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

Chuyên ngành : KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT
Mã số : 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2019

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Dược Hà Nội.

Viện khoa học hình sự, Bộ Công An.

Trường ĐH Khoa học tự nhiên, ĐH Quốc gia Hà Nội.

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh

PGS.TS. Phạm Thị Thanh Hà

Phản biện 1:……

…….

Phản biện 2:……

…….

Phản biện 3:……

…….

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường họp tại: ……

Vào hồi…… giờ …… ngày …… tháng …… năm……

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia Việt Nam

Thư viện trường ĐH Dược HN

A-GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1.Tính cấp thiết của luận án

Theo Tổ chức Y tế Thế giới có đến 80% người dân ở các nước đang phát triển sử dụng thường xuyên các thuốc cổ truyền trong chăm sóc sức khỏe. Tuy nhiên, một số cơ sở sản xuất đã trộn không công bố vào chế phẩm đông dược một số loại thuốc tân dược để cải thiện tác dụng và rút ngắn thời gian điều trị. Điển hình các nhóm thuốc tân dược thường được trộn trái phép là nhóm thuốc giảm glucose máu, thuốc giảm đau, chống viêm, thuốc ức chế phosphodiesterase-5 (PDE-5).

Do đó, yêu cầu phát hiện tân dược trong 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. 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 Raman hiện đại. Tại Việt Nam, các phương pháp phát hiện chủ yếu tập trung vào sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký lớp mỏng, sắc ký khối phổ. 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. Đặc biệt, Việt Nam chưa có nghiên cứu nào phát hiện thuốc tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng TLC-SERS.

Do vậy, đề tài **"Xây dựng quy trình xác định một số tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược"** đã được thực hiện.

2. Mục tiêu của luận án

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 thuốc tân dược trên trộn trái phép trong chế phẩm đông dược 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 thuốc tân dược trên trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược đang lưu hành tại Việt Nam.

3. Những đóng góp mới của luận án

❖ **Xây dựng** quy trình **LC-MS/MS phân tích 16 dược chất trộn lẫn trong chế phẩm đông dược**

• Đề tài là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam xây dựng 3 quy trình LC-MS/MS định tính và định lượng từng nhóm hoạt chất *giảm đau, chống viêm* (paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison), *nhóm giảm glucose máu* (glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid), và *nhóm ức chế PDE-5* (sildenafil, tadalafil và vardenafil) trong trong 9 nền mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp, bệnh đái tháo đường, bệnh lý liệt dương.

• Thiết lập chung 1 chương trình sắc ký chung cho các dược chất với cột C18 với pha động gồm acetonitril chứa acid formic 0,1%, nước chứa acid formic 0,1% theo chế độ gradient.

❖ **Đã xây dựng được** quy trình **HPTLC phát hiện 16 dược chất trộn lẫn trong chế phẩm đông dược:** Thiết lập 4 phương pháp HPTLC định tính từng nhóm hoạt chất giảm đau, chống viêm không steroid, nhóm

giảm đau, chống viêm steroid, nhóm giảm glucose máu, nhóm ức chế PDE-5 trong chế phẩm đông dược.

❖ **Lần đầu tiên tại Việt Nam, phương pháp TLC-SERS được xây dựng để phát hiện sildenafil trộn lẫn trong chế phẩm đông dược**: Xác định được vị trí và cường độ các đỉnh đặc trưng của sildenafil trong 3 nền mẫu hỗ trợ điều trị bệnh liệt dương, tăng cường sinh lực.

❖ **Ứng dụng các quy trình phát hiện các tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược**

• Ứng dụng quy trình HPTLC để định tính và khẳng định bằng LC-MS/MS đồng thời xác định hàm lượng hoạt chất dương tính trong 184 mẫu chế phẩm đông dược. Kết quả phát hiện 7/16 chất nghiên cứu gồm paracetamol, indomethacin, dexamethason acetat, glibenclamid, sildenafil, tadalafil và vardenafil trong 25 mẫu thực.

• Ứng dụng quy trình TLC-SERS đã phát hiện 5 mẫu dương tính sildenafil trong 24 mẫu hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương; tương đồng với kết quả của HPTLC và LC-MS/MS.

