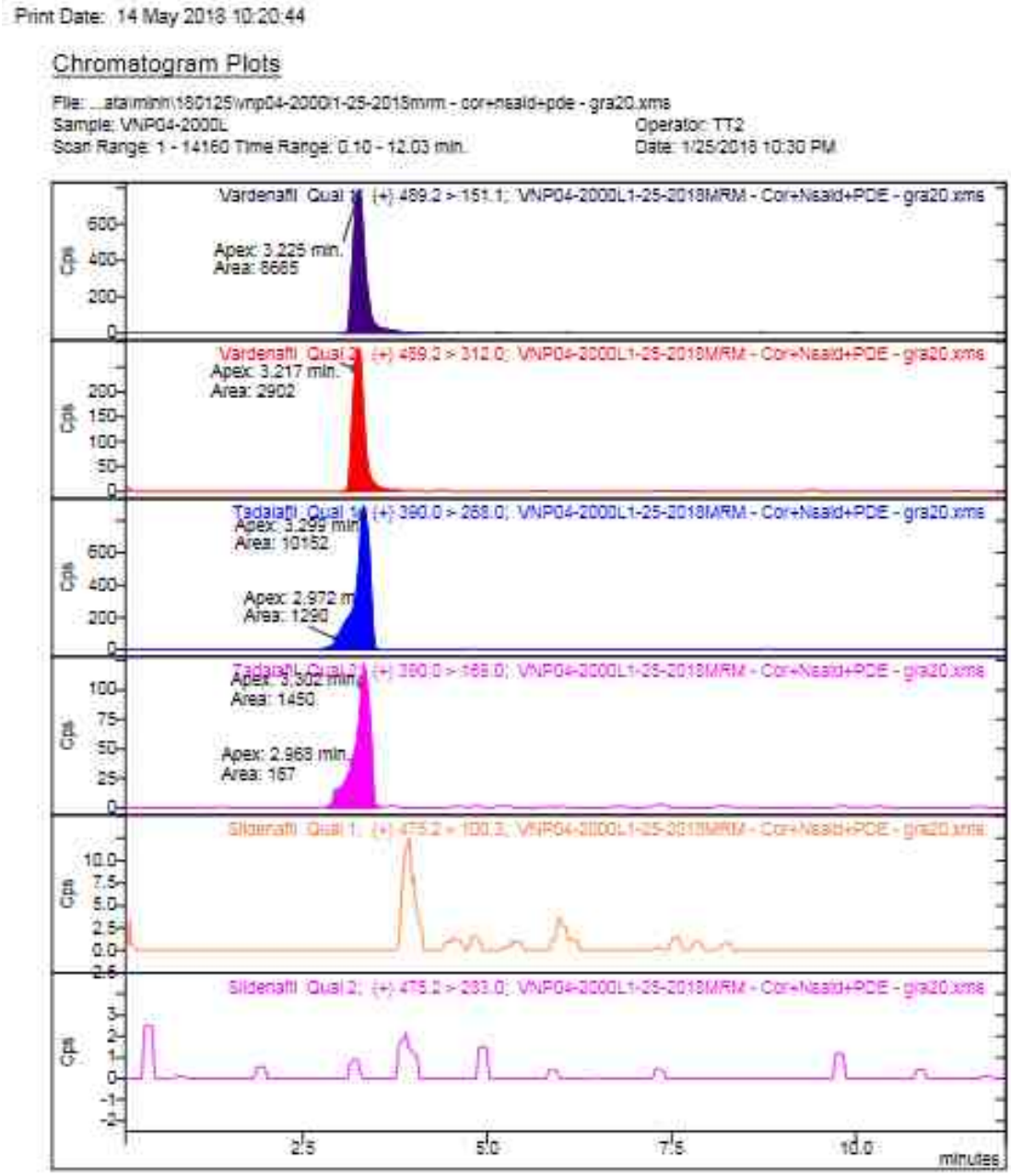
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	100.3+283.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	56988	Pass
Height		8313	
Amount (Conc.)	>= 0	56988 Counts	Pass



Hình PL2.20.2. Kết quả định danh Sildenafil trong mẫu VNP03

2.21. Mẫu VNP04



Hình PL2.21.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNP04

Sample ID:	VNP04-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/25/2018 10:30 PM	Data File:	...said+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:31 PM	Method:	...said+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

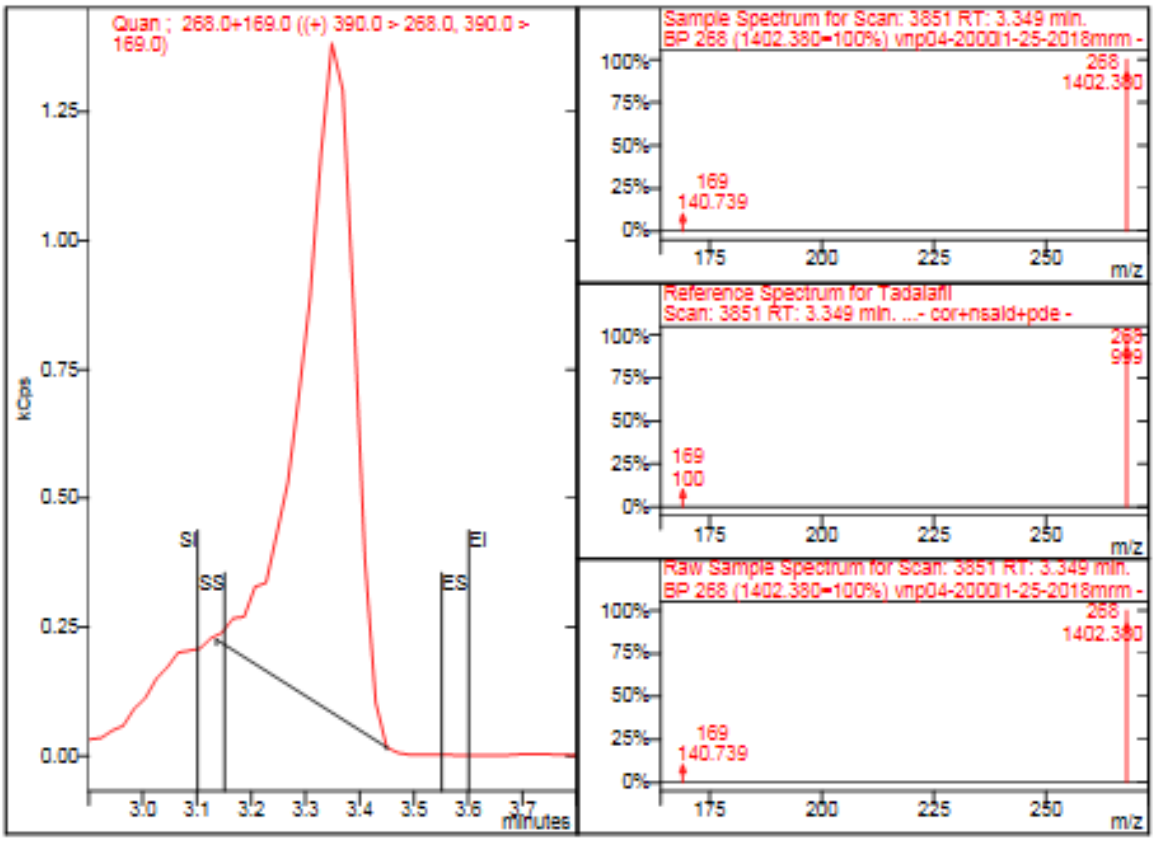
Peak Name:	Tadalafil				
Result Index:	11	Compound Number: 11		CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.351 +/- 0.200	3.353 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 268.0:88.0%	68.0% - 108.0%	87.6%	Pass
	m/z 169.0:12.4%	0.1% - 32.4%	11.6%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	268.0+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	8864	Pass
Height		1301	
Amount (Conc.)	>= 0	8864 Counts	Pass



Hình PL2.20.2. Kết quả định danh Tadalafil trong mẫu VNP04

Sample ID:	VNP04-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/25/2018 10:30 PM	Data File:	...sald+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:31 PM	Method:	...sald+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

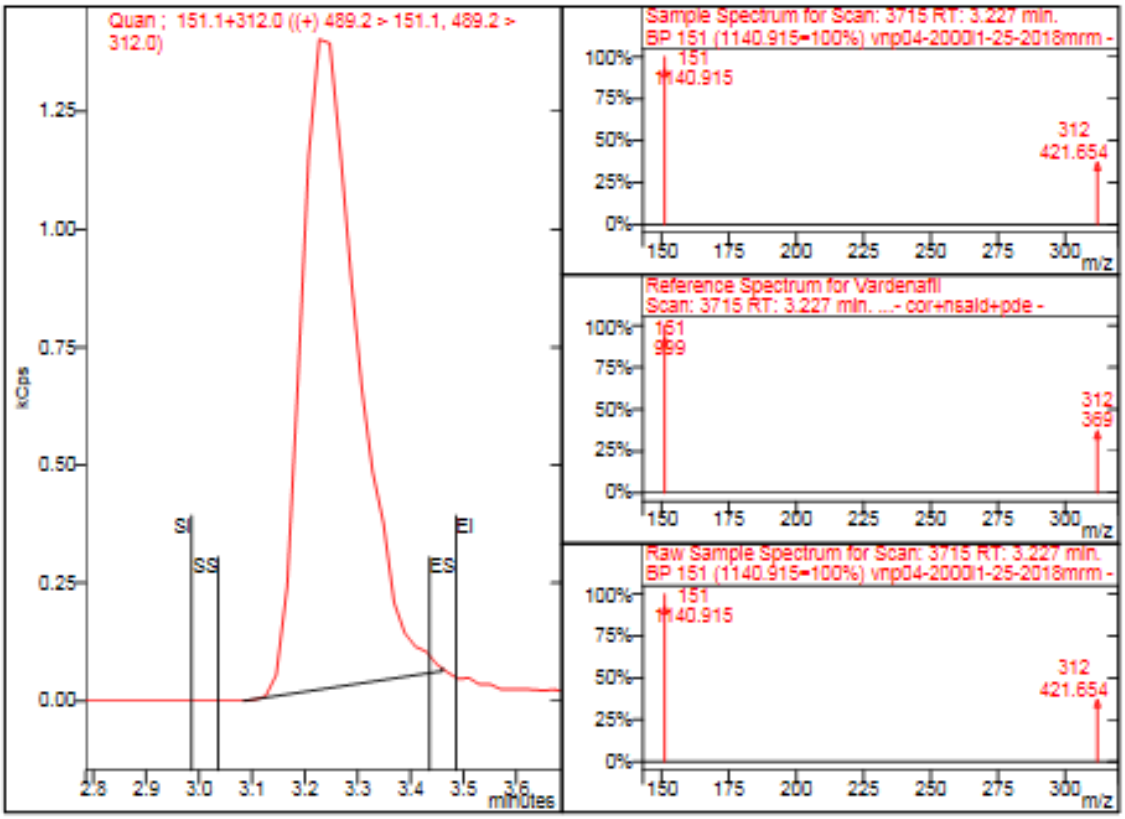
Peak Name:	Vardenafil			
Result Index:	10	Compound Number: 10	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Highest		
Retention Time	3.236 +/- 0.200	3.237 min.	Pass
Match Result		N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 151.1:73.6%	53.6% - 93.6% 73.6%	Pass
	m/z 312.0:25.5%	5.5% - 45.5% 25.5%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	151.1+312.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	10393	Pass
Height		1378	
Amount (Conc.)	>= 0	10393 Counts	Pass



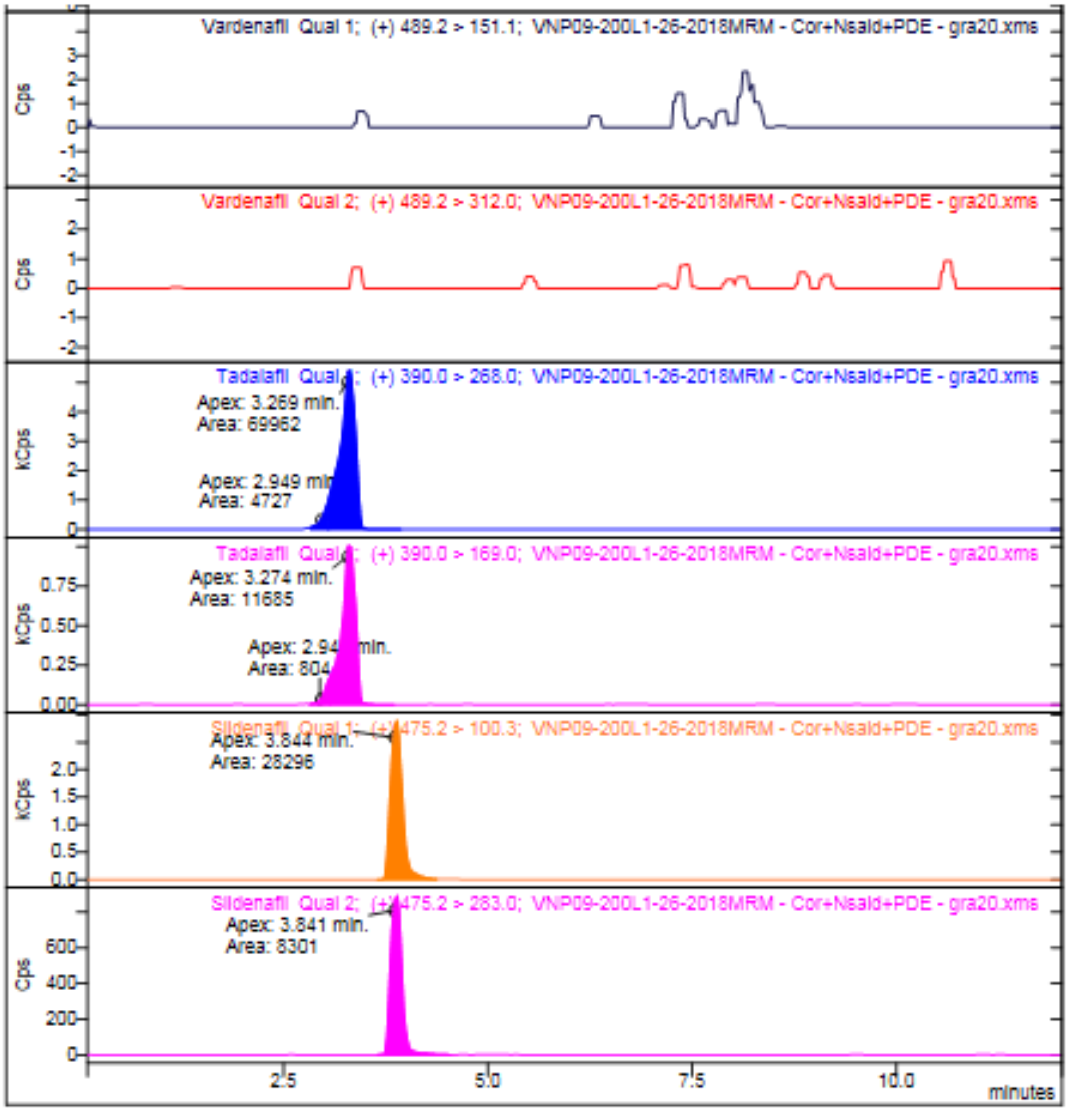
Hình PL2.20.3. Kết quả định danh Vardenafil trong mẫu VNP04

2.22. Mẫu VNP09

Print Date: 14 May 2018 10:22:34

Chromatogram Plots

File: ...data\minh\180125\vnp09-200l1-26-2018mrm - cor+nsald+pde - gra20.xms
Sample: VNP09-200L
Operator: TT2
Scan Range: 1 - 14160 Time Range: 0.09 - 12.03 min.
Date: 1/26/2018 12:31 AM



Hình PL2.22.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNP09

Sample ID:	VNP09+200L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/25/2018 12:31 AM	Data File:	...said+pde - gra20.ams
Calculation Date:	12/17/2018 5:14 PM	Method:	...said+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

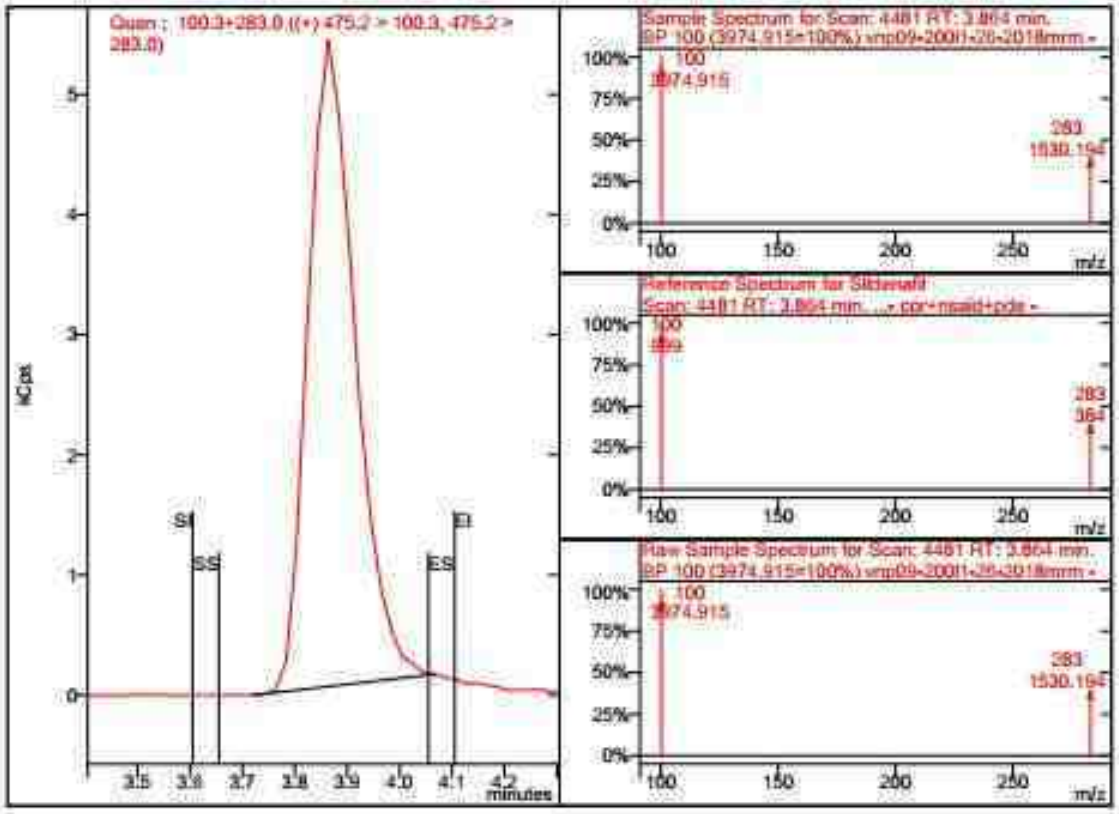
Peak Name:	Sildenafil				
Result Index:	12	Compound Number: 12	CAS Number: None		Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.855 +/- 0.200	3.865 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 100.3:77.7%	57.7% - 97.7%	76.5%	Pass
	m/z 283.0:22.2%	2.2% - 42.2%	23.1%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	100.3+283.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	33815	Pass
Height		5383	
Amount (Conc.)	>= 0	33815 Counts	Pass



Hình PL2.22.2. Kết quả định danh Sildenafil trong mẫu VNP09

Sample ID:	VNP09-200L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/26/2018 12:31 AM	Data File:	...said+pde • gra20.xms
Calculation Date:	12/17/2018 5:14 PM	Method:	...said+pde • gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

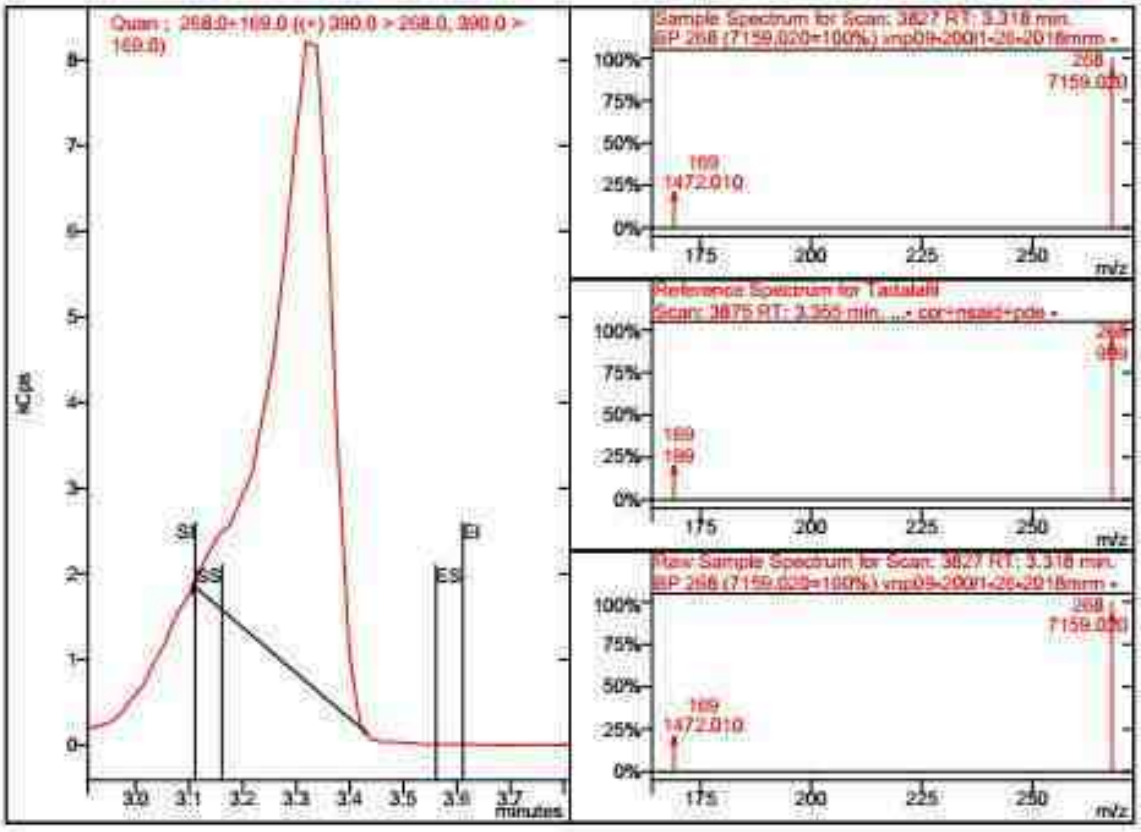
Peak Name:	Tadalafil			
Result Index:	11	Compound Number: 11	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.361 +/- 0.200	3.328 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 ions)	m/z 268.0:84.6%	64.6% - 104.6%	84.8%	Pass
	m/z 169.0:14.5%	0.1% - 34.5%	15.4%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	268.0+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	57274	Pass
Height		7513	
Amount (Conc.)	>= 0	57274 Counts	Pass