4. Ý nghĩa của luận án

Đề tài đã xây dựng được các quy trình để phát hiện tân dược trên chế phẩm đông dược bằng các phương pháp khác nhau.

• Quy trình HPTLC mang ý nghĩa sàng lọc và cho kết quả định tính tin cậy trên 4 nhóm thuốc thường bị trộn lẫn trong đông dược.

• Quy trình LC-MS/MS là phương pháp qui chiếu, khẳng định kết quả định tính các hoạt chất được trộn lẫn và định lượng hàm lượng hoạt chất đó trong mẫu thực dương tính.

• Quy trình TLC-SERS là phương pháp mới kết hợp được khả năng sàng lọc mẫu (TLC) và sự nhanh chóng, chính xác của thiết bị quang phổ Raman hiện đại. Đây là xu hướng phân tích trên thế giới, và thực hiện thành công tại Việt Nam trong phát hiện sildenafil.

• Đã thu thập 184 mẫu tại Việt Nam, phát hiện 19 mẫu dương tính có chứa đơn chất và 6 mẫu có đồng thời 2 hoạt chất. Từ đó, luận án cho thấy các thông tin sơ bộ về tình hình trộn lẫn tân dược trong chế phẩm đông dược tại Việt Nam, đồng thời cảnh báo về nguy cơ cho người sử dụng.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 4 chương, 46 bảng, 67 hình, 154 tài liệu tham khảo với 38 tài liệu tiếng Việt, và 114 tài liệu tiếng Anh, 2 tài liệu trang Web, 6 phụ lục. Luận án có 148 trang gồm các phần chính: Đặt vấn đề (2 trang); Chương 1.Tổng quan (36 trang); Chương 2.Nguyên liệu, trang thiết bị nội dung và phương pháp nghiên cứu (13 trang); Chương 3.Kết quả nghiên cứu (70 trang); Chương 4.Bàn luận (25 trang); Kết luận và kiến nghị (2 trang).

B-NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Đã trình bày và tập hợp có hệ thống các nội dung chính liên quan đến luận án, bao gồm:

-Khái niệm, phân loại về các chế phẩm đông dược bao gồm thuốc dược liệu, thuốc cổ truyền và thực phẩm chức năng; cũng như tóm tắt tình hình các nhóm tân dược được trộn trái phép trong đông dược trên thế giới và Việt Nam.

-Cấu trúc, tính chất lý hóa, tác dụng dược lý của 16 dược chất nghiên cứu gồm betamethason, dexamethason acetat, prednison, hydrocortison acetat, prednisolon, paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid, sildenafil, tadalafil và vardenafil (thuộc nhóm 4 nhóm tác dụng thường được trộn trái phép).

-Tổng quan tóm lược các phương pháp nghiên cứu gồm HPTLC, LC-MS/MS và TLC-SERS. Từ đó, tóm tắt các ứng dụng của các phương pháp phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược (nền mẫu, hoạt chất, phương pháp, điều kiện phân tích).

Hiện nay, tình trạng thuốc đông dược bị trộn trái phép tân dược đang diễn ra phổ biến, đây đang là vấn đề của nhiều nước trên thế giới. Tại Châu Âu, các nghiên cứu tại Anh, Pháp và Thụy Sĩ công bố tình trạng trộn trái phép các nhóm glucocorticoid, nhóm ức chế PDE-5 … trong đông dược. Châu Á được xem là khu vực có nhiều công bố về tân dược trộn trái phép như Trung Quốc, Thái Lan, Ấn Độ, Singapore, Hàn Quốc ... Điển hình các nhóm thuốc tân dược hay được trộn vào là nhóm thuốc giảm glucose máu, thuốc glucocorticoid, thuốc giảm đau không opioid, thuốc ức chế Phosphodiestarase-5.

Tại Việt Nam, chế phẩm đông dược có mặt trên thị trường trong nước hiện nay rất đa dạng, được bán tràn lan trên mạng nên khó kiểm soát chất lượng, gây ra nhiều tác dụng không muốn khi sử dụng cho người dùng. Với tính chất phổ biến, nhưng 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 năm 2000 cho đến nay như dexamethason, prednisolon ... Bên cạnh đó, tình trạng trộn trái phép đồng thời nhiều hoạt chất hoặc các dẫn chất của thuốc ức chế PDE-5 trong các chế phẩm đông dược gây khó khăn cho việc phát hiện và định lượng như sildenafil, tadalafil ... Đối với tân dược để điều trị đái tháo đường, sulfonylurea thế hệ II và biguanide được thường phát hiện trộn trái phép nhờ tác dụng mạnh, giá thành rẻ như metformin, glibenclamid ... Tuy nhiên, các nghiên cứu tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào các phương pháp phân tích như TLC, HPLC, LC-MS; mà chưa phát triển trên HPTLC, LC-MS/MS, TLC-SERS.

HPTLC là một kỹ thuật tiên tiến của TLC, 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. Bên cạnh HPTLC, TLC-SERS là sự kết hợp giữa TLC và SERS tuân thủ đúng theo khuyến cáo của SWGDRUG (Nhóm công tác khoa học cho các phân tích của thuốc bị thu giữ), vừa tận dụng được khả năng sàng lọc số lượng mẫu lớn của TLC, vừa được khẳng định kết quả nhanh chóng, chính xác của quang phổ Raman tăng cường bề mặt. Tuy nhiên, LC-MS/MS được xem là phương pháp đặc hiệu để phát hiện tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược và là phương pháp qui chiếu cho phương pháp mới TLC-SERS.

Như vậy, việc phát triển đồng thời các phương pháp HPTLC, TLC-SERS, LC-MS/MS cho kết quả chính xác, hỗ trợ cho các đơn vị kiểm nghiệm, và giúp cơ quan quản lý kiểm soát chế phẩm đông dược, bảo vệ sức khỏe người bệnh.

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

-Chất chuẩn: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương và Hội đồng Dược điển Châu Âu.

-Các dược liệu có nguồn gốc Việt Nam, Trung Quốc.

-Các tá dược có nguồn gốc Việt Nam hoặc Trung Quốc.

-Dung môi, hóa chất đạt tiêu chuẩn LC-MS/MS và tinh khiết 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). 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 (Thuỵ Sỹ).

Các trang thiết bị, dụng cụ khác của phòng thí nghiệm tại trường Đại học Dược Hà Nội; Viện khoa học hình sự, Bộ Công An và 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 điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp; 41 chế phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh tiểu đường, giúp ổn định đường huyết; 24 chế phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lý đang lưu hành tại Việt Nam.

2.2.2. Mẫu nền 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.

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 (nền nang NX1), Tam tý thang (nền bột NX2) và Đại tần giao thang (nền nén NX3). *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 giảm đường huyết, ổn định lượng đường trong máu gồm 3 dạng bào chế là viên nén ND1, viên nang ND2 và viên hoàn ND3. *Nền mẫu hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, tăng cường sinh lý:* dựa trên các bài thuốc Sâm nhung bổ thận hoàn (nền nang NP1), Minh mạng thang (nền hoàn NP2), và Điều nguyên cứu bản thang (cao thuốc NP3).

2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. *Xây dựng quy trình xác định một số* tân dược trộn lẫn trong ***c****hế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS*

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

Tiến hành khảo sát lựa chọn dung môi chiết cho hiệu suất cao nhất như sau: Nhóm giảm đau, chống viêm: 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. Nhóm giảm glucose máu: khảo sát khả năng chiết các dung môi methanol; methanol: nước (20:5); acetonitril; ethanol. Nhóm ức chế PDE-5: dung môi khảo sát bao gồm: methanol ; methanol-nước =70 : 30 ; methanol-nước-amoniac = 75 : 25 :1 ; acetonitril.

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

- 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.
- 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 quy trình phân tích đã xây dựng

Thẩm định phương pháp theo AOAC 2016, ICH 2005 trên 9 nền mẫu tự tạo với các chỉ tiêu: độ phù hợp của hệ thống, độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng (LOD, LOQ), độ đúng, độ chính xác.

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

2.3.2.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Pha tĩnh: bản mỏng silica gel 60 F_{254} với kích thước khác nhau. Pha động tùy thuộc vào từng nhóm hoạt chất. Lựa chọn điều kiện tách riêng các chất, vết gọn, rõ nét, phổ trùng với phổ chuẩn để định tính.

2.3.2.2. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp trên mẫu tự tạo chứa chất nghiên cứu với các chỉ tiêu theo AOAC và ICH: độ chọn lọc, giới hạn phát hiện.