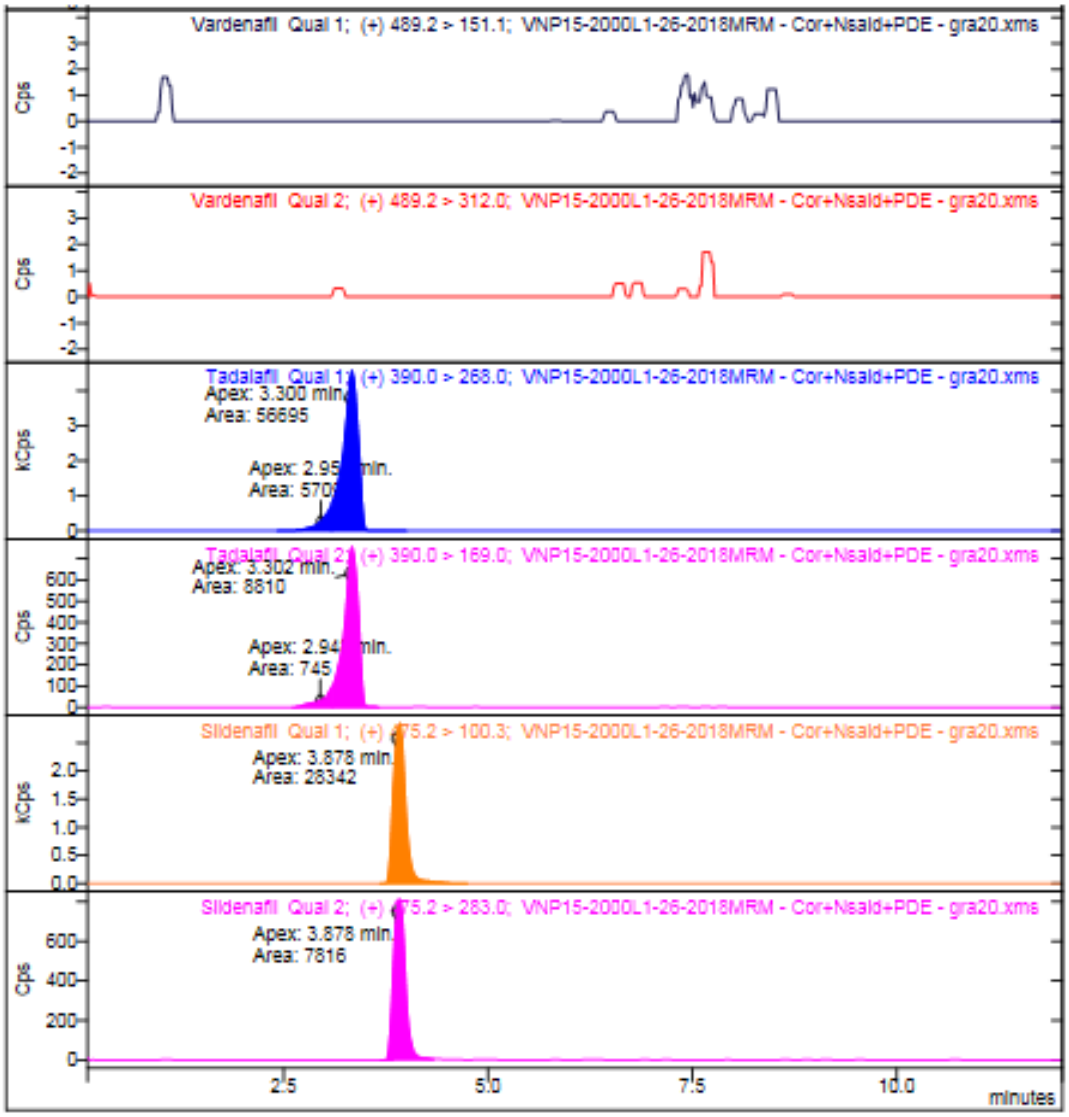
Hình PL2.22.3. Kết quả định danh Tadalafil trong mẫu VNP09

2.23. Mẫu VNP15

Print Date: 14 May 2018 10:24:15

Chromatogram Plots

File: ...ata\minh\180125\vnp15-2000l1-26-2018mrm - cor+nsald+pde - gra20.xms
Sample: VNP15-2000L
Operator: TT2
Scan Range: 1 - 14160 Time Range: 0.09 - 12.03 min.
Date: 1/26/2018 2:46 AM



Hình PL2.23.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNP15

Sample ID:	VNP15-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/26/2018 2:46 AM	Data File:	...said+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:52 PM	Method:	...said+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

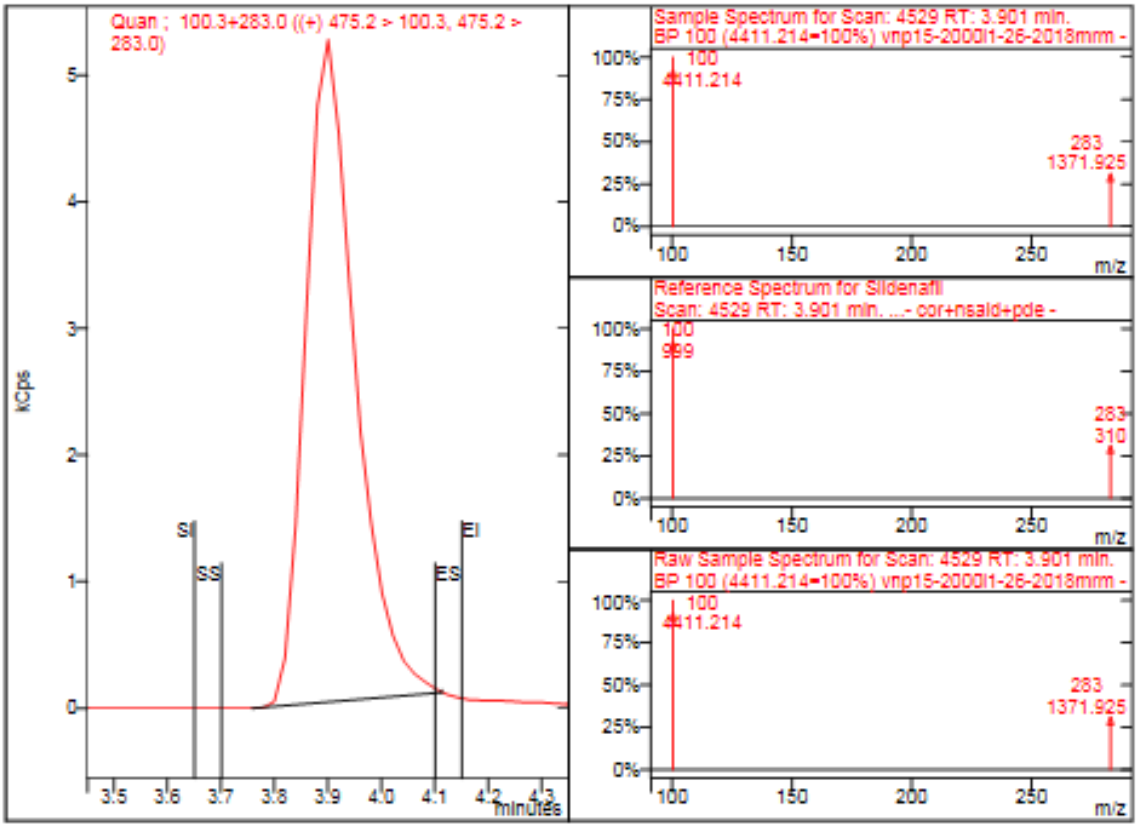
Peak Name:	Sildenafil			
Result Index:	12	Compound Number: 12	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.901 +/- 0.200	3.899 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 100.3:77.4%	57.4% - 97.4%	77.4%	Pass
	m/z 283.0:22.2%	2.2% - 42.2%	22.2%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	100.3+283.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	33903	Pass
Height		5234	
Amount (Conc.)	>= 0	33903 Counts	Pass



Hình PL2.23.2. Kết quả định danh Sildenafil trong mẫu VNP15

Sample ID:	VNP15-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/26/2018 2:46 AM	Data File:	...sald+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:52 PM	Method:	...sald+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

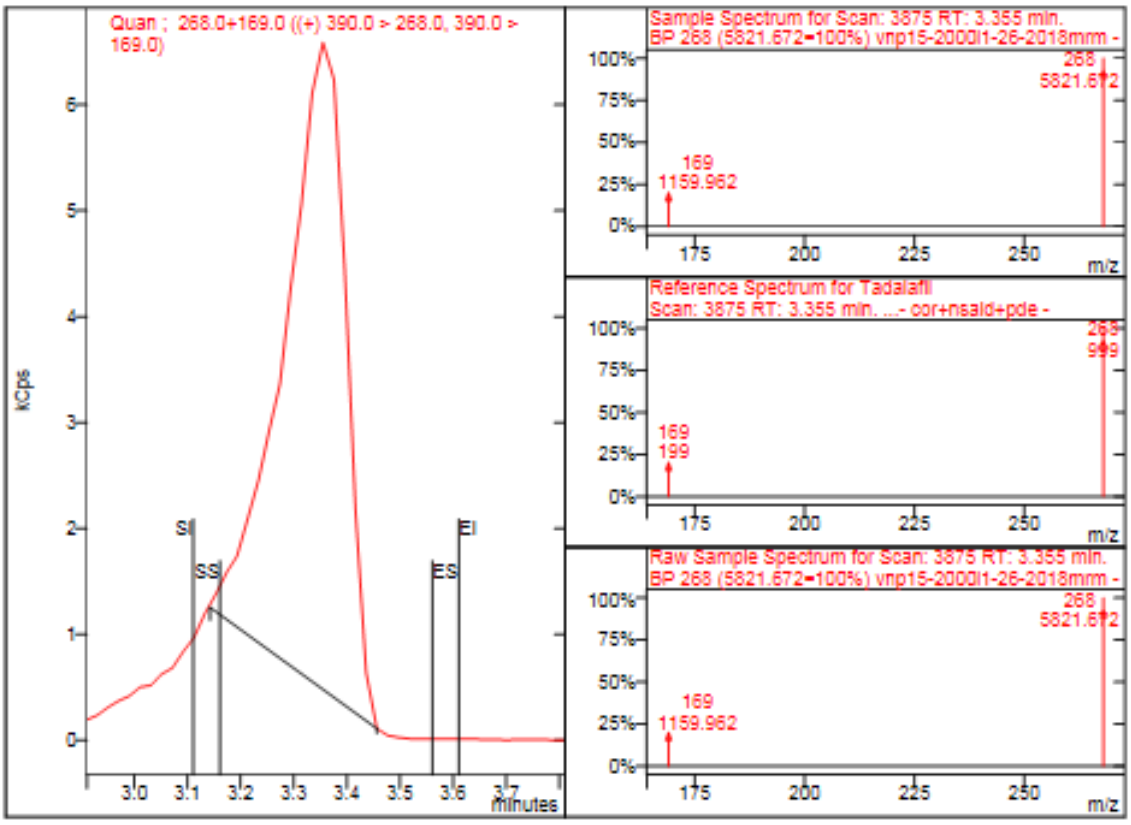
Peak Name:	Tadalafil		
Result Index:	11	Compound Number: 11	CAS Number: None

Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Highest		
Retention Time	3.361 +/- 0.200	3.357 min.	Pass
Match Result		N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 268.0:84.6%	64.6% - 104.6% 84.6%	Pass
	m/z 169.0:14.5%	0.1% - 34.5% 14.5%	Pass

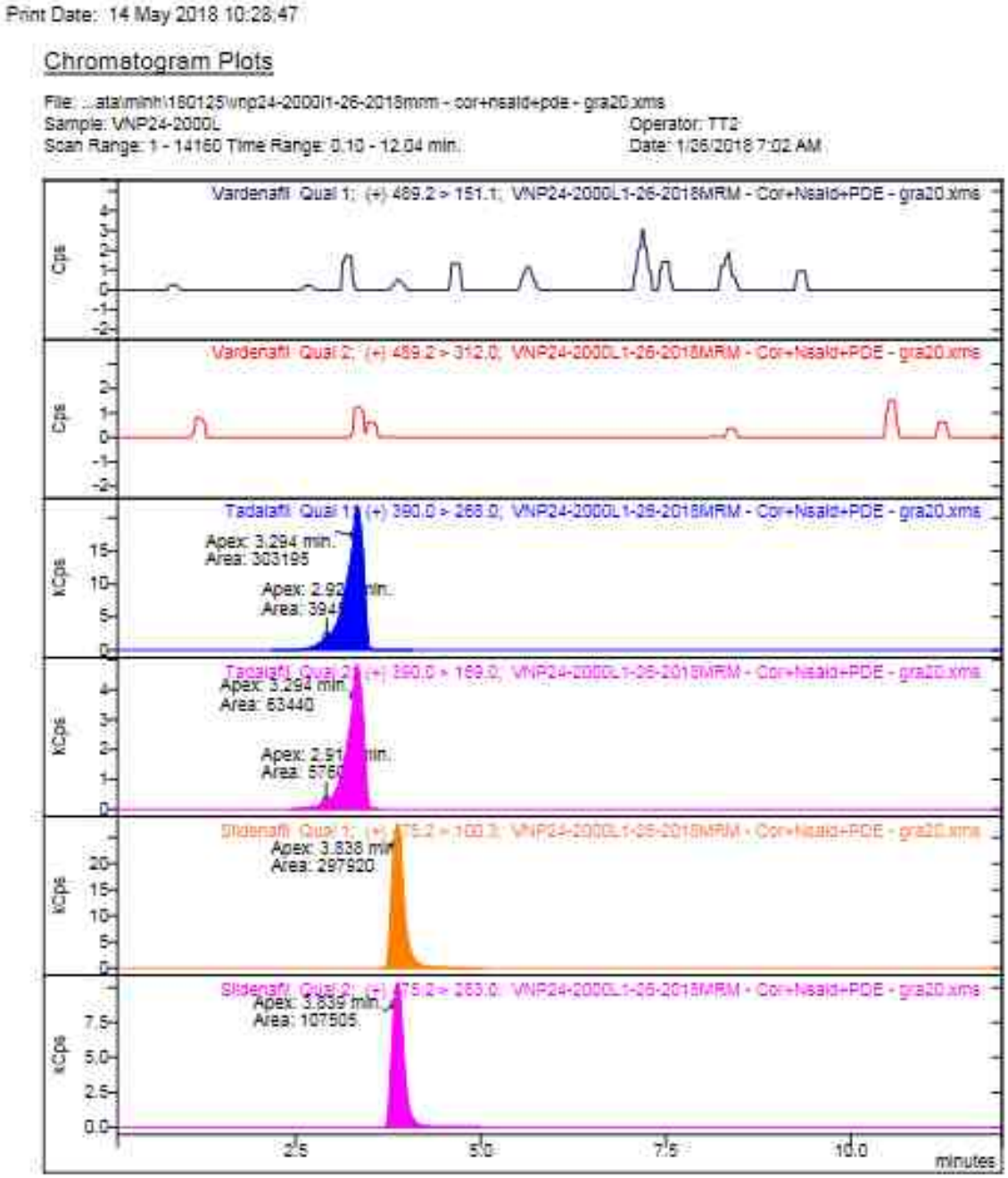
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	268.0+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	49350	Pass
Height		6116	
Amount (Conc.)	>= 0	49350 Counts	Pass



Hình PL2.23.3. Kết quả định danh Vardenafil trong mẫu VNP15

2.24. Mẫu VNP24



Hình PL2.24.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNP24

Sample ID:	VNP24-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/26/2018 7:02 AM	Data File:	...sald+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:54 PM	Method:	...sald+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

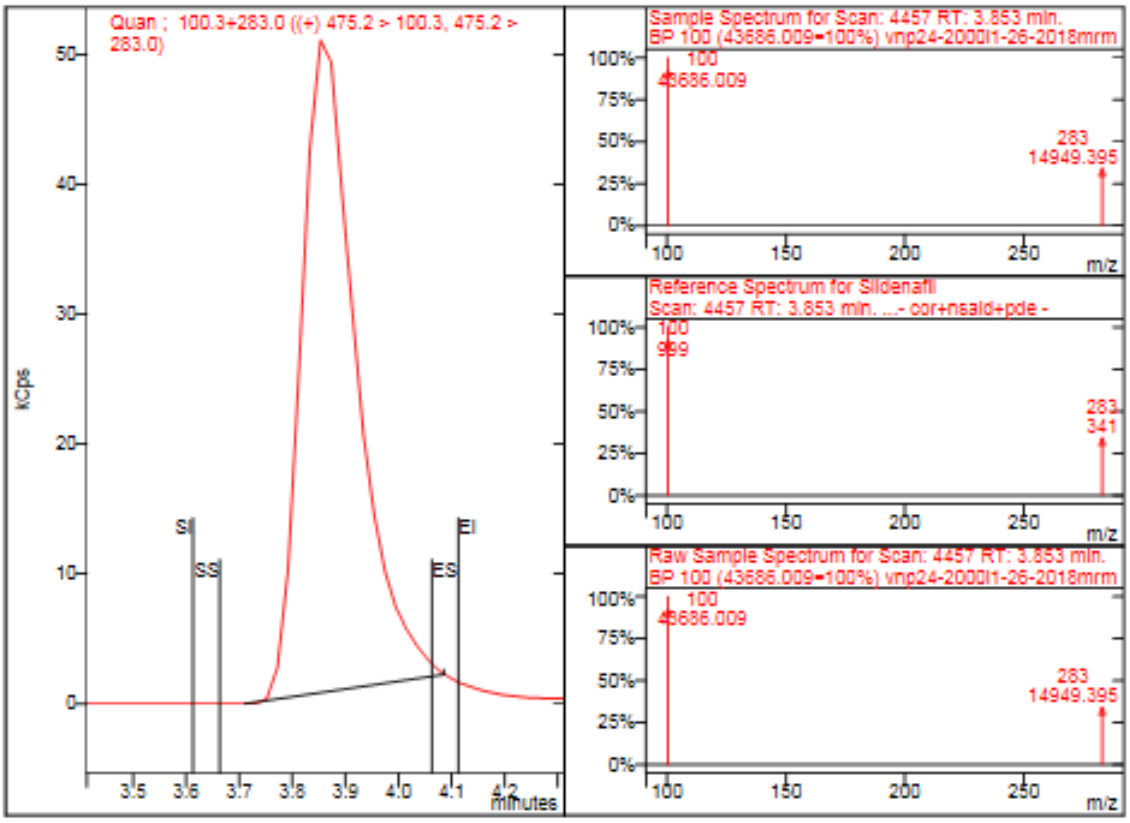
Peak Name: Sildenafil
Result Index: 12 Compound Number: 12 CAS Number: None Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.863 +/- 0.200	3.860 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 100.3:72.3%	52.3% - 92.3%	72.3%	Pass
	m/z 283.0:27.1%	7.1% - 47.1%	27.1%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	100.3+283.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	364567	Pass
Height		50229	
Amount (Conc.)	>= 0	364567 Counts	Pass



Hình PL2.24.2. Kết quả định danh Sildenafil trong mẫu VNP24

Sample ID:	VNP24-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/26/2018 7:02 AM	Data File:	...sald+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:54 PM	Method:	...sald+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

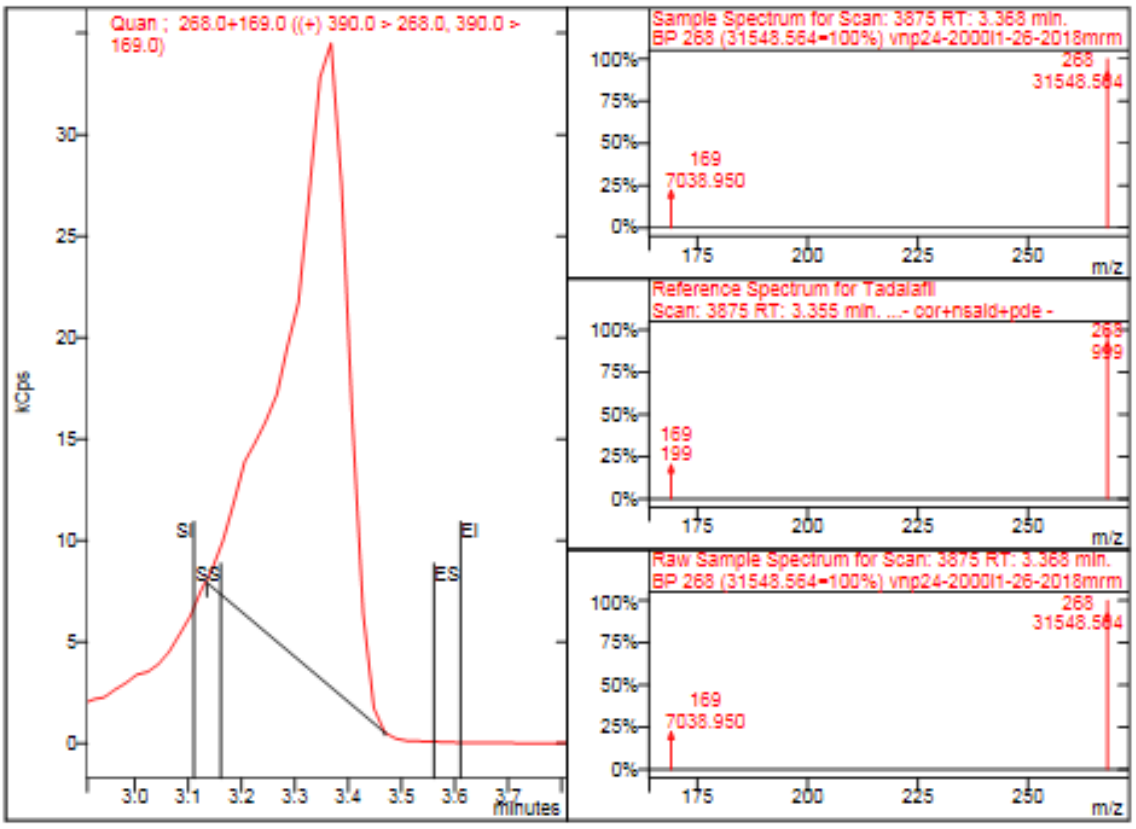
Peak Name:	Tadalafil			
Result Index:	11	Compound Number: 11	CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification	Actual		Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.361 +/- 0.200	3.361 min.		Pass
Match Result		N/A		
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 268.0:84.6%	64.6% - 104.6%	80.6%	Pass
	m/z 169.0:14.5%	0.1% - 34.5%	18.3%	Pass

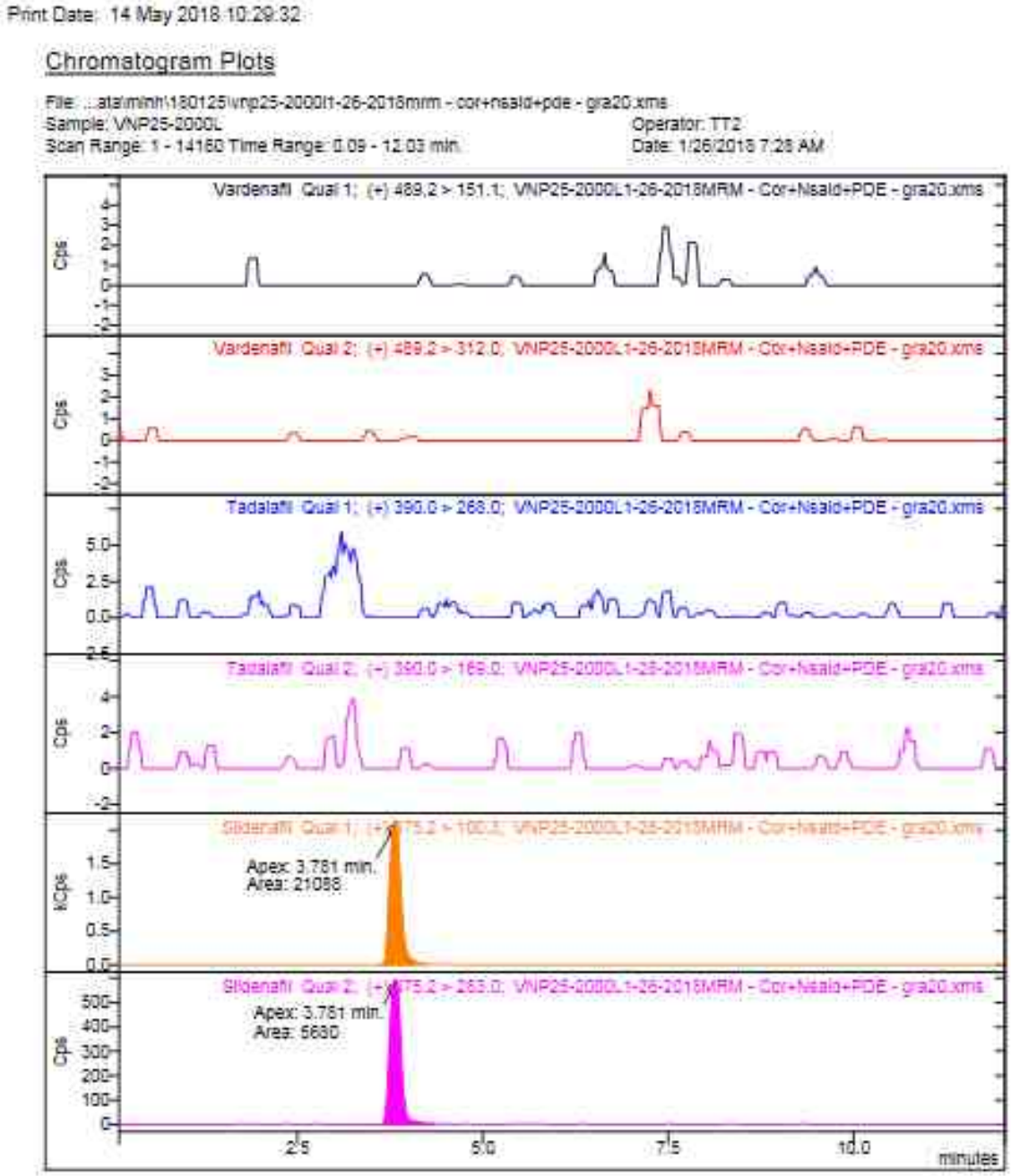
Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	268.0+169.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	254801	Pass
Height		31606	
Amount (Conc.)	>= 0	254801 Counts	Pass



Hình PL3.24.3. Kết quả định danh Tadafil trong mẫu VNP24

2.25. Mẫu VNP25



Hình PL2.25.1. Sắc ký đồ mẫu dương tính VNP25

Sample ID:	VNP25-2000L	Operator:	TT2
Instrument ID:	Bruker LC/MS	Last Calibration:	None
Measurement Type:	Area	Calibration Type:	Internal Standard
Acquisition Date:	1/26/2018 7:28 AM	Data File:	...sald+pde - gra20.xms
Calculation Date:	9/27/2018 3:57 PM	Method:	...sald+pde - gra20.mth
Sample Type:	Analysis		
Inj. Sample Notes:	None		

Compound Information

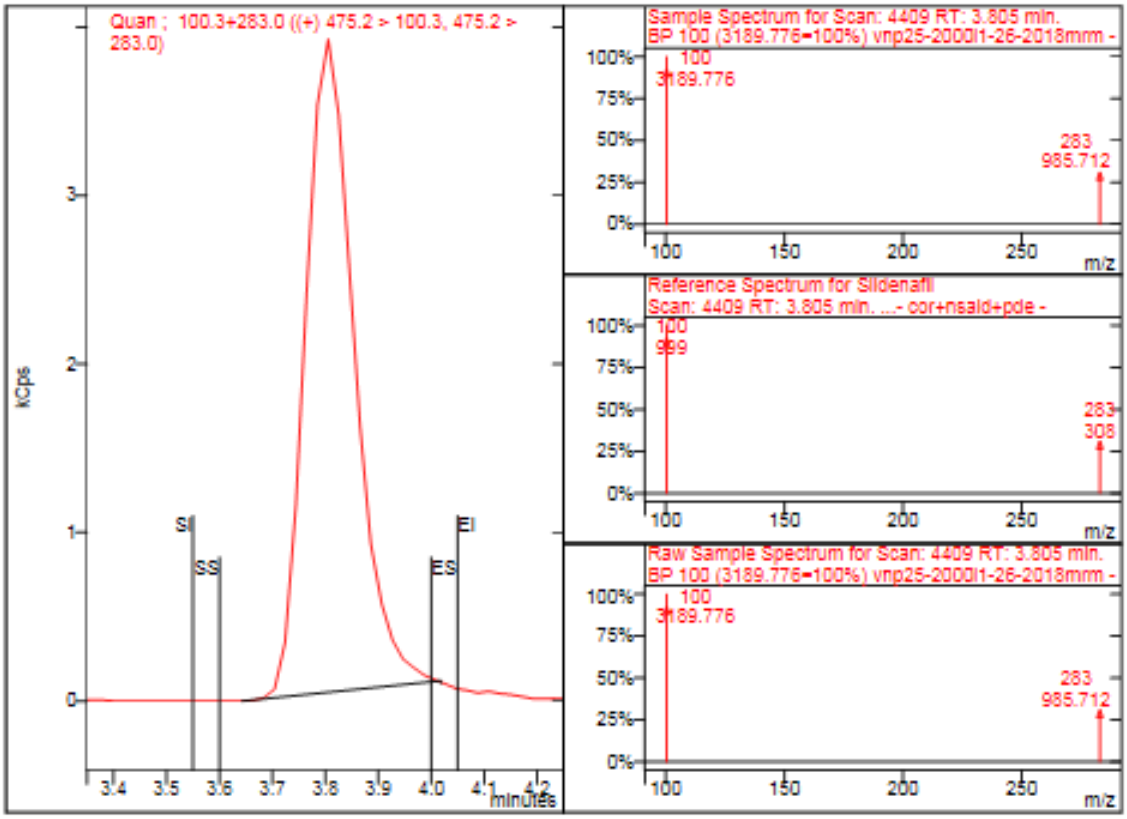
Peak Name:	Sildenafil				
Result Index:	12	Compound Number: 12		CAS Number: None	Identified

Identification

Parameter	Specification		Actual	Status
Search Type	Highest			
Retention Time	3.800 +/- 0.200		3.804 min.	Pass
Match Result			N/A	
Qual. Ion Ratio (2 Ions)	m/z 100.3:78.1%	58.1% - 98.1%	78.1%	Pass
	m/z 283.0:21.6%	1.6% - 41.6%	21.6%	Pass

Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	100.3+283.0		
Calibration Equation	Average		
Area	>=500	25038	Pass
Height		3875	
Amount (Conc.)	>= 0	25038 Counts	Pass

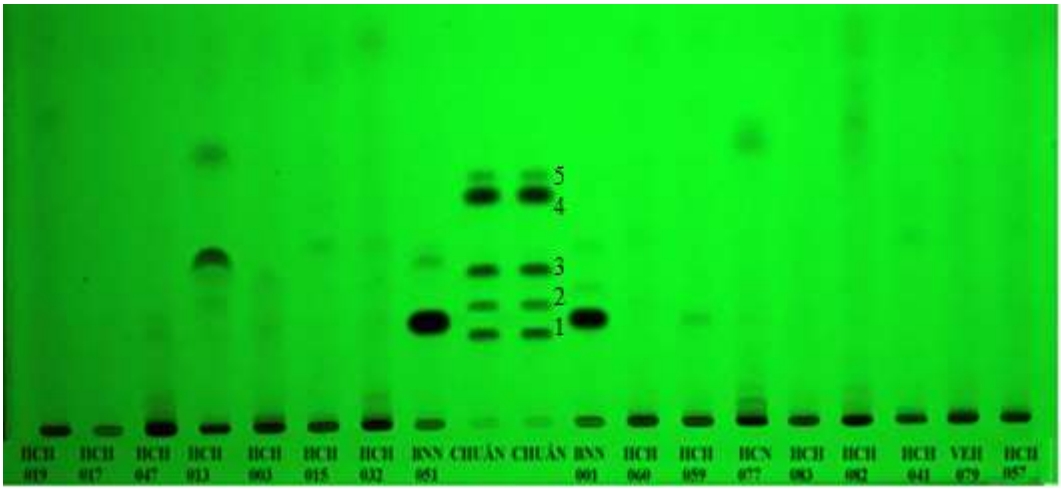


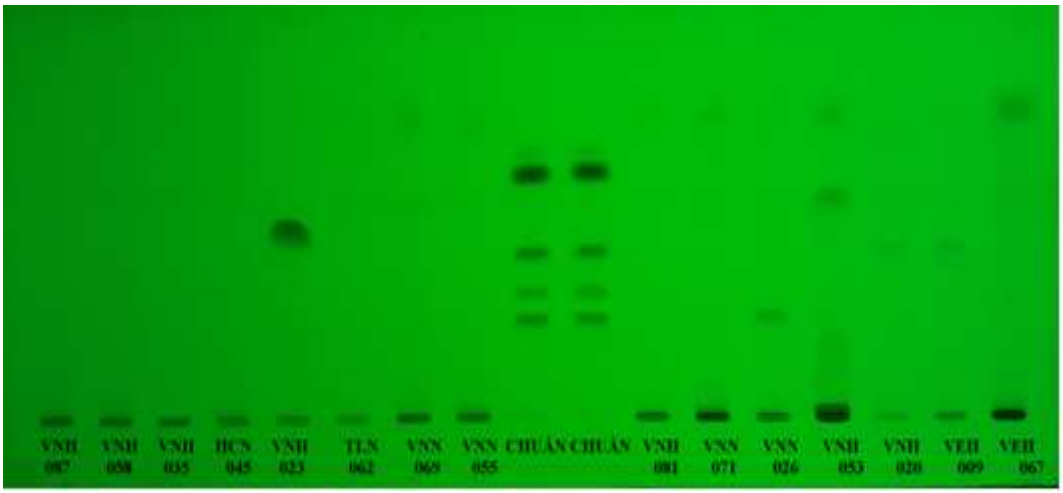
Hình PL2.25.2. Kết quả định danh Sildenafil trong mẫu VNP25

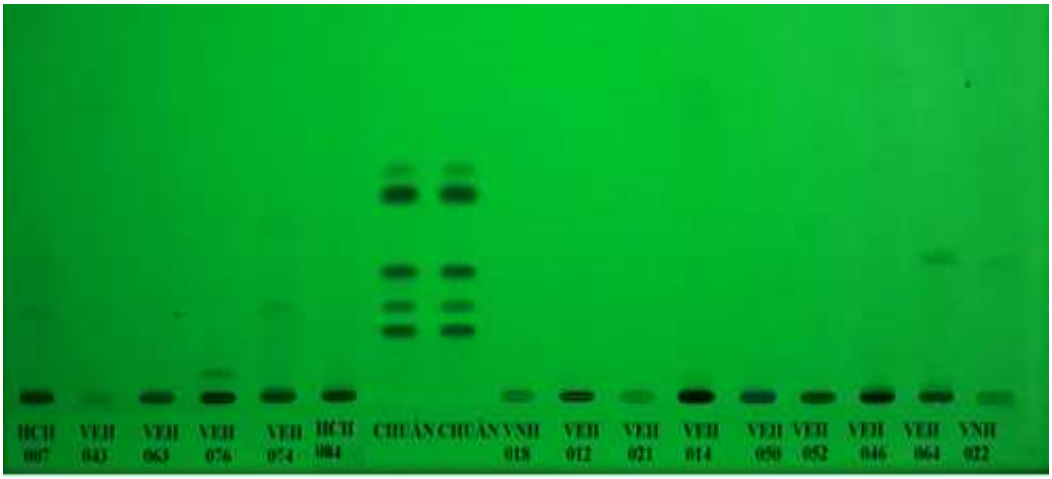
PHỤ LỤC 3. HÌNH ẢNH SẮC KÝ ĐỒ BẢN MỎNG, KẾT QUẢ CHỐNG PHỔ UV CỦA CÁC CHẾ PHẨM

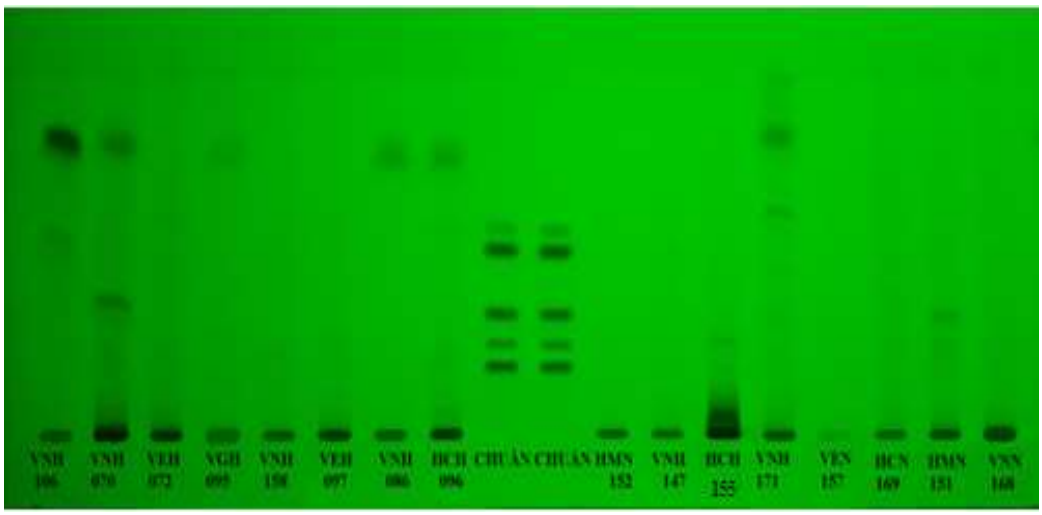
PHỤ LỤC 3.1. KHẢO SÁT NHÓM GIẢM ĐAU, CHỐNG VIÊM GLUCOCORTICOID

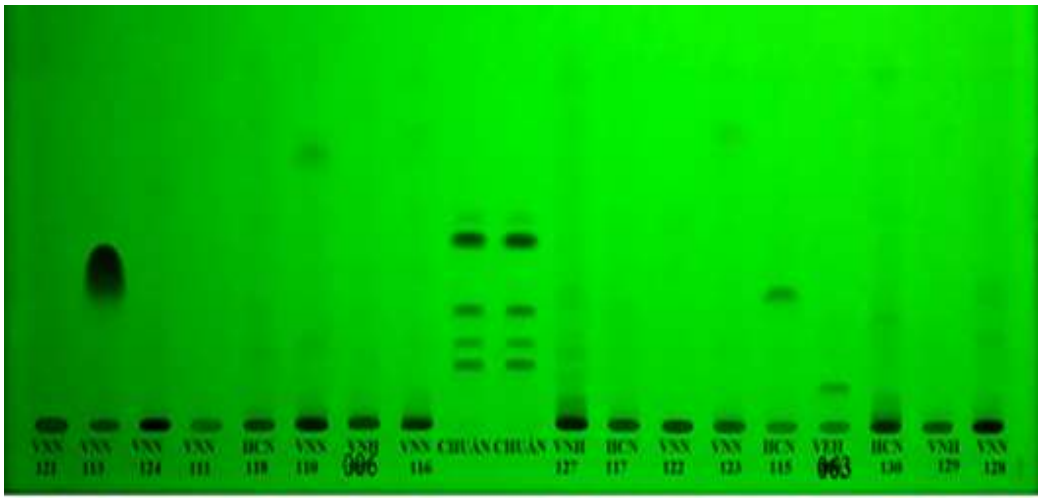
Phụ lục 3.1.1. Sắc ký đồ bản mỏng các mẫu hỗ trợ điều trị xương khớp triển khai hệ dung môi Cloroform - ethyl acetat - ethanol (8,5:1:0,5)

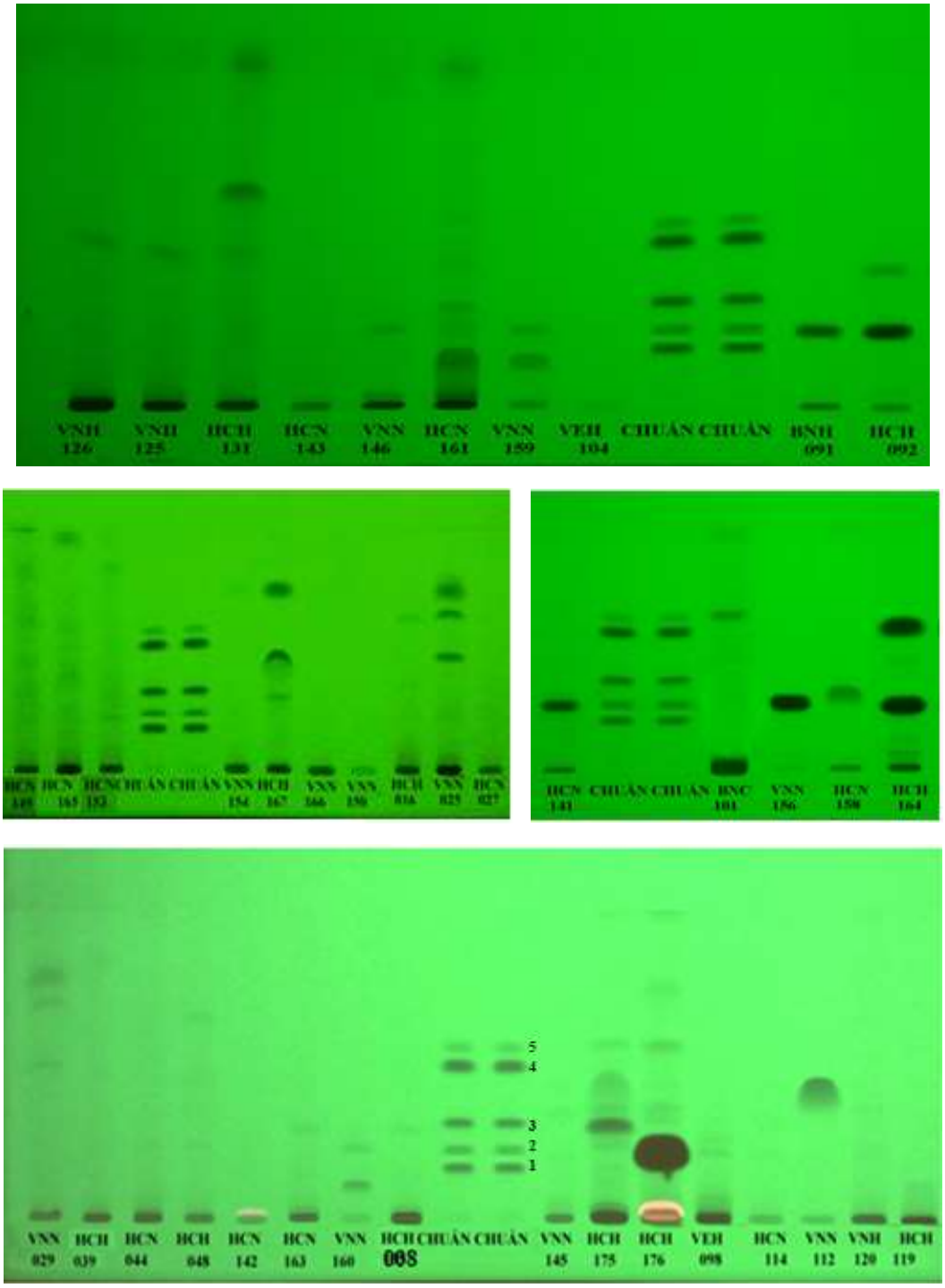





HCH 007
VEH 043
VEH 063
VEH 076
VEH 074
HCH 084
CHUẨN
CHUẨN
VNH 018
VEH 012
VEH 021
VEH 014
VEH 050
VEH 052
VEH 046
VEH 064
VNH 022


VNH 106
VNH 070
VEH 072
NGH 095
VNH 158
VEH 097
VNH 086
HCH 096
CHUẨN
CHUẨN
HMN 152
VNH 147
HCH 155
VNH 171
VEN 157
HCN 169
HMN 151
VNN 168

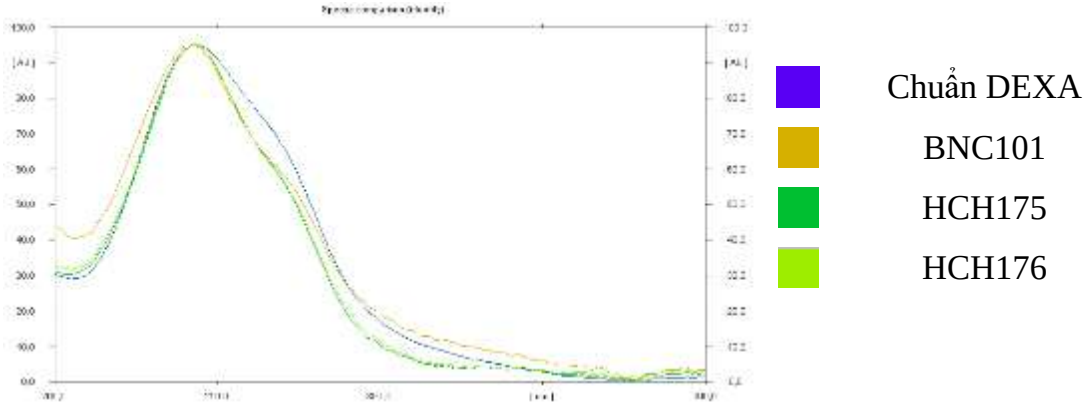

VNN 121
VNN 133
VNN 124
VNN 111
HCN 118
VNN 110
VNH 006
VNN 116
CHUẨN
CHUẨN
VNH 127
HCN 117
VNN 122
VNN 123
HCN 115
VEH 063
HCN 130
VNH 129
VNN 120