2.3.3. Xây dựng quy trình định tính sildenafil trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng TLC-SERS

2.3.3.1. Khảo sát các điều kiện SERS

Lựa chọn keo bạc cho tín hiệu phổ SERS của sildenafil rõ nhất, các đỉnh đặc trưng của sildenafil không bị chồng lấp bởi tín hiệu Raman của keo bạc. Đánh giá chất lượng và khảo sát nồng độ hỗn dịch keo. Xây dựng phổ TLC-SERS của chất chuẩn sildenafil với vị trí đỉnh đặc trưng và tỉ lệ dao động của các đỉnh đặc trưng.

2.3.3.2. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp theo AOAC 2016 và ICH 2005 trên 3 nền mẫu tự tạo về tính chọn lọc, giới hạn phát hiện.

2.3.4. Áp dụng các quy trình trên để phát hiện các tân dược trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

2.3.4.1. Ứng dụng quy trình LC-MS/MS trong phân tích mẫu thực

Phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép trong 184 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.

2.3.4.2. Ứng dụng quy trình HPTLC trong phân tích mẫu thực

Phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép trong 184 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 TLC – SERS trong phân tích mẫu thực

Áp dụng quy trình TLC – SERS 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; đánh giá tỷ lệ dao động của đỉnh đặc trưng.

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả thu được trong bằng phần mềm MSDR5 trong LC-MS/MS; phần mềm winCAT trong HPTLC; phần mềm Labspec 5 trong TLC-SERS và OriginPro 8.5 trong xử lý phổ thu được. Sử dụng các phép thống kê trong phân tích bằng Microsoft Office Excel 2013.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

3.1.1. Xây dựng quy trình xác định các thuốc giảm đau, chống viêm trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS

3.1.1.1. Khảo sát điều kiện khối phổ và sắc ký

Điều kiện khối phổ: phát hiện bằng detector MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+); mảnh khối lựa chọn (ion mẹ→ion định lượng/ion định tính) có m/z: paracetamol 152,1→110,1/93,2; piroxicam 332,1→95,2/121,1; ketoprofen 255,1→209,0/105,1; hydrocortison acetat 405,2→327,1/241,1; dexamethason acetat 435,2→337,1/397,1; prednison 359,2→341,1/313,1; indomethacin 358,1→139,0/111,1;

betamethason 393,2→373,1/355,1; prednisolon 361,2→343,1/173,0. *Điều kiện sắc ký*: cột C18 (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm) (Mỹ); nhiệt độ cột: 40°C; thể tích tiêm 2 µl; tốc độ dòng 0,3 ml/phút; thời gian 12 phút; Pha động kênh A: HCOOH 0,1%/H_2O; kênh B: HCOOH 0,1%/Acetonitril; chương trình gradient (từ 0-7,0 phút: kênh A 70-30%; từ 7,0-8,5 kênh A 30-70%; 8,5-12 phút kênh A 70%).

3.1.1.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Khảo sát trên 3 nền mẫu nang, bột, nén hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp; về dung môi chiết và thời gian siêu âm cho hiệu suất cao nhất. Từ đó, quy trình xử lí mẫu là mẫu thử được nghiền mịn, cân ½ liều dùng mẫu thử hoặc mẫu placebo vào ống falcon. Thêm 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, Pha loãng lớp dịch trong 50 lần bằng methanol, lọc qua màng lọc 0,22 µm, tiêm sắc ký.

3.1.1.3. Thẩm định quy trình phân tích

Phương pháp đã xây dựng có LOD thấp (từ 0,076 đến 0,606 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.

3.1.2. Xây dựng quy trình xác định các thuốc giảm glucose máu trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS

3.1.2.1. Khảo sát điều kiện khối phổ và sắc ký

Điều kiện khối phổ: chất phân tích được phát hiện bằng detector MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+); mảnh khối lựa chọn (ion mẹ→ion định lượng/ion định tính) có m/z: glibenclamid 494,1→368,9/169,0; gliclazid 324,1→127,2/110,2; glimepirid 491,1→352,0/126,2; glipizid 446,2→321,0/167,0. *Điều kiện sắc ký*: giống như điều kiện sắc ký của nhóm giảm đau, chống viêm ở mục 3.1.1.1.