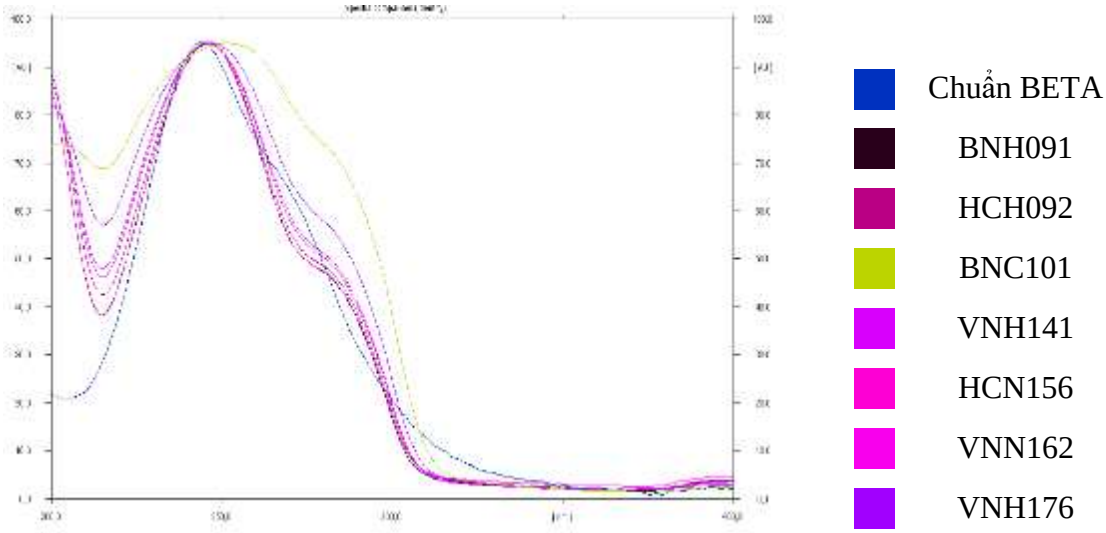
Hình PL3.1. Sắc ký đồ phân tích các chế phẩm đông dược điều trị và hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp trên triển khai hệ dung môi Cloroform - ethyl acetat - ethanol (8,5:1:0,5)

Kí hiệu: CHUẨN- Hỗn hợp chất chuẩn nhóm glucocorticoid *với vị trị chuẩn 1-prednisolon, 2-betamethason, 3-prednison, 4-hydrocortison acetat, 5-dexamethason acetat*

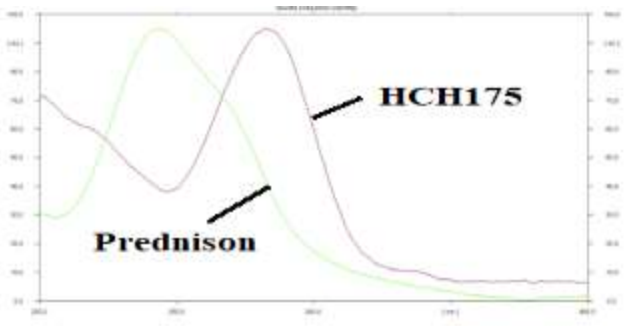
Phụ lục 3.1.2 Hình ảnh chồng phổ chuẩn glucocorticoid và vết các mẫu hỗ trợ điều trị xương khớp



Hình PL3.1.2.1. Kết quả chồng phổ các mẫu dương tính dexamethason acetat



Hình PL3.1.2.2. Kết quả chồng phổ các mẫu nghi ngờ betamethason



Hình PL3.1.2.3. Kết quả chồng phổ mẫu nghi ngờ prednison

Phụ lục 3.1.3 Kết quả sắc ký đồ của một số mẫu hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp nghi ngờ có nhóm giảm đau, chống viêm

winCATS Planar Chromatography Manager

Analysis Report

SOP document		
Validated	Design	
Description :		
Analysis	D:\Data\De tai cap Bo\Ket qua HPTLC\Corticoid\Ket qua\	
	Duong chuan + DL 3 duon tinh + 6CBC.cna	
Created/used by	Dao Thi Cam Minh	Tuesday, June 11, 2018 5:47:27 PM
Current user	Dao Thi Cam Minh	

Detection - CAMAG TLC Scanner

Information

Application position	10.0 mm
Solvent front position	85.0 mm

Instrument CAMAG TLC Scanner "Scanner_210984" S/N 210984 (2.01.02)

Executed by	Dao Thi Cam Minh Tuesday, June 11, 2018 5:45:05 PM
Number of tracks	16
Position of first track X	20.0 mm
Distance between tracks	10.0 mm
Scan start pos. Y	10.0 mm
Scan end pos. Y	85.0 mm
Slit dimensions	4.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system	Light
Scanning speed:	20 mm/s
Data resolution	100 µm/step

Measurement Table

Wavelength	245
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	329 V

Detector properties

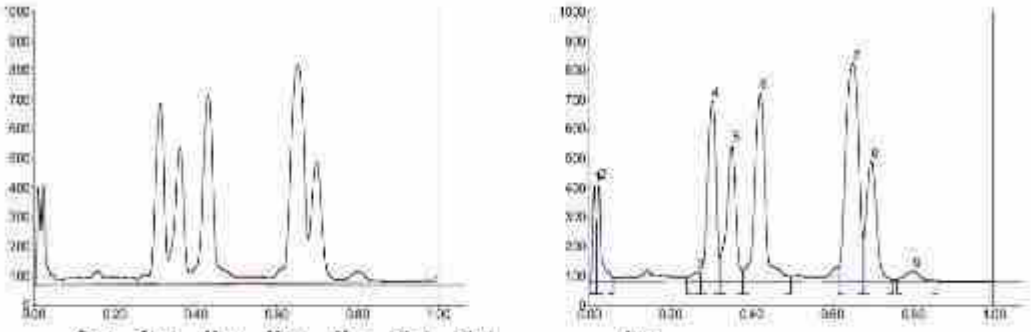
Y-position for 0 adjust	10.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (38)

Integration

Properties

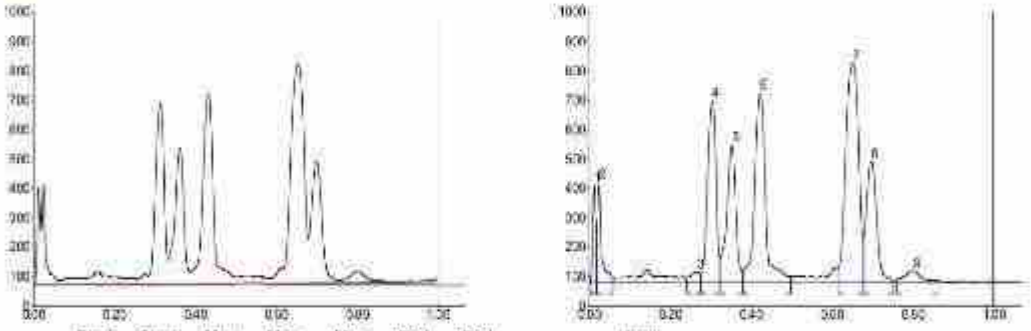
Data filtering	Savitsky-Golay 7
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	5
Peak threshold min. height	10 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	10.0 mm
Track end position	85.0 mm
Display scaling	Automatic

Track 6, ID: Standard6



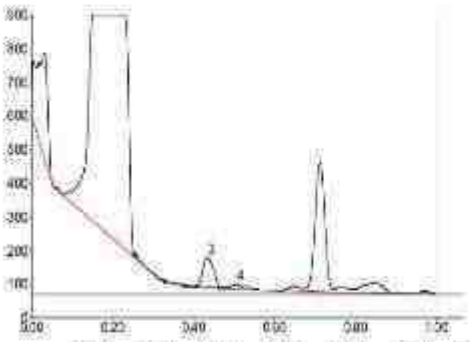
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	0.7	0.03	330.0	8.97	0.05	178.4	2257.3	2.97	unknown *
2	0.05	204.7	0.06	339.1	9.22	0.09	14.3	2918.4	3.85	unknown *
3	0.19	16.1	0.22	34.0	0.92	0.23	28.4	668.7	0.88	unknown *
4	0.23	26.6	0.25	615.9	16.74	0.28	83.1	11135.5	14.67	PREL
5	0.28	63.5	0.33	464.9	12.64	0.37	39.6	9160.7	12.07	BETA
6	0.38	40.4	0.45	643.6	17.49	0.56	18.4	15213.6	20.05	PREN
7	0.62	48.7	0.66	743.9	20.22	0.67	149.6	20781.7	27.39	HYRO
8	0.67	153.7	0.72	411.3	11.18	0.74	8.9	9122.6	12.02	DEXA
9	0.77	9.5	0.82	38.1	1.03	0.86	4.2	1379.8	1.82	unknown *

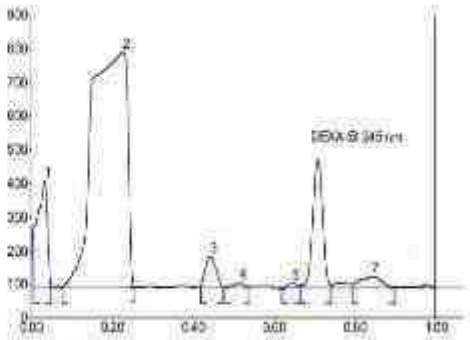
Track 7, ID: Standard7



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	1.2	0.03	361.5	9.17	0.05	192.5	2422.8	2.80	unknown *
2	0.05	202.1	0.06	370.8	9.41	0.09	23.5	3540.2	4.09	unknown *
3	0.19	22.5	0.22	34.1	0.87	0.23	34.1	495.7	0.57	unknown *
4	0.23	42.7	0.25	662.0	16.80	0.28	109.8	13248.9	15.31	PREL
5	0.28	114.4	0.33	525.9	13.35	0.37	92.0	11630.0	13.44	BETA
6	0.38	92.2	0.45	679.4	17.24	0.56	25.5	17121.4	19.78	PREN
7	0.62	18.3	0.66	767.2	19.47	0.67	166.8	23299.3	26.92	HYRO
8	0.67	170.8	0.72	438.8	11.09	0.74	9.3	9782.0	11.30	DEXA
9	0.77	9.0	0.82	43.0	1.09	0.86	6.6	1544.0	1.78	unknown *

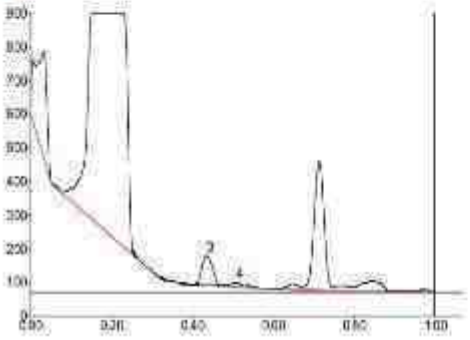
Track 8, ID: BNC101

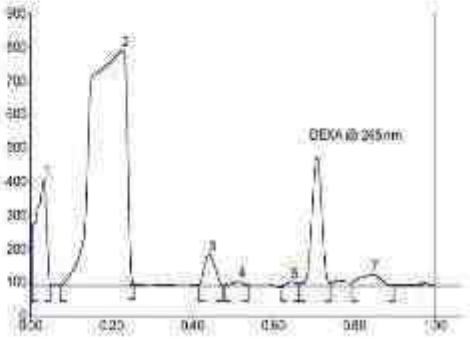




Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.01	162.3	0.05	317.8	17.41	0.08	3.2	7019.1	8.23	unknown *
2	0.08	0.3	0.33	700.5	38.38	0.36	4.1	52814.7	61.90	unknown *
3	0.36	5.6	0.42	93.4	5.12	0.48	0.5	2155.3	2.53	unknown*
4	0.48	0.1	0.51	13.9	0.76	0.58	0.2	322.6	0.38	unknown *
5	0.58	0.1	0.61	13.3	0.73	0.65	6.3	263.6	0.31	unknown *
6	0.65	6.4	0.72	382.0	20.93	0.76	8.2	8078.2	9.47	DEXA
7	0.86	11.5	0.91	33.9	1.86	0.96	0.9	1568.8	1.84	unknown *

Track 10, ID: HCH176





winCATS Planar Chromatography Manager

Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.02	82.4	0.05	205.6	10.65	0.08	0.3	3229.2	3.28	unknown *
2	0.09	0.2	0.34	724.0	38.22	0.36	1.5	51732.6	52.53	unknown *
3	0.38	0.2	0.45	129.2	6.82	0.54	10.1	4321.2	4.39	unknown *
4	0.54	10.6	0.58	41.5	2.19	0.61	0.1	833.3	0.85	unknown *
5	0.61	0.9	0.72	297.3	15.69	0.76	0.3	7087.8	7.20	DEXA
6	0.76	1.0	0.80	38.0	2.00	0.82	33.8	1064.2	1.08	unknown *
7	0.86	34.1	0.91	133.9	7.07	0.99	16.8	5690.4	5.78	unknown *

Spectrum scan

Executed by	Bo mon Hoa phan tich Saturday, April 21, 2018 12:37:53 PM
Mode	All detected peaks
Slit dimensions	6.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system	Resolution
Scanning speed	100 mm/s
Data resolution	1 nm/step
Reference spectrum, pos X	10.0 mm
Reference spectrum, pos Y	10.0 mm
Purity scan, relative level	85 %

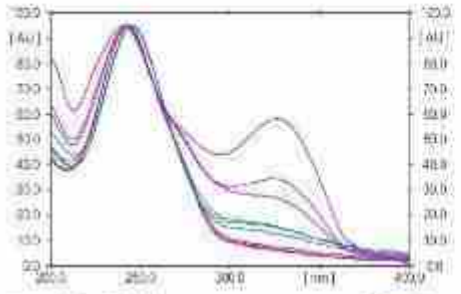
Measurement Table

Lamp	D2 & W
Start wavelength	200 nm
End wavelength	400 nm
Measurement type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector Mode	Automatic

Detector properties

Y-position for 0 adjust	0.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (26)

DEXA on all Tracks



T	Rf	Substance	Max. @	r s,m	r m,e	Purity	r s,a	r s,e	Identity
6	0.72	Rf DEXA	244 nm	0.999928	0.999923	ok 0.999928	0.999923	N/A
7	0.72	Rf DEXA	244 nm	0.999930	0.999901	ok 0.999930	0.999901	N/A
8	0.72	Rf DEXA	244 nm	0.999946	0.999461	ok 0.999946	0.999461	ok
9	0.72	Rf DEXA	244 nm	0.995385	0.994652	ok 0.995385	0.994652	ok
10	0.72	Rf DEXA	245 nm	0.999618	0.998582	ok 0.999618	0.998582	ok

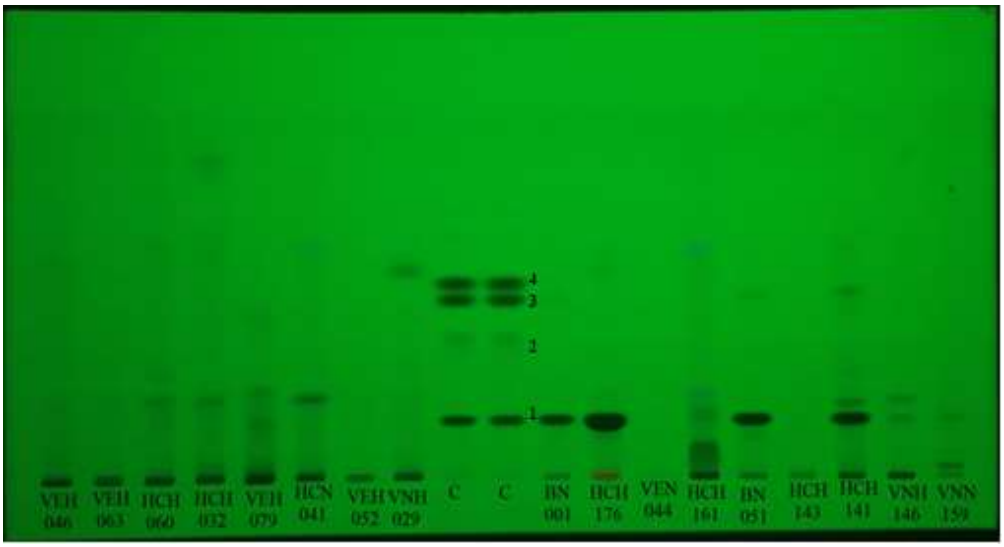
User : Dao Thi Cam Minh
Tuesday, June 11, 2018 5:47:33 PM

Approved : .....
Report ID : 07E30616070502QA

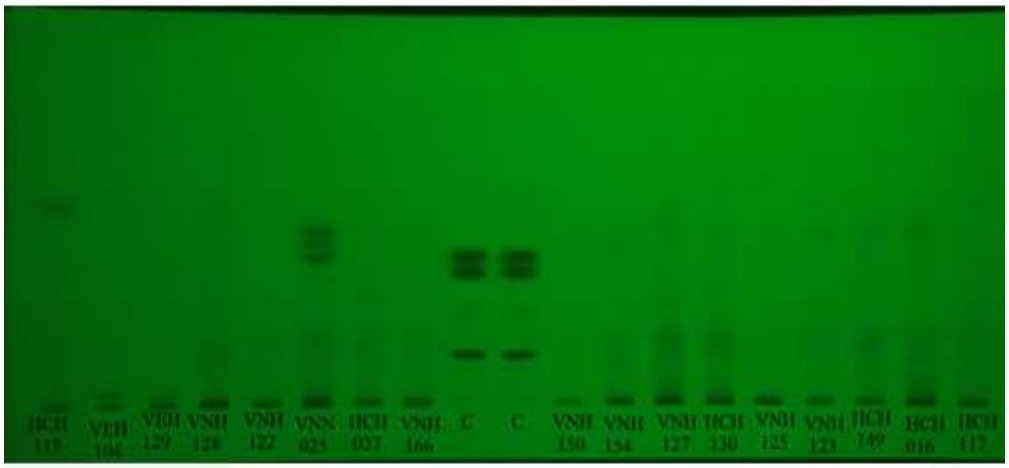
SN 2110W007, V1.4.9
Page 4 of 4

PHỤ LỤC 3.2. KHẢO SÁT NHÓM GIẢM ĐAU, CHỐNG VIÊM KHÔNG STEROID

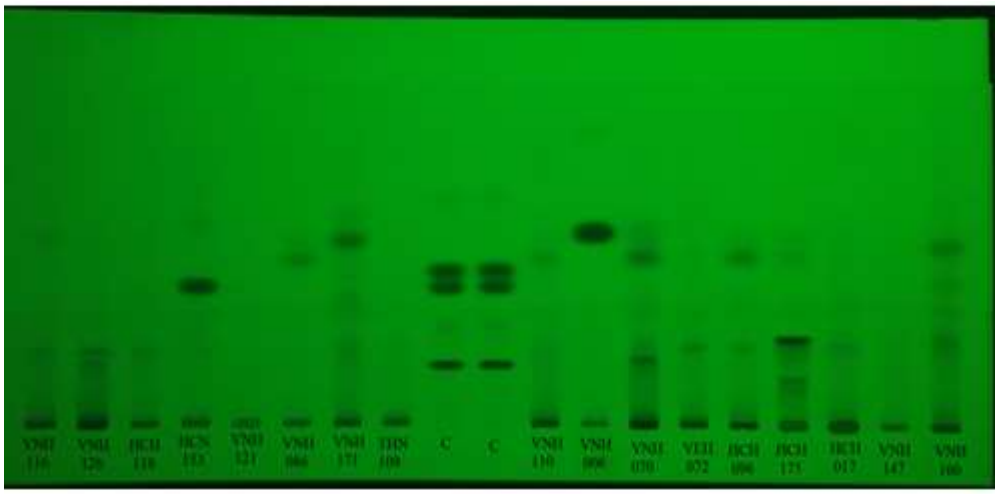
Phụ lục 3.2.1. Sắc ký đồ bản mỏng các mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị xương khớp triển khai hệ dung môi n-hexan : ethyl acetat: acid acetic (6:2,5:1,5)

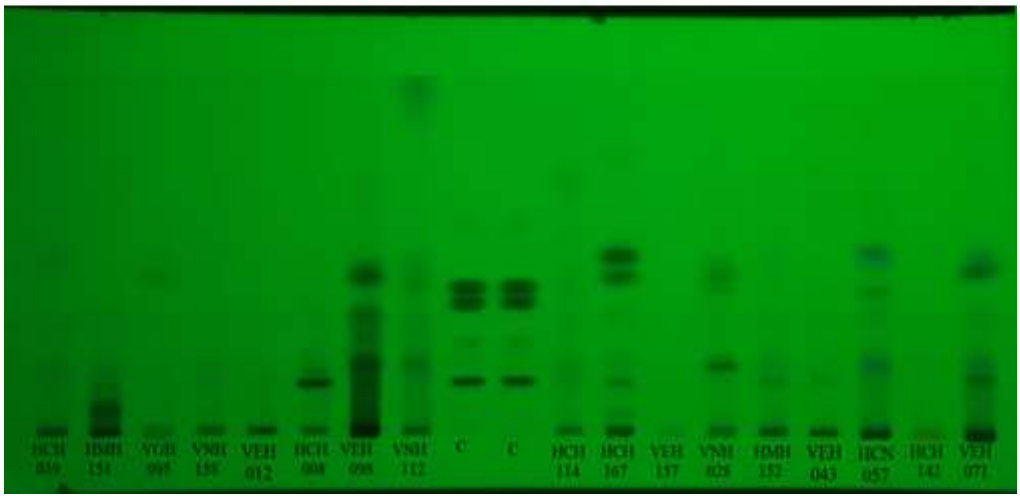


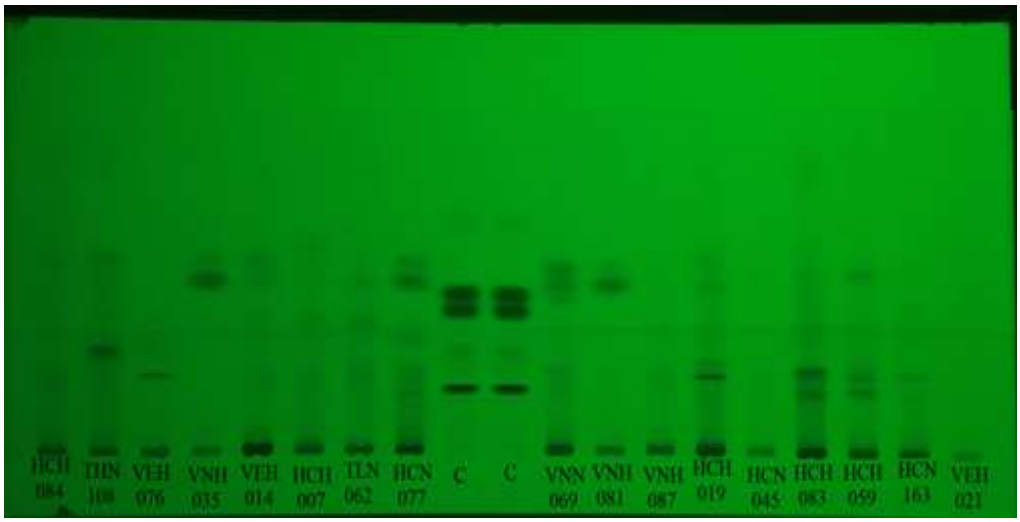
(a)

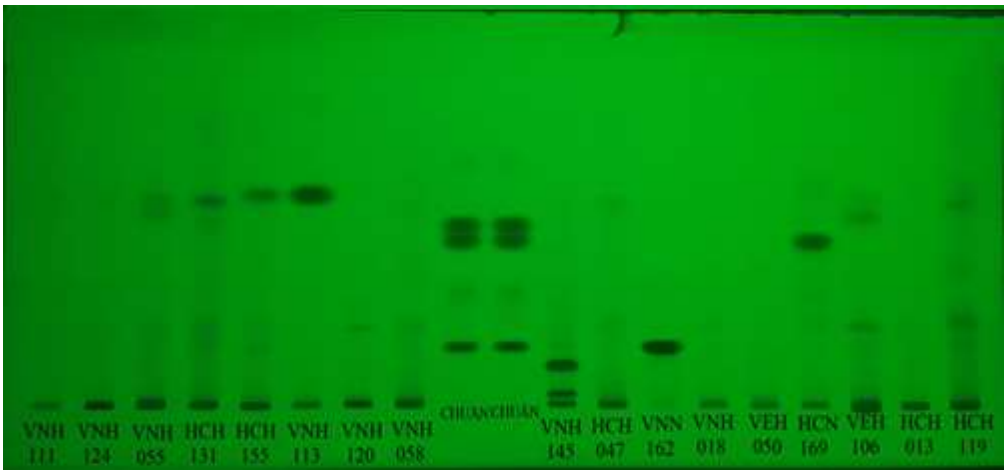


(b)

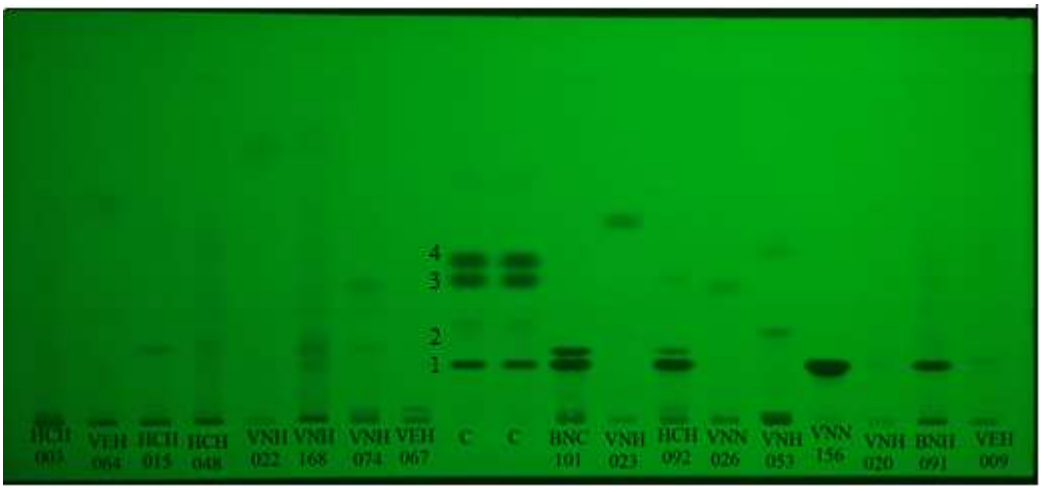

VNH 116
VNH 126
HCH 116
HCN 115
VNH 121
VNH 084
VNH 171
THN 108
C
C
VNH 130
VNH 090
VNH 070
VEH 052
HCH 094
HCH 175
HCH 017
VNH 147
VNH 160
(c)


HCH 039
HMH 151
VGH 095
VNH 155
VEH 012
HCH 004
VEH 098
VNH 112
C
C
HCH 114
HCH 167
VEH 137
VNH 028
HMH 152
VEH 043
HCN 057
HCH 142
VEH 071
(d)


HCH 084
THN 108
VEH 076
VNH 035
VEH 014
HCH 007
TLN 062
HCN 077
C
C
VNN 069
VNH 081
VNH 087
HCH 019
HCN 045
HCH 083
HCH 059
HCN 163
VEH 021
(e)



(f)

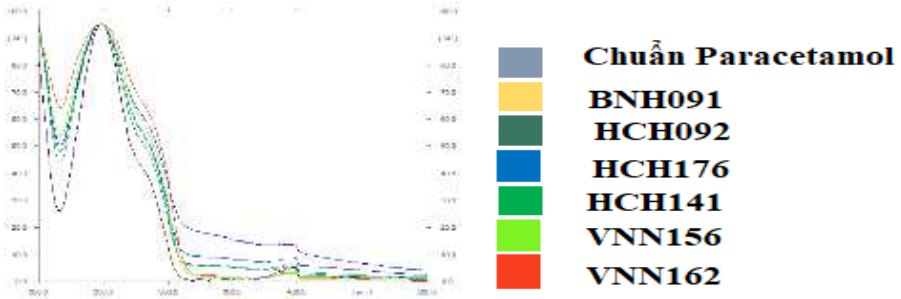


(g)

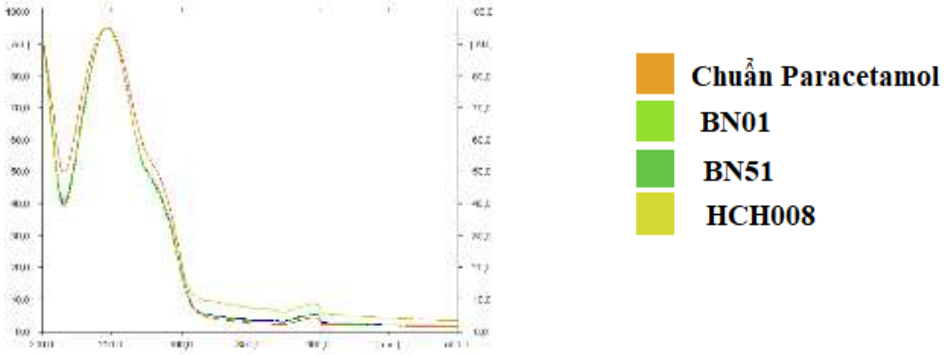
Hình PL 3.2. Sắc ký đồ phân tích các mẫu chế phẩm đông dược điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp trên hệ dung môi triển khai n-hexan : ethyl acetat: acid acetic (6:2,5:1,5)

Kí hiệu: C-Hỗn hợp chất chuẩn nhóm Nsaid với vị trí chuẩn 1-paracetamol, 2-piroxicam, 3-indomethacin, 4-ketoprofen

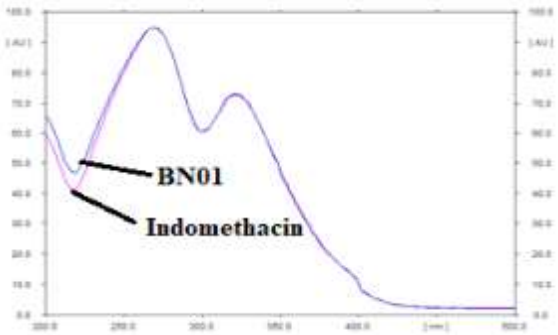
Phụ lục 3.2.2 Hình ảnh chồng phổ chuẩn NSAIDs và mẫu thử điều trị và hỗ trợ điều trị xương khớp



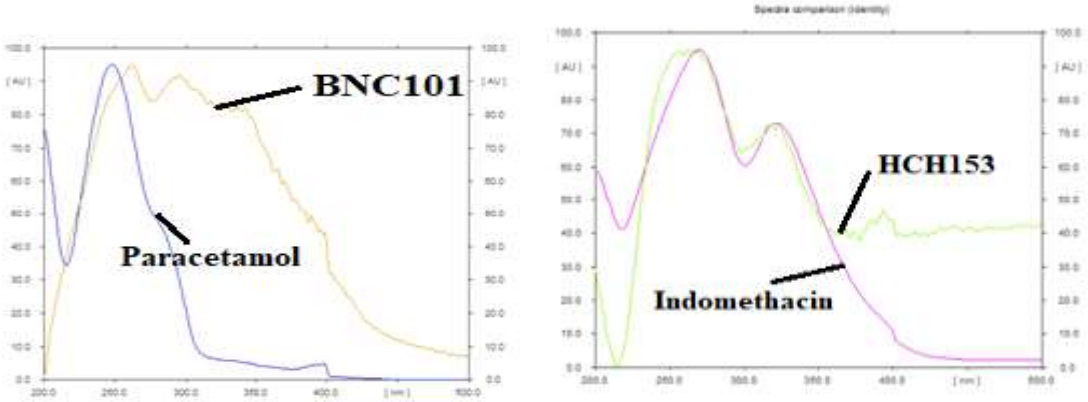
Hình PL 3.2.2.1. Kết quả chồng phổ mẫu dương tính Paracetamol



Hình PL 3.1.2.2. Kết quả chồng phổ mẫu dương tính Paracetamol



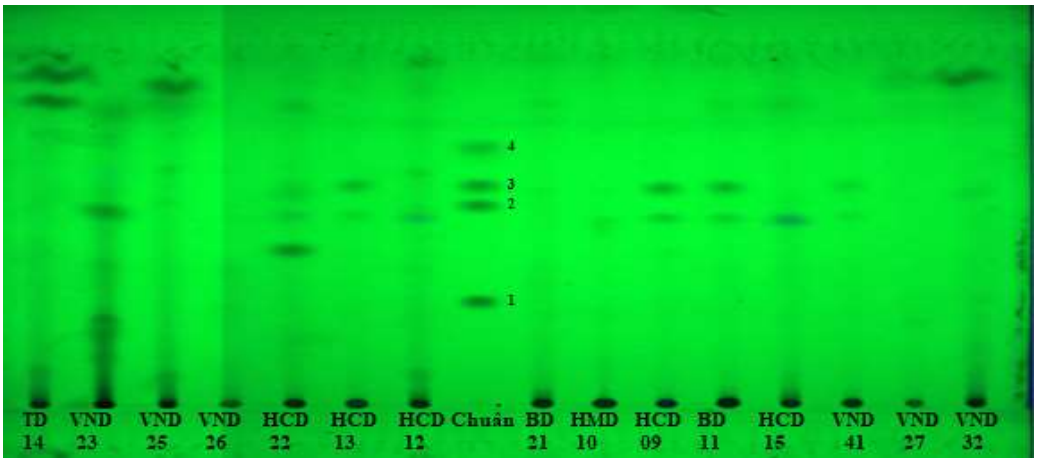
Hình PL 3.1.2.3.Kết quả chồng phổ mẫu dương tính indomethacin



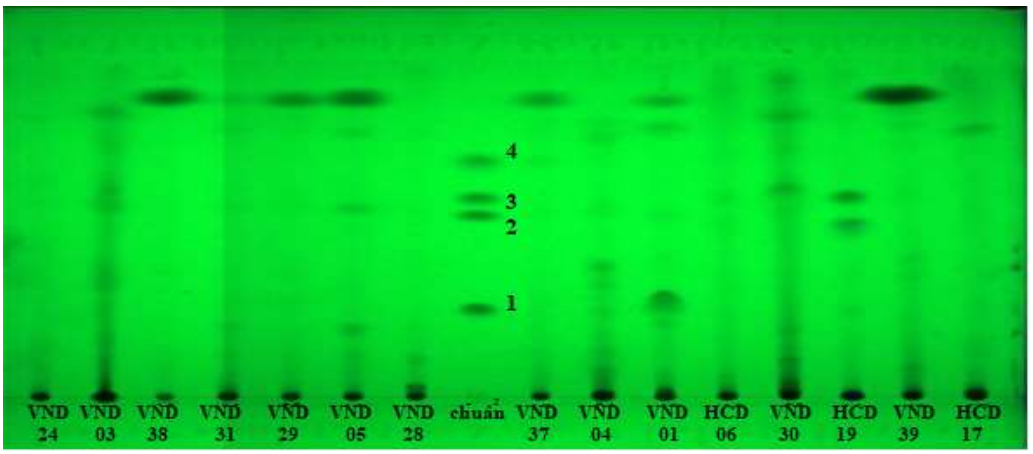
Hình PL 3.1.3.4.Kết quả chồng phổ mẫu dương tính giả Paracetamol và Indomethacin

PHỤ LỤC 3.3. KHẢO SÁT NHÓM GIẢM GLUCOSE MÁU

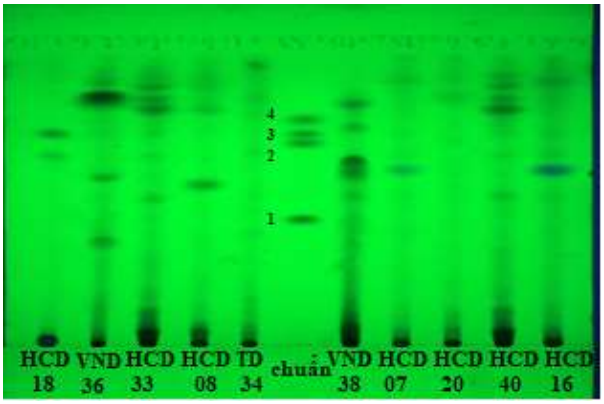
Phụ lục 3.3.1. Sắc ký đồ bản mỏng các mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường triển khai hệ dung môi n-butyl acetat- acid formic (100:0,5)



(a)



(b)

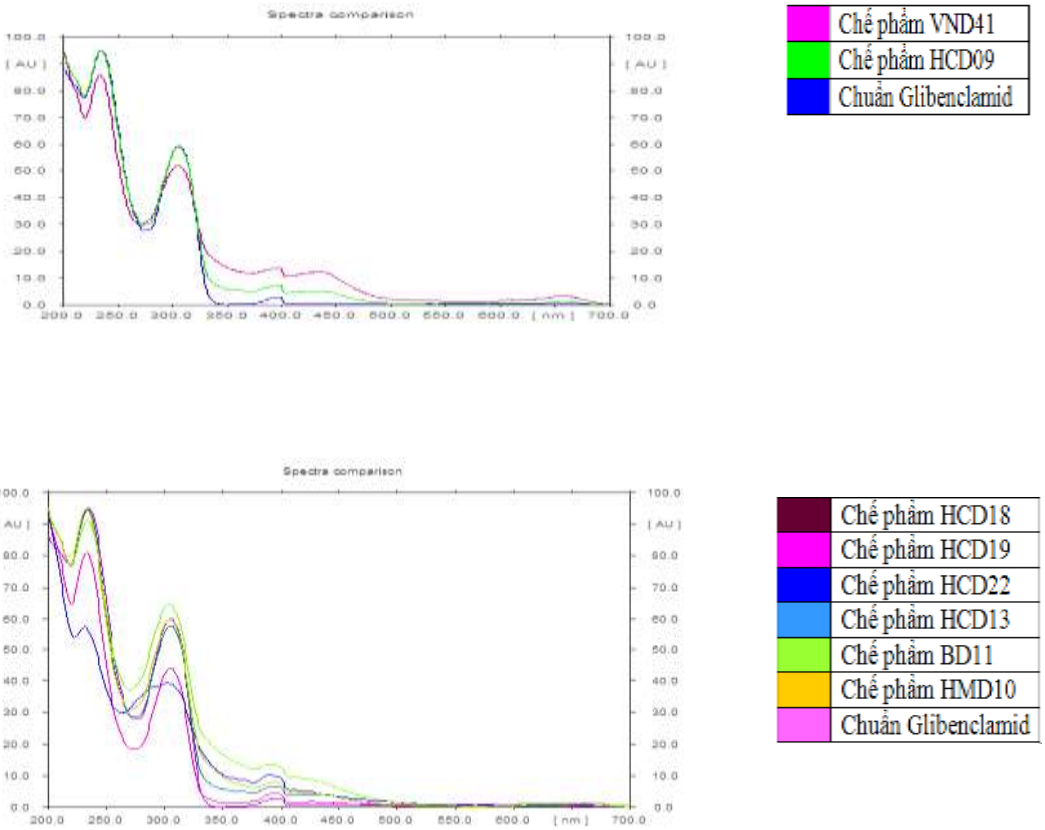


(c)

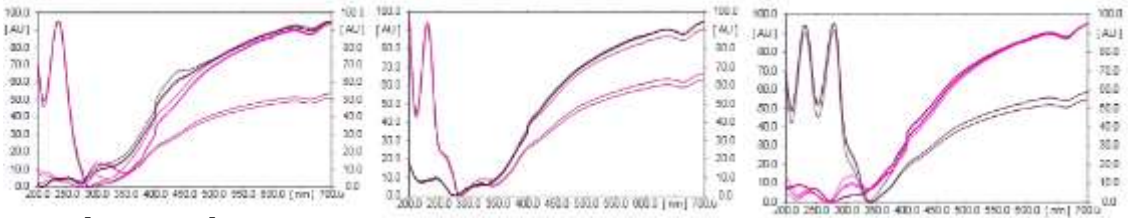
Hình PL 3.3. Sắc ký đồ phân tích các chế phẩm đông dược hỗ trợ bệnh đái tháo đường trên triển khai hệ dung môi (n butyl acetat chứa 0,5 % acid formic (95:5)

Kí hiệu: Chuẩn-Hỗn hợp chất chuẩn nhóm giảm glucose máu với vị trí chuẩn 1- glipizid, 2- glimepirid, 3-glibenclamid, 4-gliclazid

Phụ lục 3.3.2. Hình ảnh chồng phổ chuẩn giảm glucose máu và vết của mẫu thử hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường



Hình PL 3.3.2.1. Kết quả chồng phổ UV quét tại vị trí có Rf (vết glibenclamid) của các mẫu dương tính với glibenclamid



a - glimepirid b - gliclazid c - glipizid

Hình PL 3.3.2.2. Kết quả chồng phổ mẫu nghi ngờ

Phụ lục 3.3.3.Kết quả sắc ký đồ analog của một số mẫu hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường nghi ngờ có nhóm giảm glucose máu

winCATS Planar Chromatography Manager

Analysis Report

SOP document	
Validated	Design
Description :	
Analysis	D:\Data\Minh\Ket qua HPTLC\Tieu duong\ Duong tinh lan 2.cha
Created/used by	Dao Thi Cam Minh Thursday, June 13, 2018 9:18:53 PM
Current user	Dao Thi Cam Minh

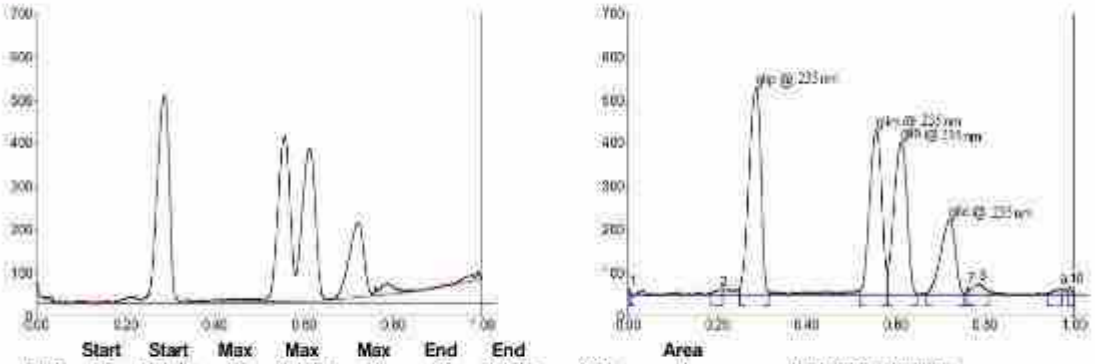
Detection - CAMAG TLC Scanner

Information	
Application position	10.0 mm
Solvent front position	85.0 mm
Instrument	CAMAG TLC Scanner "Scanner_220810" S/N 220810 (2.01.02)
Executed by	Nghien cuu thuc pham Friday, June 15, 2018 2:44:26 PM
Number of tracks	9
Position of first track X	20.0 mm
Distance between tracks	15.0 mm
Scan start pos. Y	10.0 mm
Scan end pos. Y	85.0 mm
Slit dimensions	4.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system	Light
Scanning speed:	20 mm/s
Data resolution:	100 µm/step
Measurement Table	
Wavelength	235
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	252 V

Integration

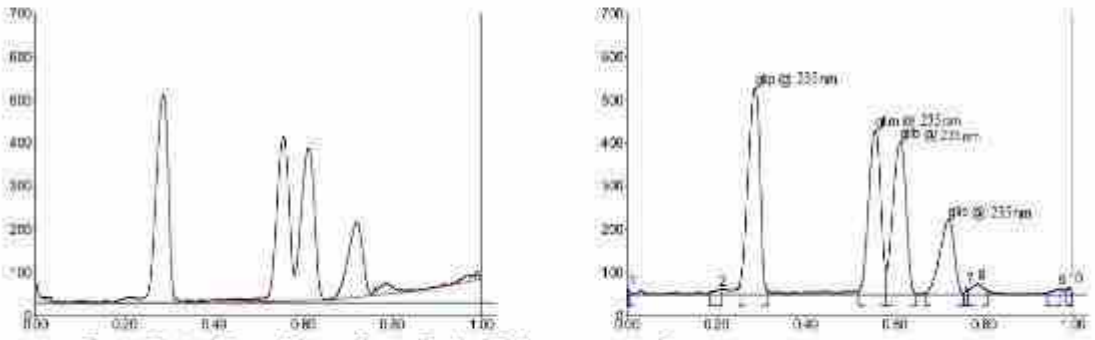
Properties	
Data filtering	Savitsky-Golay 7
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	5
Peak threshold min. height	10 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	10.0 mm
Track end position	85.0 mm
Display scaling	Automatic

Track 1, ID: Standard1



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	13.8	0.00	13.8	0.93	0.01	0.2	56.2	0.07	unknown *
2	0.19	4.9	0.21	12.7	0.85	0.21	10.9	409.9	0.53	unknown *
3	0.25	16.4	0.29	479.4	32.17	0.32	6.3	24555.3	31.54	glip
4	0.52	8.5	0.56	380.1	25.51	0.58	59.4	19820.3	25.46	glim
5	0.58	59.4	0.60	352.8	23.68	0.65	0.5	19921.1	25.59	glib
6	0.67	3.1	0.72	173.9	11.67	0.75	1.5	10936.9	14.05	glic
7	0.76	3.9	0.76	19.1	1.28	0.76	9.2	154.7	0.20	unknown *
8	0.77	9.7	0.79	25.7	1.73	0.81	8.1	1300.4	1.67	unknown *
9	0.94	3.3	0.97	13.2	0.89	0.97	11.4	453.5	0.58	unknown *
10	0.99	7.7	0.99	19.3	1.29	1.00	0.2	237.6	0.31	unknown *