3.1.2.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Khảo sát từng giai đoạn trên 3 nền mẫu nang, nén, hoàn hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường; khảo sát dung môi chiết cho hiệu suất cao nhất. Từ đó, lựa chọn dung môi chiết methanol, tương tự với qui trình xử lý mẫu của nhóm giảm đau, chống viêm ở mục 3.1.1.2.

3.1.2.3. Thẩm định quy trình phân tích

Phương pháp đã xây dựng có LOD thấp (từ 0,3 đến 0,4 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.

3.1.3. Xây dựng quy trình xác định các thuốc ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS

3.1.3.1. Khảo sát điều kiện khối phổ và sắc ký

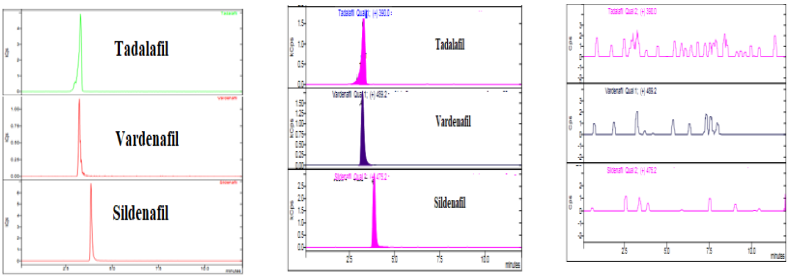
Điều kiện khối phổ: phát hiện bằng detector MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+); mảnh khối lựa chọn (ion mẹ→ion định lượng/ion định tính) có m/z: sildenafil 475,2→ 100,3/283,0; tadalafil 390,0→268,0/169,0; vardenafil 489,2→151,1/312,0. *Điều kiện sắc ký*: giống như nhóm giảm đau, chống viêm ở mục 3.1.1.1.

3.1.3.2. Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Khảo sát từng giai đoạn trên 3 nền mẫu nang, hoàn, cao thuốc hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương; khảo sát dung môi chiết cho hiệu suất cao nhất. Từ đó, lựa chọn dung môi chiết methanol, tương tự với qui trình xử lý của nhóm giảm đau, chống viêm ở mục 3.1.1.2.

3.1.3.3.Thẩm định quy trình phân tích

Độ đặc hiệu cho thấy 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, xem hình 3.14.



Nền nang | Nền nang thêm chuẩn | Mẫu chuẩn

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

Như vậy, quy trình đã xây dựng có LOD thấp (từ 0,5 đến 1,0 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 một số tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng HPTLC

3.2.1. Xây dựng quy trình định tính nhóm glucorticoid

3.2.1.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát và lựa chọn bản mỏng HPTLC silicagel 60 F_{254}, thể tích chấm 5 µl. Hệ dung môi là cloroform-ethyl acetat-ethanol (8,5:1:0,5) cho kết quả tách tốt cả 5 corticoid trên cả 3 nền, với R_f các chất 0,25–0,72. Phổ UV của betamethason có cực đại 244 nm, cực tiểu 206 nm; dexamethason acetat có cực đại 245 nm, cực tiểu 205 nm; hydrocortison acetat có cực đại 249 nm, cực tiểu 206 nm; prednisolon có cực đại 251 nm, cực tiểu 207 nm; và prednison có cực đại 245 nm, cực tiểu 208 nm. Qui trình 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.

3.2.1.2. Thẩm định quy trình

Các *mẫu nền* cho *nhóm corticoid* gồm viên nang, viên nén và thuốc bột. Kết quả cho thấy độ đặc hiệu cao với 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. Phổ UV-VIS của các vết sắc ký thu được cho độ tinh khiết pic và hệ số phù hợp đều đạt > 0,99. LOD của các chất từ 20-120 ng/vết.

3.2.2. Xây dựng quy trình định tính nhóm NSAID

3.2.2.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát và lựa chọn bản mỏng HPTLC silicagel 60 F_{254}, thể tích chấm 5 µl. Hệ dung môi là n-hexan-ethyl acetat-acid acetic (6:2,5:1,5), tách tốt 4 NSAID với R_f các chất 0,18–0,43. Phổ UV của paracetamol có 1 cực đại ở 247 nm, piroxicam có 2 cực đại ở 236 nm và 282 nm, indomethacin có 2 cực đại ở 271 nm và 318 nm, và ketoprofen có 1 cực đại ở 255 nm. Qui trình 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.