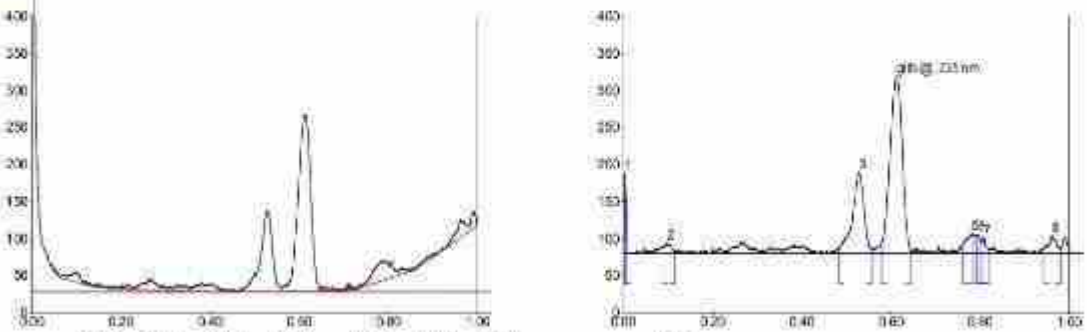
Track 2, ID: Standard 2



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	13.8	0.00	13.8	0.93	0.01	0.2	56.2	0.07	unknown *
2	0.19	4.9	0.21	12.7	0.85	0.21	10.9	409.9	0.53	unknown *
3	0.25	16.4	0.29	479.4	32.17	0.32	6.3	24555.3	31.54	glip
4	0.52	8.5	0.56	380.1	25.51	0.58	59.4	19820.3	25.46	glim
5	0.58	59.4	0.60	352.8	23.68	0.65	0.5	19921.1	25.59	glib
6	0.67	3.1	0.72	173.9	11.67	0.75	1.5	10936.9	14.05	glic
7	0.76	3.9	0.76	19.1	1.28	0.76	9.2	154.7	0.20	unknown *
8	0.77	9.7	0.79	25.7	1.73	0.81	8.1	1300.4	1.67	unknown *
9	0.94	3.3	0.97	13.2	0.89	0.97	11.4	453.5	0.58	unknown *
10	0.99	7.7	0.99	19.3	1.29	1.00	0.2	237.6	0.31	unknown *

winCATS Planar Chromatography Manager

Track 8, ID: HCD09



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	107.7	0.00	107.7	18.98	0.01	5.8	669.5	3.11	unknown *
2	0.09	6.4	0.10	13.6	2.40	0.12	2.9	440.2	2.04	unknown *
3	0.48	5.7	0.53	109.5	19.30	0.56	4.7	5416.6	25.15	unknown *
4	0.58	12.8	0.60	238.5	42.05	0.65	3.3	12594.5	58.48	glib
5	0.76	10.2	0.78	27.1	4.77	0.79	24.1	885.4	4.11	unknown *
6	0.80	23.3	0.80	25.1	4.43	0.80	14.4	327.5	1.52	unknown *
7	0.80	14.8	0.81	21.4	3.76	0.82	4.7	353.0	1.64	unknown *
8	0.94	6.2	0.96	24.3	4.29	0.98	5.6	850.9	3.95	unknown *

Spectrum scan

Executed by	Friday, June 15, 2018 2:52:20 PM
Mode	All detected peaks
Slit dimensions	6.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system	Resolution
Scanning speed	100 nm/s
Data resolution	1 nm/step
Reference spectrum, pos X	10.0 mm
Reference spectrum, pos Y	10.0 mm
Purity scan, relative level	85 %

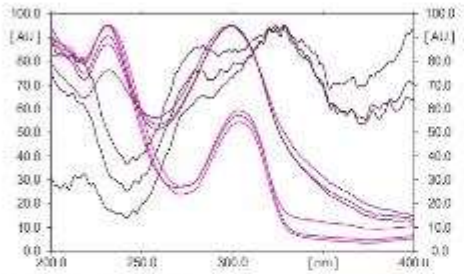
Measurement Table

Lamp	D2 & W
Start wavelength	200 nm
End wavelength	400 nm
Measurement type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector Mode	Automatic

Detector properties

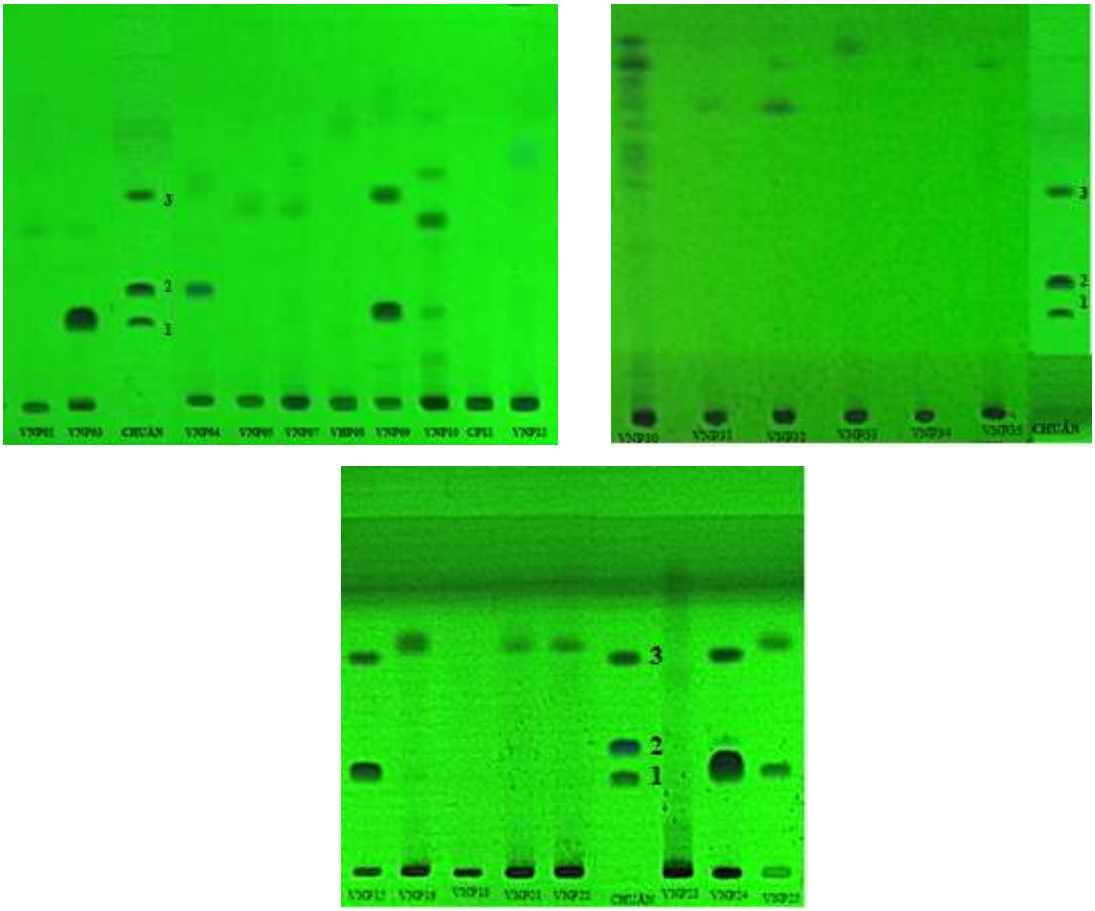
Y-position for 0 adjust	0.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (26)

GLIB on all Tracks



T	Rf	Substance	Max. @	r s,m	r m,e	Purity	r s,s	r s,a	Identity
1	0.60 Rf	GLIB	233 nm	0.999345	0.996816	ok	0.999965	0.999676	N/A
2	0.60 Rf	GLIB	233 nm	0.999118	0.999711	ok	0.999128	0.999961	N/A
8	0.60 Rf	GLIB	232 nm	0.997624	0.992042	ok	0.992012	0.997624	ok

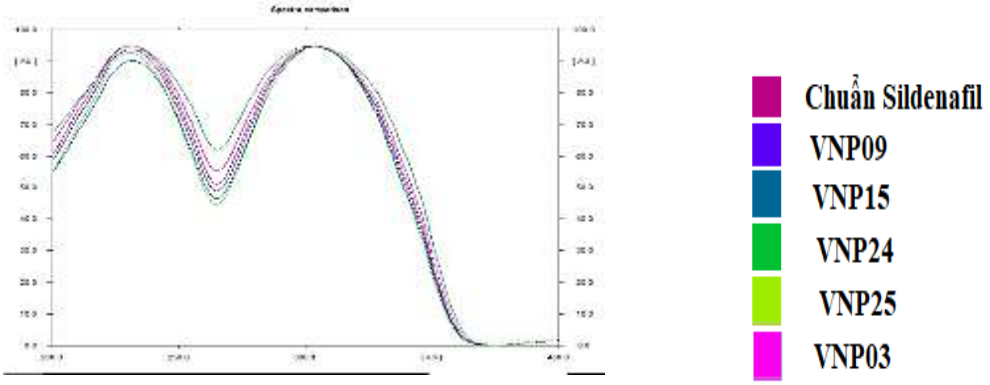
Phụ lục 3.4. Sắc ký đồ bản mỏng các mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương triển khai hệ dung môi Ethyl acetat - isopropanol - amoniac (45: 5: 2,6)



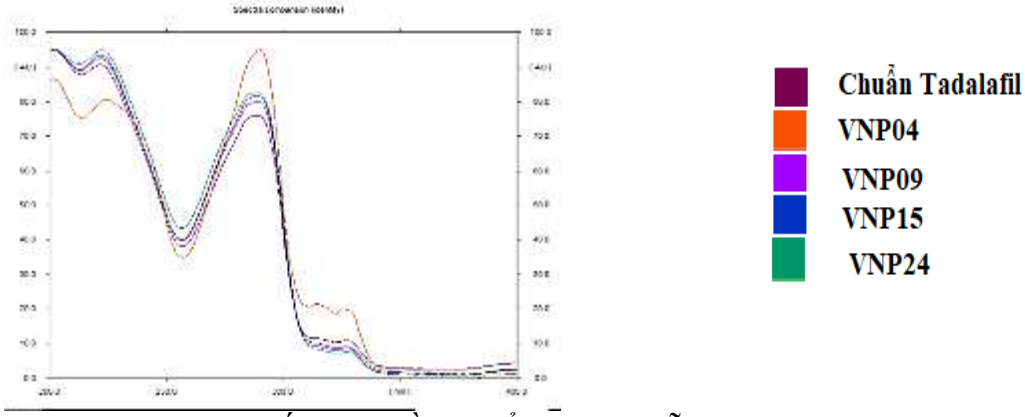
Hình PL 3.4. Sắc ký đồ các chế phẩm đông dược hỗ trợ điều trị bệnh lý suy sinh dục, tăng cường sinh lực trên hệ dung môi Ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45: 5: 2,6)

Kí hiệu: CHUẨN- Hỗn hợp chất chuẩn nhóm ức chế PDE-5 với vị trí chuẩn 1-sildenafil, 2-vardenafil, 3-tadalafil

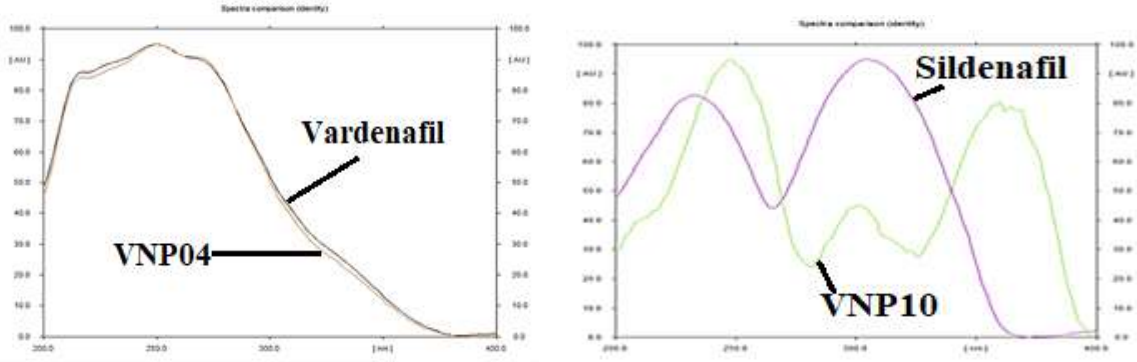
Phụ lục 3.4.1 Hình ảnh chồng phổ chuẩn nhóm ức chế PDE-5 và vết của mẫu thử hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương



Hình PL 3.4.1.1 Kết quả chồng phổ mẫu dương tính sildenafil



Hình PL 3.4.1.2.Kết quả chồng phổ UV các mẫu dương tính với tadalafil



Hình PL 3.4.1.3. Kết quả chồng phổ UV các mẫu dương tính với vardenafil, mẫu âm tính với sildenafil

Phụ lục 3.4.2.Kết quả sắc ký đồ analog của một số mẫu hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương nghi ngờ có nhóm ức chế PDE-5

winCATS Planar Chromatography Manager

Analysis Report

Method	D:\Minh\Ket qua HPTLC\PDE-5\duong chuan + mau duong tinh lan 2.cma
Created by	Bo mon Hoa phan tich Thursday, January 25, 2018 1:24:42 PM
Last modified by	Bo mon Hoa phan tich Thursday, January 25, 2018 2:29:22 PM
SOP document	
Validated	Design
Description :	Last saved using Version: WinCATS 1.4.9 by Bo mon Hoa phan tich at 1/25/2018 2:29:22 PM Last saved using Version: WinCATS 1.4.9 by Bo mon Hoa phan tich at 1/24/2018 1:48:02 PM Last saved using Version: WinCATS 1.4.9 by Bo mon Hoa phan tich at 1/23/2018 4:33:56 PM Last saved using Version: WinCATS 1.4.9 by Bo mon Hoa phan tich at 1/23/2018 11:44:55 AM Last saved using Version: WinCATS 1.4.9 by Bo mon Hoa phan tich at 1/23/2018 10:19:58 AM
Analysis	D:\Data\Minh\Ket qua HPTLC\PDE-5\duong chuan + mau duong tinh lan 2.cna
Created/used by	Dao Thi Cam Minh Friday, June 14, 2018 2:50:12 PM
Current user	Dao Thi Cam Minh

Detection - CAMAG TLC Scanner

Information

Application position	10.0 mm
Solvent front position	81.3 mm

Instrument

	CAMAG TLC Scanner "Scanner_210984" S/N 210984 (2.01.02)
Executed by	Dao Thi Cam Minh Friday, June 14, 2018 2:50:05 PM
Number of tracks	16
Position of first track X	15.0 mm
Distance between tracks	11.3 mm
Scan start pos. Y	10.0 mm
Scan end pos. Y	81.0 mm
Slit dimensions	4.00 x 0.30 mm, Micro
Optimize optical system	Light
Scanning speed:	20 mm/s
Data resolution	100 µm/step

Integration

Properties

Data filtering	Savitzky-Golay 17
Baseline correction	Lowest Slope
Peak threshold min. slope	2
Peak threshold min. height	34 AU
Peak threshold min. area	50
Peak threshold max. height	990 AU
Track start position	10.0 mm
Track end position	81.0 mm
Display scaling	Automatic

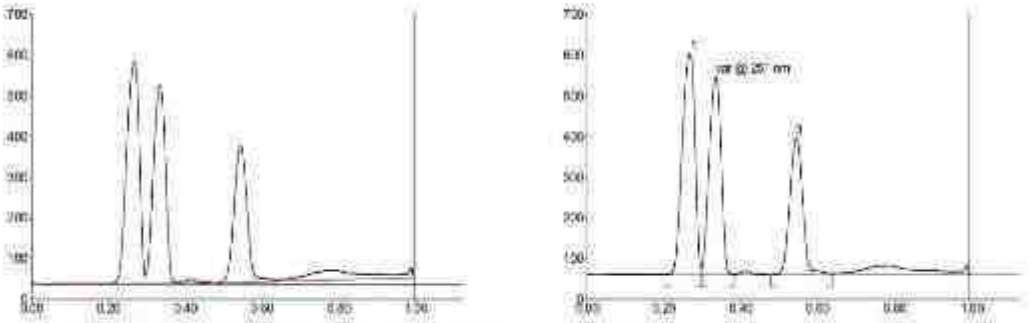
Measurement Table

Wavelength	251
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	350 V

Detector properties

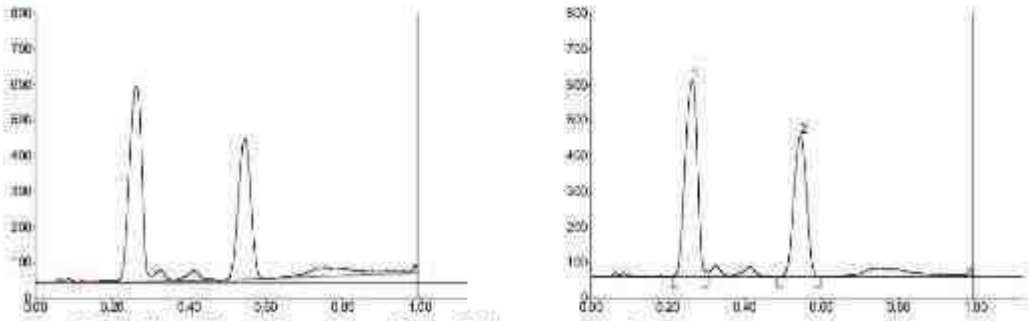
Y-position for 0 adjust	10.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (30)

Track 4, ID: Standard4



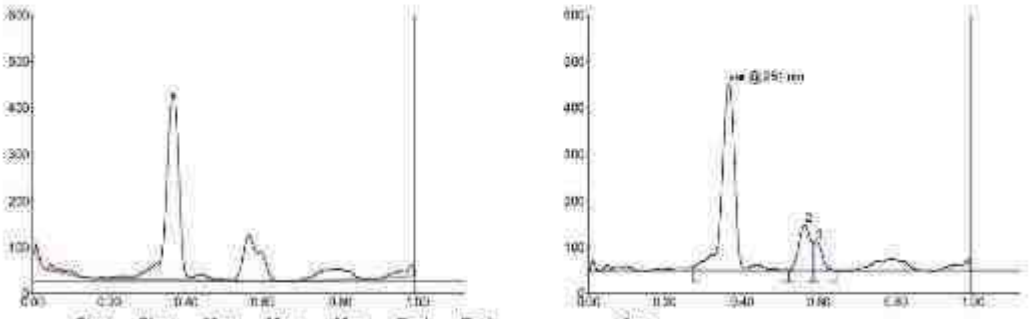
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.20	0.2	0.22	544.7	39.80	0.30	18.4	14861.3	40.43	unknown *
2	0.30	21.5	0.35	487.3	35.61	0.38	1.6	10540.6	34.12	var
3	0.48	0.0	0.56	336.7	24.60	0.64	3.9	9354.3	25.45	unknown *

Track 9, ID: VNP09



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.21	2.9	0.26	560.6	58.23	0.38	14.6	14498.1	57.66	unknown *
2	0.49	0.1	0.55	395.0	41.77	0.60	0.1	10647.4	42.34	unknown *

Track 16, ID:VNP04



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1m	0.27	5.9	0.35	402.3	71.41	0.52	0.8	11395.9	75.89	var
2	0.52	0.3	0.56	98.3	17.45	0.59	60.8	2512.8	16.73	unknown *
3	0.59	60.9	0.59	52.7	11.14	0.65	0.0	1108.0	7.38	unknown *

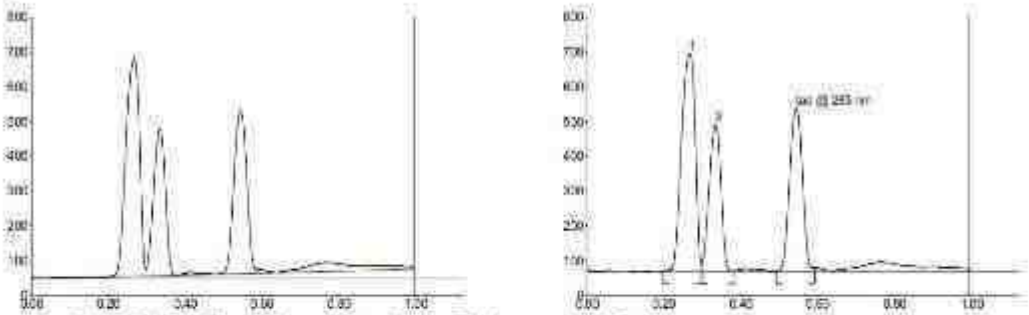
Measurement Table

Wavelength	285
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	350 V

Detector properties

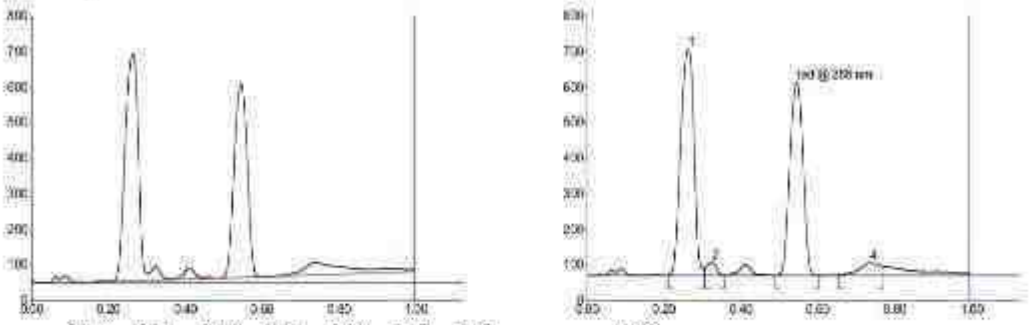
Y-position for 0 adjust	5.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (30)

Track 4, ID: Standard4



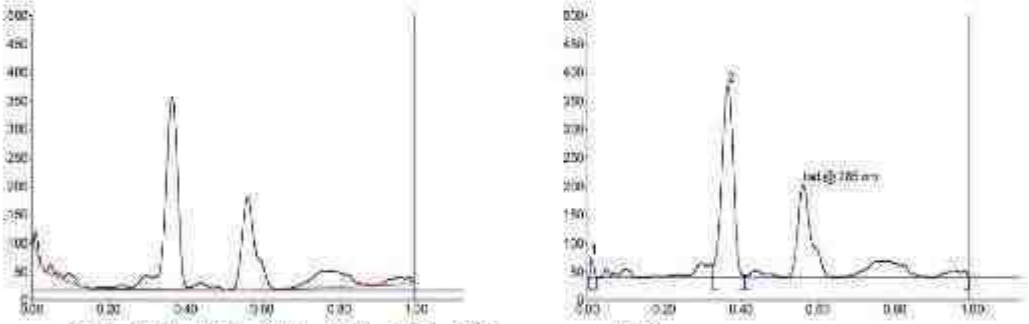
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.20	0.1	0.22	625.3	41.29	0.30	19.6	18329.4	43.88	unknown *
2	0.30	19.6	0.35	420.8	27.79	0.38	0.7	10621.3	25.43	unknown *
3	0.49	0.4	0.56	468.4	30.93	0.59	9.1	11219.2	30.69	tad

Track 9, ID: VNP09



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.21	1.1	0.26	636.3	50.82	0.31	19.3	18053.8	50.56	unknown *
2	0.31	19.6	0.32	38.0	3.03	0.36	1.0	734.6	2.06	unknown *
3	0.49	0.0	0.56	542.5	43.33	0.60	0.0	15288.5	42.82	tad
4	0.65	1.5	0.74	35.2	2.81	0.77	25.0	1627.3	4.56	unknown *

Track 16, ID: VNP04



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00	0.0	0.01	35.4	6.61	0.02	0.7	237.9	1.41	unknown *
2	0.33	22.1	0.37	337.8	63.03	0.41	4.0	8391.0	49.76	unknown *
3m	0.41	4.0	0.56	162.7	30.36	0.99	1.3	8233.7	48.83	tad

Measurement Table

Wavelength	304
Lamp	D2 & W
Measurement Type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector mode	Automatic
PM high voltage	350 V

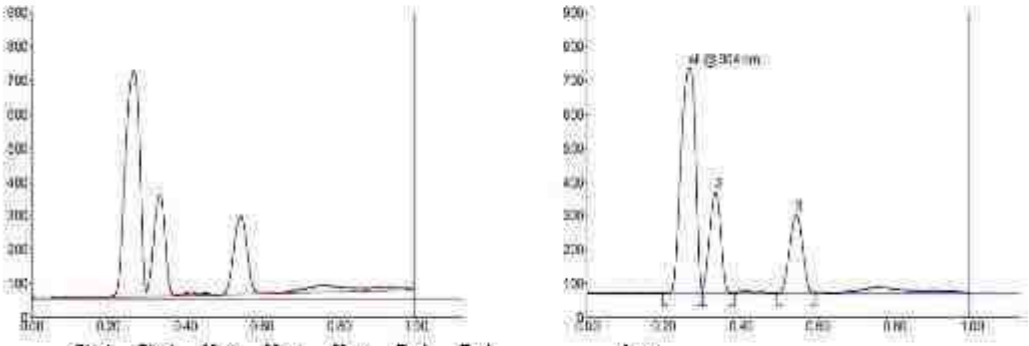
Detector properties

Y-position for 0 adjust	5.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (30)

User : Dao Thi Cam Minh
Friday, June 14, 2018 2:50:22 PM

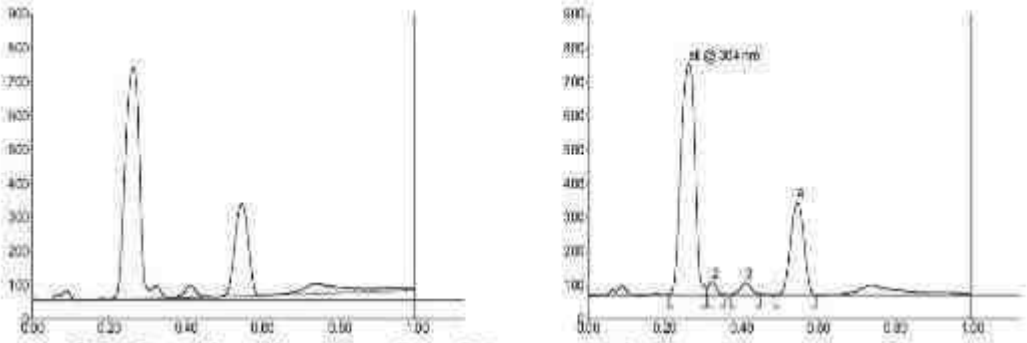
Approved : .....
Report ID : 07E3001003072C32

Track 4, ID: Standard4



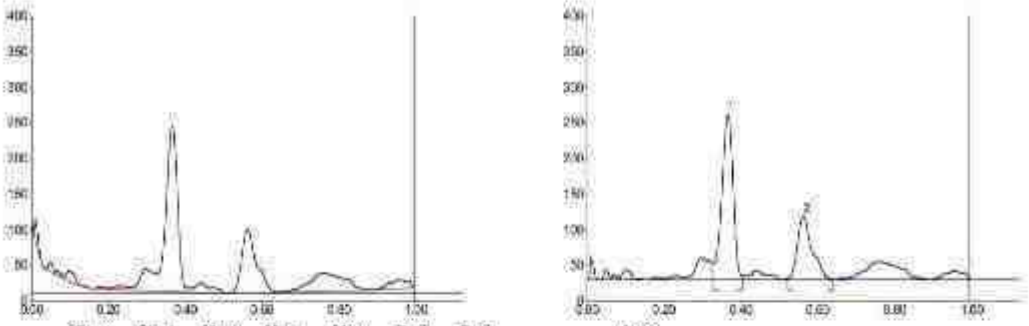
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.20	0.7	0.22	668.4	55.57	0.30	16.0	23859.7	59.71	sil
2	0.30	16.2	0.35	301.5	25.06	0.38	1.4	7278.2	21.13	unknown *
3	0.50	0.7	0.56	232.9	19.37	0.59	4.1	6603.1	19.17	unknown *

Track 9, ID: VNP09



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.21	2.6	0.22	685.2	66.14	0.31	23.6	20564.1	68.31	sil
2	0.31	23.7	0.32	38.8	3.74	0.36	2.5	717.1	2.38	unknown *
3	0.37	1.4	0.41	37.8	3.65	0.45	2.5	920.2	3.06	unknown *
4	0.48	0.0	0.55	274.2	26.47	0.59	0.7	7901.0	26.25	unknown *

Track 16, ID: VNP04



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.33	23.3	0.37	231.6	72.20	0.40	5.4	5602.5	66.45	unknown *
2	0.52	0.9	0.56	89.2	27.80	0.64	0.4	2828.9	33.55	unknown *

Spectrum scan

Executed by	Bo mon Hoa phan tich	Friday, January 26, 2018 1:28:49 PM
Mode	All detected peaks	
Slit dimensions	6.00 x 0.30 mm, Micro	
Optimize optical system	Resolution	
Scanning speed	100 nm/s	
Data resolution	1 nm/step	
Reference spectrum, pos X	10.0 mm	
Reference spectrum, pos Y	10.0 mm	
Purity scan, relative level	85 %	

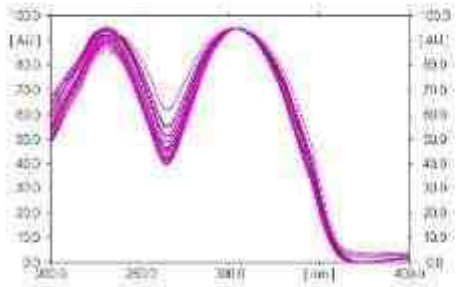
Measurement Table

Lamp	D2 & W
Start wavelength	200 nm
End wavelength	400 nm
Measurement type	Remission
Measurement Mode	Absorption
Optical filter	Second order
Detector Mode	Automatic

Detector properties

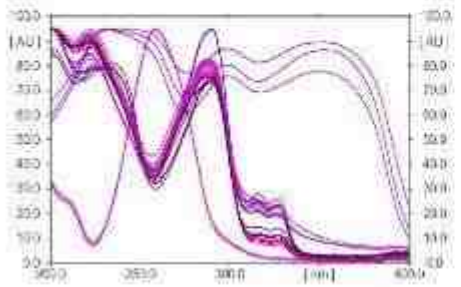
Y-position for 0 adjust	0.0 mm
Track # for 0 adjust	0
Analog Offset	10%
Sensitivity	Automatic (28)

sil on all Tracks



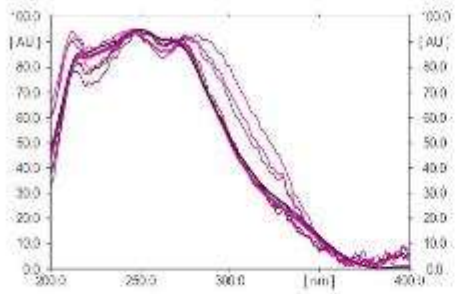
T	Rf	Substance	Max. @	r s,m	r m,e	Purity	r s,s	r s,a	Identity
4	0.22	Rf sil	304 nm	0.997953	0.994652	ok	0.997953	0.994650	N/A
9	0.22	Rf sil	304 nm	0.998103	0.995928	ok	0.998603	0.995924	ok

tad on all Tracks



T	Rf	Substance	Max. @	r s,m	r m,e	Purity	r s,s	r s,a	Identity
4	0.56	Rf tad	202 nm	0.999422	0.998872	ok	0.999912	0.998862	N/A
9	0.56	Rf tad	202 nm	0.999835	0.998851	ok	0.999825	0.998841	ok
16	0.56	Rf tad	202 nm	0.999781	0.998181	ok	0.999780	0.998171	ok

var on all Tracks



T	Rf	Substance	Max. @	r s,m	r m,e	Purity	r s,s	r s,a	Identity
4	0.35	Rf var	251 nm	0.999961	0.999545	ok	0.999960	0.999541	N/A
9	0.35	Rf var	251 nm	0.993625	0.991680	ok	0.993615	0.991670	ok
16	0.35	Rf var	251 nm	0.999936	0.999936	ok	0.999926	0.999926	ok

PHỤ LỤC 4. HÌNH ẢNH CÁC MẪU DƯƠNG TÍNH

BN01	BN51	HCH175	HCH176	BNC101
VNN156	HC008	HCH141	HC0H92	VNN162
BNH091	HCD19	HCD22	HCD09	VND41
HCD10	BD11	HCH13	HCD18	VNP03
VNP04	VNP09	VNP15	VNP24	VND25

Hình PL4. Hình ảnh của 25 mẫu dương tính với các tân dược nghiên cứu

PHỤ LỤC 5. QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH MỘT SỐ TÂN DƯỢC TRỘN TRÁI PHÉP TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC

Phụ lục 5.1
QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM GIẢM ĐAU, CHỐNG VIÊM BẰNG LC-MS/MS

1. Nguyên lý

9 dược chất nhóm giảm đau chống viêm (prednison, hydrocortison acetat, prednisolon dexamethason acetat, betamethasone, paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,22 μm và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LC-MS/MS).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS

4.1.2. Cột sắc ký Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 μm) và cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 μm) hoặc tương đương

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Máy lắc vortex

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 μL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,22 μm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn dexamethason acetat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn betamethason (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn hydrocortison acetat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.4. Chuẩn prednisolon (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.5. Chuẩn prednison (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.6. Chuẩn paracetamol (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.7. Chuẩn piroxicam (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.8. Chuẩn indomethacin (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.9 Chuẩn ketoprofen (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.10. Methanol loại HPLC (Merck hoặc tương đương)

5.1.11. Acid formic loại HPLC (Merck hoặc tương đương)

5.1.12. Acetonitril loại LC-MS (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 22,0 mg piroxicam (5.1.7) cho vào bình định mức 25 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.10) đến vạch, lắc cho tan hết. Lấy chính xác 5 mL dung dịch này cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), sau đó thêm chính xác khoảng 13,1 mg mỗi chuẩn dexamethason acetat (5.1.1), chuẩn betamethason (5.1.2) và mỗi 43,7 mg mỗi chuẩn hydrocortison acetat (5.1.3), predniolon (5.1.4), prednison (5.1.5), paracetamol (5.1.6), indomethacin (5.1.8), và chuẩn ketoprofen (5.1.9) cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.10) đến vạch, lắc đều cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất dexamethason acetat và betamethason 0,265 mg/mL; nồng độ hydrocortison acetat, prednisolon, prednison, paracetamol, indomethacin và ketoprofen 0,875 mg/mL; nồng độ piroxicam 0,088 mg/ml. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị đường chuẩn

Pha dãy chuẩn hỗn hợp làm việc trong khoảng từ 5,0 – 175 ng/mL từ dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc bằng methanol (5.1.10) theo bảng sau. Pha mới khi sử dụng.

Hoạt chất	Nồng độ (ng/ml)						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Dexamethason acetat	7,5	15	22,5	30	37,5	45	52,5
Betamethason	7,5	15	22,5	30	37,5	45	52,5
Hydrocortison acetat	25	50	75	100	125	150	175
Prednisolon	25	50	75	100	125	150	175
Prednison	25	50	75	100	125	150	175
Paracetamol	25	50	75	100	125	150	175
Piroxicam	5	10	15	20	25	30	35
Indomethacin	25	50	75	100	125	150	175
Ketoprofen	25	50	75	100	125	150	175

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.10), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (4.1.4), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly tâm 6000 vòng/ phút trong 10 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Pha loãng lớp dịch trong phía trên 50 lần bằng methanol (5.1.10). Lọc qua màng lọc 0,22 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi chạy máy. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Mẫu kiểm tra (thu hồi, QC)

Thêm một lượng chính xác 500 µL dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc vào mẫu thử đã cân chính xác, lắc đều. Thêm chính xác 25 mL methanol (5.1.10) và tiến hành tương tự như chuẩn bị mẫu thử. Nồng độ thêm chuẩn trên dịch chiết của mỗi chất dexamethason acetat và betamethason 26,2 ng/mL; nồng độ hydrocortison acetat,

prednisolon, prednison, paracetamol, indomethacin và ketoprofen 87,5 ng/mL; nồng độ piroxicam 17,5 ng/mL.

6.5. Điều kiện phân tích

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ)
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ)
- Nhiệt độ buồng cột: 40^{o}C
- Thể tích tiêm mẫu: 2 µl
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Thời gian phân tích: 12 phút
- Pha động: Pha động A: HCOOH 0,1%/H_2O
  Pha động B: HCOOH 0,1%/ACN
- Chương trình pha động: chế độ gradient

Thời gian (Phút)	%A	%B
0–7	70→30	30→70
7–8,5	30→70	70→30
8,5–12	70	30

Điều kiện khối phổ: (Đối với thiết bị sắc ký lỏng khối phổ Brucker Evog Qube, Mỹ).

Điện áp đầu phun: 3500 V — Khí chắn: 20 psi
Nhiệt độ nón: 250°C — Khí ion hóa 1: 40 psi
Nhiệt độ ion hóa: 250°C — Khí ion hóa 2: 45 psi
CID gas: Ar 1,5 mTorr

Điều kiện MS

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Ứng dụng	CE (eV)
Dexamethason acetat	435,2	**337,1**	Định lượng	9
		397,1	Định tính	6
Betamethason	393,2	**373,1**	Định lượng	5
		355,1	Định tính	8
Hydrocortison acetat	405,2	**327,1**	Định lượng	13
		241,1	Định tính	18
Prednisolon	361,2	**343,1**	Định lượng	6
		173,0	Định tính	20
Prednison	359,2	**341,1**	Định lượng	7
		313,1	Định tính	8

Paracetamol	152,1	**110,1**	Định lượng	13
		93,2	Định tính	20
Piroxicam	332,1	**95,2**	Định lượng	15
		121,1	Định tính	19
Ketoprofen	255,1	**209,0**	Định lượng	10
		105,1	Định tính	19
Indomethacin	358,1	**139,0**	Định lượng	16
		111,1	Định tính	42

Có thể tối ưu điều kiện khối phổ theo hướng dẫn của thiết bị nếu cần.

6.6. Tiến hành sắc ký:

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn C4. Xác định thời gian lưu và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của thời gian lưu ≤ 2,0%; RSD của diện tích pic ≤ 5,0%

Sắc ký các dung dịch chuẩn C1 → C7.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

7.1. Định tính:

So sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỷ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của mẫu thử so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) hoặc nghi ngờ (fail) sự có mặt của các chất phân tích trong mẫu thử.

7.2. Định lượng:

- Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích tương ứng dựa vào kết quả phân tích các mẫu chuẩn. Yêu cầu: r≥ 0,99.

- Tính nồng độ các chất phân tích nếu có trong mẫu thực dựa vào phương trình hồi quy tương ứng của các chất phân tích được thiết lập trong ngày. Từ nồng độ các chất phân tích (nếu có) trong dịch chiết mẫu thử, tính hàm lượng chất phân tích trong mẫu thực ban đầu dựa vào khối lượng cân và hệ số pha loãng sau quá trình xử lý mẫu.

8. Kiểm soát chất lượng

Độ thu hồi của kiểm tra phải đạt 80 – 110%.

Phụ lục 5.2
QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM HẠ GLUCOSE MÁU BẰNG LC-MS/MS

1. Nguyên lý

4 dược chất nhóm giảm glucose máu (glipizid, glimepizid, glibenclamid, gliclazid) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,22 μm và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LC-MS/MS).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS

4.1.2. Cột sắc ký Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 μm) và cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 μm) hoặc tương đương

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Máy lắc vortex

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 μL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,22 μm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn glipizid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn glimepizid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn glibenclamid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.4. Chuẩn gliclazid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.5. Acetonitril loại LC-MS (Merck hoặc tương đương)

5.1.6. Methanol loại HPLC (Merck hoặc tương đương)

5.1.7. Acid formic loại HPLC (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 21,9 mg mỗi chuẩn glipizid (5.1.1), chuẩn glimepizid (5.1.3), chuẩn glibencamid (5.1.4) cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc cho tan hết. Lấy chính xác 5 mL dung dịch này cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), sau đó thêm chính xác khoảng 17,5 mg chuẩn gliclazid (5.1.2) vào bình định mức 50 mL trên (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất glipizid, glimepizid, glibencamid 0,044 mg/mL; nồng độ gliclazid 0,35 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị đường chuẩn

Pha dãy chuẩn hỗn hợp làm việc trong khoảng từ 5 – 280 ng/mL từ dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc bằng methanol (5.1.6) theo bảng sau. Pha mới khi sử dụng.

Hoạt chất	**Nồng độ** (ng/ml)						
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**
Glipizid	5	10	15	20	25	30	35
Glimepizid	5	10	15	20	25	30	35
Glibenclamid	5	10	15	20	25	30	35
Gliclazid	40	80	120	160	200	240	280

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều

vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.6), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (4.1.4), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly tâm 6000 vòng/ phút trong 10 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Pha loãng lớp dịch trong phía trên 50 lần bằng methanol (5.1.6). Lọc qua màng lọc 0,22 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi chạy máy. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Mẫu kiểm tra (thu hồi, QC)

Thêm một lượng chính xác 500 µL dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc vào mẫu thử đã cân chính xác, lắc đều. Thêm chính xác 25 mL methanol (5.1.6) và tiến hành tương tự như chuẩn bị mẫu thử. Nồng độ thêm chuẩn trên dịch chiết của mỗi chất glipizid, glimepizid, glibencamid 14 ng/mL; nồng độ gliclazid 112 ng/mL.

6.5. Điều kiện phân tích

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ)
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ)
- Nhiệt độ buồng cột: 40^{o}C
- Thể tích tiêm mẫu: 2 µl
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Thời gian phân tích: 12 phút
- Pha động: Pha động A: HCOOH 0,1%/H_2O

  Pha động B: HCOOH 0,1%/ACN
- Chương trình pha động: chế độ gradient

Thời gian (Phút)	%A	%B
0–7	70→30	30→70
7–8,5	30→70	70→30
8,5–12	70	30

Điều kiện khối phổ: (Đối với thiết bị sắc ký lỏng khối phổ Brucker Evog Qube, Mỹ).

Điện áp đầu phun: 3500 V	Khí chắn: 20 psi
Nhiệt độ nón: 250°C	Khí ion hóa 1: 40 psi
Nhiệt độ ion hóa: 250°C	Khí ion hóa 2: 45 psi
CID gas: Ar 1,5 mTorr	

Điều kiện MS

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Sử dụng	CE (eV)
Glibenclamid	494,1	**368,9**	Định lượng	9
		169,0	Định tính	28
Gliclazid	324,1	**127,2**	Định lượng	14
		110,2	Định tính	19
Glimepizid	491,1	**352,0**	Định lượng	10
		126,2	Định tính	25
Glipizid	446,2	**321,0**	Định lượng	20
		167,0	Định tính	25

Có thể tối ưu điều kiện khối phổ theo hướng dẫn của thiết bị nếu cần.

6.6. Tiến hành sắc ký:

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn C4. Xác định thời gian lưu và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của thời gian lưu ≤ 2,0%; RSD của diện tích pic ≤ 5,0%

Sắc ký các dung dịch chuẩn C1 → C7.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

7.1. Định tính:

So sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỷ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của mẫu thử so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) hoặc nghi ngờ (fail) sự có mặt của các chất phân tích trong mẫu thử.

7.2. Định lượng:

- Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích tương ứng dựa vào kết quả phân tích các mẫu chuẩn. Yêu cầu: r≥ 0,99.

- Tính nồng độ các chất phân tích nếu có trong mẫu thực dựa vào phương trình hồi quy tương ứng của các chất phân tích được thiết lập trong ngày. Từ nồng độ các chất phân tích (nếu có) trong dịch chiết mẫu thử, tính hàm lượng chất phân tích trong mẫu thực ban đầu dựa vào khối lượng cân và hệ số pha loãng sau quá trình xử lý mẫu.

8. Kiểm soát chất lượng

Độ thu hồi của mẫu kiểm tra đối với gliclazid phải đạt 90– 107%; đối với glipizid, glimepirid, glibenclamid phải đạt 80-110%.

Phụ lục 5.3
QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM ỨC CHẾ PDE-5 BẰNG LC-MS/MS

1. Nguyên lý

3 dược chất nhóm ức chế PDE -5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,22 μm và phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LC-MS/MS).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn, dạng cao.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS

4.1.2. Cột sắc ký Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 μm) và cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 μm) hoặc tương đương

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Máy lắc vortex

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 μL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,22 μm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn sildenafil citrat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn tadalafil hydroclorid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn vardenafil hydroclorid (Hội đồng Dược điển châu Âu hoặc tương đương)

5.1.4. Acetonitril loại LC-MS (Merck hoặc tương đương)

5.1.5. Acid formic loại HPLC (Merck hoặc tương đương)

5.1.6. Methanol loại HPLC (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 27,3 mg mỗi chuẩn vardenafil hydroclorid (5.1.2), chuẩn tadalafil hydroclorid (5.1.3) cho vào bình định mức 25 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc cho tan hết. Lấy chính xác 5 mL dung dịch này cho vào bình định mức 25 mL (4.2.2), sau đó thêm chính xác khoảng 25,8 mg chuẩn sildenafil citrat (5.1.2) vào bình định mức 25 mL trên (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất vardenafil hydroclorid, tadalafil hydroclorid 0,218 mg/mL; nồng độ sildenafil citrat 1,03 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị đường chuẩn

Pha dãy chuẩn hỗn hợp làm việc trong khoảng từ 25 – 825 ng/mL từ dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc bằng methanol (5.1.6) theo bảng sau. Pha mới khi sử dụng.

Hoạt chất	**Nồng độ** (µg/ml)						
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**
Sildenafil citrat	125	250	375	500	625	750	825
Vardenafil hydroclorid	25	50	75	100	125	150	175
Tadalafil hydroclorid	25	50	75	100	125	150	175

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.6), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (4.1.4), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly tâm 6000 vòng/ phút trong 10 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Pha loãng lớp dịch trong phía trên 50 lần bằng methanol (5.1.6). Lọc qua màng lọc 0,22 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi chạy máy. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Mẫu kiểm tra (thu hồi, QC)

Thêm một lượng chính xác 500 µL dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc vào mẫu thử đã cân chính xác, lắc đều. Thêm chính xác 25 mL methanol (5.1.6) và tiến hành tương tự như chuẩn bị mẫu thử. Nồng độ thêm chuẩn trên dịch chiết của mỗi chất vardenafil hydroclorid, tadalafil hydroclorid 87,5 ng/mL; nồng độ sildenafil citrat 412,5 ng/mL.