3.2.2.2. Thẩm định quy trình

Các mẫu nền cho nhóm NSAIDs viên nang, viên nén và thuốc bột. Kết quả thu được tương tự với *nhóm corticoid*, thể hiện ở R_f của paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen lần lượt là 0,17; 0,30; 0,38; 0,42. Phổ UV-VIS của vết sắc ký thu được cho độ tinh khiết pic, hệ số phù hợp đạt > 0,99. LOD của các chất từ 35-50 ng/vết.

3.2.3. Xây dựng quy trình định tính nhóm giảm glucose máu

3.2.3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát và lựa chọn bản mỏng HPTLC silicagel 60 F_{254}, thể tích chấm 5 µl. Hệ dung môi n-butyl acetat-acid formic (100:0,5) cho kết quả tách tốt nhất, với R_f các chất 0,24–0,72. Phổ UV của *g*libenclamid có 2 cực đại ở 235nmm và 310 nm; glipizide có 2 cực đại ở 233 nm và 279 nm; gliclazid có 1 cực đại ở 232 nm và glimepirid 1 cực đại ở 235 nm. Qui trình 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.

3.2.3.2. Thẩm định quy trình

Các *mẫu nền* của nhóm giảm glucose máu là viên nang, viên nén và viên hoàn. Kết quả cho thấy Rf của glipizid, glimepirid, glibenclamid, gliclazid lần lượt là 0,24; 0,55; 0,60; 0,72. Phổ UV-VIS của vết sắc ký thu được cho độ tinh khiết pic, hệ số phù hợp đạt > 0,99. LOD của các chất từ 30-180 ng/vết.

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

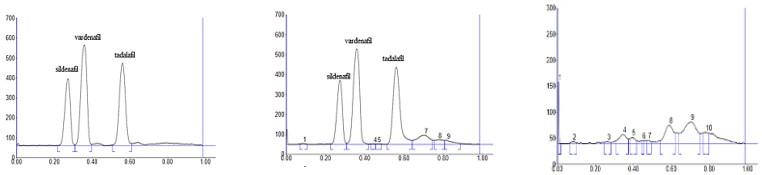
3.2.4.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát và lựa chọn bản mỏng HPTLC silica gel 60 F254 với kích thước (10x20cm), thể tích chấm 5 µl. Hệ dung môi là ethyl acetat - isopropanol - amoniac 25% (45: 5: 2,6, v/v/v). Phổ UV của sildenafil có 2 cực đại ở 232nm và 304 nm; vardenafil có cực đại ở 251nm; tadalafil có 2 cực đại ở 235 và 285 nm. Xử lý mẫu giống mục 3.2.3.1.

3.2.4.2. Thẩm định quy trình

Các *mẫu nền* của nhóm ức chế PDE-5 là viên nang, viên hoàn và cao thuốc. Kết quả cho thấy Rf của sildenafil, vardenafil và tadalafil

lần lượt là 0,21; 0,55; 0,60. Phổ UV-VIS của vết sắc ký thu được cho độ tinh khiết pic, hệ số phù hợp đạt > 0,99 (Hình 3.40). LOD của các chất từ 157-188 ng/vết.



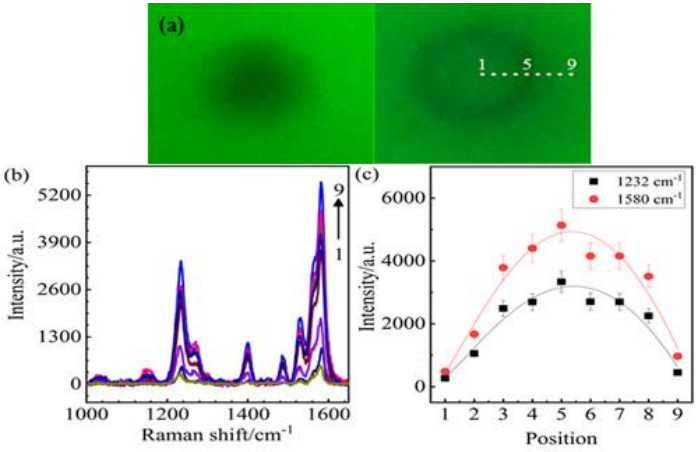
Cp-Chất Chuẩn *Cp/Nang-Nền Nang thêm chuẩn* *Nang-Nền nang*

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

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

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

Phương pháp TLC-SERS sử dụng về xử lý mẫu, hệ dung môi của HPTLC trên nhóm ức chế PDE-5. Đánh dấu vết ở bước sóng 254 nm, đo phổ bằng máy Raman, tia laser 632,8 nm, thời gian 60 giây.