6.5. Điều kiện phân tích

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Restek Ultra II C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ)
- Cột bảo vệ: Restek Ultra C18 Guard Cartridge (10 mm × 4 mm; 3 µm) (Mỹ)
- Nhiệt độ buồng cột: 40^{o}C
- Thể tích tiêm mẫu: 2 µl
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút
- Thời gian phân tích: 12 phút
- Pha động: Pha động A: HCOOH 0,1%/H_2O

Pha động B: HCOOH 0,1%/ACN

- Chương trình pha động: chế độ gradient

Thời gian (Phút)	**%A**	**%B**
0–7	70→30	30→70
7–8,5	30→70	70→30
8,5–12	70	30

Điều kiện khối phổ: (Đối với thiết bị sắc ký lỏng khối phổ Brucker Evog Qube, Mỹ).

Điện áp đầu phun: 3500 V Khí chắn: 20 psi

Nhiệt độ nón: 250°C Khí ion hóa 1: 40 psi

Nhiệt độ ion hóa: 250°C Khí ion hóa 2: 45 psi

CID gas: Ar 1,5 mTorr

Điều kiện MS

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Sử dụng	CE (eV)
Sildenafil	475,2	**100,3**	Định lượng	24
		283,0	Định tính	35
Vardenafil	489,2	**151,1**	Định lượng	40
		312,0	Định tính	37
Tadalafil	390,0	**268,0**	Định lượng	11
		169,0	Định tính	34

Có thể tối ưu điều kiện khối phổ theo hướng dẫn của thiết bị nếu cần.

6.6. Tiến hành sắc ký:

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn C4. Xác định thời gian lưu và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của thời gian lưu ≤ 2,0%; RSD của diện tích pic ≤ 5,0%

Sắc ký các dung dịch chuẩn C1 → C7.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

7.1. Định tính:

So sánh thời gian lưu, mảnh mẹ, hai mảnh con, tỷ lệ cường độ hai mảnh con định tính và định lượng của mẫu thử so với mẫu chuẩn để cho kết luận đúng (pass) hoặc nghi ngờ (fail) sự có mặt của các chất phân tích trong mẫu thử.

7.2. Định lượng:

- Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích tương ứng dựa vào kết quả phân tích các mẫu chuẩn. Yêu cầu: r≥ 0,99.

- Tính nồng độ các chất phân tích nếu có trong mẫu thực dựa vào phương trình hồi quy tương ứng của các chất phân tích được thiết lập trong ngày. Từ nồng độ các chất phân tích (nếu có) trong dịch chiết mẫu thử, tính hàm lượng chất phân tích trong mẫu thực ban đầu dựa vào khối lượng cân và hệ số pha loãng sau quá trình xử lý mẫu.

8. Kiểm soát chất lượng

Độ thu hồi của mẫu kiểm tra đối với sildenafil phải đạt 90– 107%; đối với tadalafil, vardenafil phải đạt 80-110%.

Phụ lục 5.4
QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM GIẢM ĐAU CHỐNG VIÊM STEROID BẰNG HPTLC

1. Nguyên lý

5 dược chất nhóm giảm đau chống viêm steroid (prednison, hydrocortison acetat, prednisolon, dexamethason acetat, betamethason) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,45 µm và phân tích trên hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Hệ thống máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) bao gồm: Bàn chấm mẫu; Bình khai triển tự động; máy scan bản mỏng TLC; Buồng soi UV 254 nm và 366 nm; Máy tính có cài đặt phần mềm để điều khiển toàn bộ hệ thống và xử lý dữ liệu.

4.1.2. Bản mỏng TLC, HPTLC 60 F_{254} (Merck, Đức)

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Thiết bị cô nitơ

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.1.7. Máy lắc vortex.

4.1.8. Tủ sấy

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 µL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,45 μm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn dexamethason acetat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn betamethason (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn hydrocortison acetat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.4. Chuẩn prednisolon (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.5. Chuẩn prednison (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.6. Methanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.7. Cloroform loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.8. Ethyl acetat loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.9. Ethanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 13,5 mg mỗi chuẩn dexamethason acetat (5.1.1), chuẩn betamethason (5.1.2) và mỗi 45 mg mỗi chuẩn hydrocortison acetat (5.1.3), predniolon (5.1.4) và prednison (5.1.5) cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất dexamethason acetat và betamethason 0,27 mg/mL; nồng độ hydrocortison acetat, prednisolon và prednison 0,90 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc

Pha chuẩn hỗn hợp làm việc có nồng độ mỗi chất dexamethason acetat và betamethason 0,135 mg/mL; nồng độ hydrocortison acetat, prednisolon và prednison 0,450 mg/mL bằng cách hút 5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (6.1) vào bình định mức 10 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều. Pha mới khi sử dụng.

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.6), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (5.1.7), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly

tâm 6000 vòng/ phút trong 10 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Lấy 2,00 ml lớp dịch trong phía trên, cô dưới luồng khí N_2 bằng thiết bị cô nitơ (4.1.4), hòa cắn trong 1,00 ml methanol (5.1.6). Lọc qua màng lọc 0,45 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi phân tích. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Điều kiện sắc ký:

- Bản mỏng: HPTLC Silicagel 60 F_{254}
- Pha động: Cloroform - ethyl acetat - ethanol (8,5:1:0,5)
- Thể tích mẫu: 5 µl
- Phát hiện:

  + Định tính: UV bước sóng 254 nm;

  + Định lượng: UV bước sóng 245 nm.

6.5. Tiến hành sắc ký:

Sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Xác định R_f và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của $R_f \leq 2,0\%$; RSD của diện tích pic ≤ 3,0%.

Sắc ký dung dịch chuẩn.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, so sánh R_f của vết trên sắc ký đồ mẫu thử với mẫu chuẩn làm song song. Nếu phát hiện vết có R_f trùng với R_f của chất chuẩn, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với phổ chất chuẩn xác đinh hệ số match để khẳng định kết quả (hệ số match > 0,99).

Thứ tự rửa giải các chất của dung dịch chuẩn prednisolon (R_f khoảng 0,25), betamethason (R_f khoảng 0,34), prednison (R_f khoảng 0,45), hydrocortison acetat (R_f khoảng 0,67), dexamethason acetat (R_f khoảng 0,72).

Phụ lục 5.5
QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM GIẢM ĐAU CHỐNG VIÊM KHÔNG STEROID BẰNG HPTLC

1. Nguyên lý

4 dược chất nhóm giảm đau chống viêm không steroid (paracetamol, piroxicam, indomethacin, và ketoprofen) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,45 µm và phân tích trên hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Hệ thống máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) bao gồm: Bàn chấm mẫu; Bình khai triển tự động; máy scan bản mỏng TLC; Buồng soi UV 254 nm và 366 nm; Máy tính có cài đặt phần mềm để điều khiển toàn bộ hệ thống và xử lý dữ liệu.

4.1.2. Bản mỏng TLC, HPTLC 60 F_{254} (Merck, Đức)

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Thiết bị cô nitơ

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.1.7. Máy lắc vortex.

4.1.8. Tủ sấy

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 µL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,45 µm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn paracetamol (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn piroxicam (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn indomethacin (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.4. Chuẩn ketoprofen (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.5. Ethanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.6. Methanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.7. Cloroform loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.8. Ethyl acetat loại PA (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6..1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 87,5 mg mỗi chuẩn paracetamol (5.1.1), chuẩn indomethacin (5.1.3), chuẩn ketoprofen (5.1.4) và 17,5 mg mỗi chuẩn piroxicam (5.1.2) cho vào bình định mức 100 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất paracetamol, indomethacin và ketoprofen 0,875 mg/mL; nồng độ piroxicam 0,175 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Pha chuẩn hỗn hợp làm việc có nồng độ paracetamol, indomethacin và ketoprofen 437,5 µg/mL; nồng độ piroxicam 87,5 µg/ bằng cách hút 5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (6.1) vào bình định mức 10 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều. Pha mới khi sử dụng.

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.6), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (5.1.7), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly

tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Lọc qua màng lọc 0,45 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi phân tích. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Điều kiện sắc ký:

- Bản mỏng: HPTLC Silicagel 60 F_{254}
- Pha động: n-hexan: ethyl acetat : acid acetic (6:2,5:1,5)
- Thể tích mẫu: 5 µl
- Phát hiện:

  + Định tính: UV bước sóng 254 nm;

  + Định lượng: UV bước sóng 247 nm với paracetamol, 282 nm với piroxicam, 271 nm với indomethacin, 255 nm với ketoprofen.

6.5. Tiến hành sắc ký:

Sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Xác định R_f và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của $R_f \leq 2,0\%$; RSD của diện tích pic ≤ 3,0%

Sắc ký các dung dịch chuẩn.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

7.1. Định tính:

Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, so sánh R_f của vết trên sắc ký đồ mẫu thử với mẫu chuẩn làm song song. Nếu phát hiện vết có R_f trùng với R_f của chất chuẩn, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với phổ chất chuẩn xác đinh hệ số match để khẳng định kết quả (hệ số match > 0,99).

Thứ tự rửa giải các chất của dung dịch chuẩn paracetamol (R_f khoảng 0,17), piroxicam (R_f khoảng 0,30), indomethacin (R_f khoảng 0,38), ketoprofen (R_f khoảng 0,42).

Phụ lục 5.6
QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM HẠ GLUCOSE MÁU BẰNG HPTLC

1. Nguyên lý

4 dược chất nhóm hạ glucose máu (glipizid, glimepiride, glibenclamid, gliclazid) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,45 µm và phân tích trên hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Hệ thống máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) bao gồm: Bàn chấm mẫu; Bình khai triển tự động; máy scan bản mỏng TLC; Buồng soi UV 254 nm và 366 nm; Máy tính có cài đặt phần mềm để điều khiển toàn bộ hệ thống và xử lý dữ liệu.

4.1.2. Bản mỏng TLC, HPTLC 60 GF 254 (Merck, Đức)

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Thiết bị cô nitơ

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.1.7. Máy lắc vortex.

4.1.8. Tủ sấy

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 µL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,45 µm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn glipizid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn glimepirid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn glibenclamid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.4. Chuẩn gliclazid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.5. Ethanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.6. Methanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.7. Cloroform loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.8. Ethyl acetat loại PA (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 17,5 mg mỗi chuẩn glipizid (5.1.1), chuẩn glimepirid (5.1.2), chuẩn glibenclamid (5.1.3) và 140,0 mg chuẩn gliclazid (5.1.4) cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất glipizid, glimepirid và glibenclamid 0,350 mg/mL; nồng độ gliclazid 2,8 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Pha chuẩn hỗn hợp làm việc có nồng độ glipizid, glimepirid và glibenclamid 87,5 µg/mL; nồng độ gliclazid 700 µg/mL bằng cách hút 5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (6.1) vào bình định mức 20 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều. Pha mới khi sử dụng.

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.6), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (5.1.7), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Lọc qua màng lọc 0,45 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi phân tích. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Điều kiện sắc ký:

- Bản mỏng: HPTLC Silicagel 60 F_{254}
- Pha động: n-butyl acetat – acid formic (n-butyl acetat chứa 5% acid formic).
- Thể tích mẫu: 5 µl
- Phát hiện:
- Phát hiện:

  + Định tính: UV bước sóng 254 nm;

  + Định lượng: tại bước sóng 235 nm.

6.5. Tiến hành sắc ký:

Sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Xác định R_f và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của $R_f \leq 2,0\%$; RSD của diện tích pic ≤ 3,0%

Sắc ký các dung dịch chuẩn.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, so sánh R_f của vết trên sắc ký đồ mẫu thử với mẫu chuẩn làm song song. Nếu phát hiện vết có R_f trùng với R_f của chất chuẩn, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với phổ chất chuẩn xác đinh hệ số match để khẳng định kết quả (hệ số match > 0,99).

Thứ tự rửa giải các chất của dung dịch chuẩn glipizid (R_f khoảng 0,24), glimepirid (R_f khoảng 0,55), glibenclamid (R_f khoảng 0,60), gliclazid (R_f khoảng 0,72).

Phụ lục 5.7
QUY TRÌNH ĐỊNH TÍNH ĐỒNG THỜI MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM ỨC CHẾ PDE-5 BẰNG HPTLC

1. Nguyên lý

3 dược chất nhóm ức chế PDE-5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,45 μm và phân tích trên hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC).

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn, dạng cao.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ "Xây dựng phương pháp phát hiện một số dược chất nhóm giảm đau, chống viêm, hạ glucose máu, ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS"; Luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Hệ thống máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) bao gồm: Bàn chấm mẫu; Bình khai triển tự động; máy scan bản mỏng TLC; Buồng soi UV 254 nm và 366 nm; Máy tính có cài đặt phần mềm để điều khiển toàn bộ hệ thống và xử lý dữ liệu.

4.1.2. Bản mỏng TLC, HPTLC 60 F_{254} (Merck, Đức)

4.1.3. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.4. Thiết bị cô nitơ

4.1.5. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.6. Bể rung siêu âm.

4.1.7. Máy lắc vortex.

4.1.8. Tủ sấy

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 μL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,45 µm.

4.2.6. Cối sứ

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn sildenafil citrat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Chuẩn tadalafil hydroclorid (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.3. Chuẩn vardenafil hydroclorid (Hội đồng Dược Điển Châu Âu hoặc tương đương)

5.1.4. Ethyl acetat loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.5. Ethanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.6. Methanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.7. Cloroform loại PA (Merck hoặc tương đương)

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.3) khoảng 87,5 mg chuẩn sildenafil citrat (5.1.1) và 17,5 mg mỗi chuẩn tadalafil hydroclorid, chuẩn vardenafil hydroclorid (5.1.4) cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ sildenafil citrat 1,75 mg/mL; nồng độ mỗi chất tadalafil hydroclorid và vardenafil hydroclorid 0,35 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Pha chuẩn hỗn hợp làm việc có nồng độ sildenafil citrat 875 µg/mL; nồng độ mỗi chất tadalfil hydroclorid và vardenafil hydroclorid 175 µg/mL bằng cách hút 5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (6.1) vào bình định mức 10 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều. Pha mới khi sử dụng.

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.3) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.6), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (5.1.7), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.6), ly

tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút bằng máy ly tâm (4.1.5). Lọc qua màng lọc 0,45 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi phân tích. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Điều kiện sắc ký:

- Bản mỏng: HPTLC Silicagel 60 F_{254}
- Pha động: Ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:2,6)
- Thể tích mẫu: 5 µl
- Phát hiện:
- Phát hiện:

  + Định tính: UV bước sóng 254 nm;

  + Định lượng: bước sóng 304 nm đối với sildenafil, 251 nm đối với vardenafil và 285 nm đối với tadalafil.

6.5. Tiến hành sắc ký:

Sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn C4. Xác định R_f và diện tích pic của mỗi chất phân tích. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của $R_f \leq 2,0\%$; RSD của diện tích pic ≤ 3,0%

Sắc ký các dung dịch chuẩn C1 → C7.

Sắc ký dung dịch thử.

7. Đánh giá kết quả

Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, so sánh R_f của vết trên sắc ký đồ mẫu thử với mẫu chuẩn làm song song. Nếu phát hiện vết có R_f trùng với R_f của chất chuẩn, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với phổ chất chuẩn xác đinh hệ số match để khẳng định kết quả (hệ số match > 0,99).

Thứ tự rửa giải các chất của dung dịch chuẩn sildenafil (R_f khoảng 0,21), vardenafil (R_f khoảng 0,35), tadalafil (R_f khoảng 0,56).

Phụ lục 5.8
QUI TRÌNH ĐỊNH TÍNH SILDENAFIL BẰNG TLC-SERS

1. Nguyên lý

1 dược chất nhóm ức chế PDE-5 (sildenafil) có thể có trong mẫu chế phẩm đông dược được chiết bằng methanol. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc 0,45 μm và phân tích trên hệ thống quang phổ Raman.

2. Phạm vi áp dụng

Các loại chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn.

3. Tài liệu viện dẫn

Kết quả của luận án tiến sĩ dược học "Xây dựng phương pháp xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược".

4. Dụng cụ, thiết bị

4.1. Thiết bị

4.1.1. Hệ thống máy sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) bao gồm: Bàn chấm mẫu; Bình khai triển tự động; máy scan bản mỏng TLC; Buồng soi UV 254 nm và 366 nm; Máy tính có cài đặt phần mềm để điều khiển toàn bộ hệ thống và xử lý dữ liệu.

4.1.2. Hệ thống quang phổ Raman Hệ thống quang phổ Raman, LabRam, Horiba Jobin Yvon, camera CCD, tia laser 632,8 nm (Pháp).

4.1.3. Bản mỏng TLC, HPTLC 60 F_{254} (Merck, Đức)

4.1.4. Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg.

4.1.5. Thiết bị cô nitơ

4.1.6. Máy ly tâm (có thể đạt 6000 vòng/phút).

4.1.7. Bể rung siêu âm.

4.1.8. Máy lắc vortex.

4.1.9. Tủ sấy

4.2. Dụng cụ

4.2.1. Pipet chính xác các loại 200 μL, 1 mL, 5 mL có thể điều chỉnh thể tích.

4.2.2. Bình định mức các loại.

4.2.3. Ống ly tâm 50 mL có nắp kín.

4.2.4. Cốc thủy tinh có mỏ 50 mL, 100 mL.

4.2.5. Màng lọc mẫu 0,45 μm.

4.2.6. Cối sứ

4.2.7. Bút chì 2B

5. Hóa chất, thuốc thử

5.1.1. Chuẩn sildenafil citrat (Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương hoặc tương đương)

5.1.2. Ethyl acetat loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.3. Ethanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.4. Methanol loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.5. Cloroform loại PA (Merck hoặc tương đương)

5.1.6. Dung dịch keo bạc

6. Các bước tiến hành

6.1. Pha dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc

Cân trên cân phân tích (4.1.4) khoảng 87,5 mg chuẩn sildenafil citrat (5.1.1) cho vào bình định mức 50 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.4) đến vạch, lắc cho tan hết, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ sildenafil citrat 1,75 mg/mL. Bảo quản trong lọ thủy tinh màu, đậy kín ở nhiệt độ 2-8^{o}C, sử dụng trong 1 tháng.

Nồng độ dung dịch chuẩn được tính toán theo khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

6.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Pha dãy chuẩn hỗn hợp làm việc có nồng độ sildenafil citrat 875 µg/mL; nồng độ mỗi chất tadalfil hydroclorid và vardenafil hydroclorid 175 µg/mL bằng cách hút 5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (6.1) vào bình định mức 10 mL (4.2.2), thêm methanol (5.1.6) đến vạch, lắc đều. Pha mới khi sử dụng.

6.3. Chuẩn bị mẫu thử

Cân trên cân phân tích (4.1.4) 5 đơn vị mẫu, tính khối lượng trung bình. Đồng nhất mẫu, nghiền mịn bằng cối sứ (4.2.6). Cân chính xác lượng bột tương ứng ½ liều vào ống falcon dung tích 50 ml (4.2.3). Thêm chính xác 25 ml methanol (5.1.4), lắc xoáy 5 phút trên máy lắc (4.1.8), siêu âm 10 phút trong máy rung siêu âm (4.1.7), ly tâm 6000 vòng/ phút trong 5 phút bằng máy ly tâm (4.1.6). Lọc qua màng lọc 0,45 µm (4.2.5).

Có thể chiết với thể tích khác. Với các mẫu có hàm lượng lớn có thể chiết với 50 mL hoặc 100 mL methanol hoặc pha loãng trước khi phân tích. Hàm lượng chất phân tích thực tế được tính theo thể tích định mức cuối cùng.

6.4. Điều kiện sắc ký:

- Bản mỏng: HPTLC Silicagel 60 F_{254}
- Pha động: Ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45:5:2,6)

- Thể tích mẫu: 5 µl
- Phát hiện:
- Phát hiện:

+ Định tính: UV bước sóng 254 nm; Đánh dấu vết của mẫu thử tại vị trí Rf ≈0,21 bằng bút chì.

6.5. Điều kiện quang phổ SERS:

- Dung dịch keo bạc: kích thước hạt trung bình 30 nm
- Thể tích nhỏ keo bạc: 1,5 µl
- Tia laser : 632,8 nm
- Vật kính phóng đại: 50 lần
- Thời gian chiếu tia laser: 60 phút
- Vị trí chiếu tia laser tại vành của vết loang keo bạc và vết của mẫu thử.

6.7. Tiến hành:

Sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Xác định R_f của sildenafil. Tính RSD của các thông số này. Yêu cầu: RSD của $R_f \leq 2,0\%$.

Sắc ký dung dịch chuẩn sildenafil 875 µg/mL

Sắc ký dung dịch thử.

Quan sát dưới ánh sáng của đèn UV 254 nm. Đánh dấu vết của mẫu thử tại vị trí Rf ≈0,21 bằng bút chì.

Chiếu tia laser tại vị trí vành của giọt keo trên bản mỏng bằng máy Raman để bàn từ 1000-1800 cm^{-1} thu được phổ SERS.

7. Đánh giá kết quả

Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại 254 nm, so sánh R_f của vết trên sắc ký đồ mẫu thử với chuẩn sildenafil làm song song. Nếu phát hiện vết có R_f trùng với R_f của chất chuẩn sildenafil (R_f khoảng 0,21), đo phổ SERS của các vết tương ứng.

Phổ SERS với các đỉnh đặc trưng của sildenafil là 1232 ± 1, 1268 ± 2, 1485 ± 1, 1529 ± 2, 1580 ± 1 cm^{-1}. Tỷ lệ dao động các đỉnh đặc trưng tương ứng lần lượt là 1,00; 0,29-0,36; 0,31-0,37; 0,23-0,27; 0,56-0,70; 1,67-1,90.

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

BÁO CÁO NỘI DUNG

Đánh giá qui trình định tính, định lượng các thuốc tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS tại phòng thí nghiệm độc lập

Nội dung 5d. Thẩm định độc lập Quy trình định tính, định lượng đồng thời một số dược chất nhóm ức chế PDE-5 bằng HPTLC

Chủ trì đề tài:

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM GIẢM ĐAU, CHỐNG VIÊM, HẠ GLUCOSE MÁU, ỨC CHẾ PDE-5 TRỘN LẪN TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC BẰNG HPTLC VÀ LC-MS/MS

Chủ nhiệm đề tài

PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh

Đại diện nhóm nghiên cứu

Nguyễn Minh Lân

VIỆN NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THIÊN NHIÊN

PHÓ VIỆN TRƯỞNG

VIỆN NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THIÊN NHIÊN

Lê Anh Quân

BỘ Y TẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

BÁO CÁO NỘI DUNG 5

Đánh giá qui trình định tính, định lượng các thuốc tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC và LC-MS/MS tại phòng thí nghiệm độc lập

Công việc 5.8. Quy trình định tính, định lượng đồng thời một số dược chất nhóm ức chế PDE-5 bằng LC-MS/MS

Chủ trì đề tài:

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN MỘT SỐ DƯỢC CHẤT NHÓM GIẢM ĐAU, CHỐNG VIÊM, HẠ GLUCOSE MÁU, ỨC CHẾ PDE-5 TRỘN LẪN TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC BẰNG HPTLC VÀ LC-MS/MS

Chủ nhiệm đề tài | **Đại diện nhóm nghiên cứu**

PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh | Phí Thị Ngọc Anh

VIỆN NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THIÊN NHIÊN

PHÓ VIỆN TRƯỞNG

Nguyễn Bá Xuân Trường