Hình 3.45 Sắc ký đồ của bản mỏng tại vị trí vết khi chưa nhỏ keo và đã nhỏ keo vị trí từ 1-9 tạo vòng cà phê (a), Phổ SERS của sildenafil tại các vị trí nhỏ keo khác nhau, (c) tỷ lệ giữa cường độ vị trí 1-9 (b).

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. Tiến hành thu tín hiệu SERS tại các vị trí khác nhau theo thứ tự từ 1 đến 9 như Hình 3.45 bắt đầu từ tâm vòng tròn. Từ đó, lựa chọn vị trí 5 (giữa vành) để được tín hiệu SERS cao nhất.

3.3.2. Thẩm định quy trình định tính sildenafil bằng TLC-SERS

Phương pháp có độ đặc hiệu tốt trên 3 nền mẫu khác nhau. LOD của sildenafil là 2 ng/vết. Từ đó, xác định các đỉnh đặc trưng sildenafil trong nền là 1232 ± 1, 1268 ± 2, 1485 ± 1, 1529 ± 2, 1580 ± 1 cm^{-1}.

3.4. Áp dụng các quy trình trên để phát hiện các dược chất trộn trái phép trong chế phẩm đông dược.

3.4.1. Áp dụng quy trình HPTLC để phát hiện các dược chất trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

Phương pháp HPTLC được triển khai trên 184 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm chức năng thu thập được trên thị trường, phát hiện 25 mẫu dương tính với 7 hoạt chất paracetamol, indomethacin, dexamethason acetat, glibenclamid, sildenafil, tadalafil, vardenafil.

3.4.2. .Áp dụng quy trình LC-MS/MS để xác định các dược chất trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

Phương pháp LC-MS/MS được triển khai trên 184 mẫu chế phẩm thu thập được trên thị trường, phát hiện 25 mẫu dương tính với 7 hoạt chất, đặc biệt khẳng định được các mẫu dexamethasone acetat, và glibenclamid ở hàm lượng thấp. Đồng thời, LC-MS/MS định lượng hàm lượng tân dược trộn trái phép trong 25 mẫu dương tính với kết quả theo Bảng 3.34.

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	13,48	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. Áp dụng quy trình TLC-SERS để định tính sildenafil trộn trái phép trong chế phẩm đông dược

Phương pháp TLC – SERS đã phát hiện được 5 mẫu dương tính với sildenafil trong tổng số 24 mẫu chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh lý liệt dương. Kết quả phù hợp với kết quả phân tích LC-MS/MS và HPTLC.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng các nền mẫu chế phẩm đông dược

Luận án đã tiến hành xây dựng 9 nền mẫu được bào chế tại phòng nghiên cứu sản phẩm của Công ty Traphaco dựa vào các bài thuốc và dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị và điều trị các bệnh xương khớp, bệnh đái tháo đường và bệnh liệt dương trong Dược Điển Việt Nam và danh mục thuốc cổ truyền được Bộ Y tế công nhận ngày 31/10/2016. Do đó, các nền mẫu này có thể đại diện cho các nhiều sản phẩm đông dược đang lưu hành trên thị trường.

4.2. Phương pháp LC-MS/MS

Với mục tiêu 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. 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, diện tích píc, so sánh phổ mẫu thử và mẫu chuẩn. kết quả thẩm định phương pháp 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, phù hợp trong việc phân tích trên nền mẫu có nhiều thành phần phức tạp.

4.3. Phương pháp HPTLC

Phương pháp HPTLC với ưu điểm sử dụng bản mỏng 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 một mẫu khoảng 12 phút, nên kéo dài thời gian phân tích. Với 4 nhóm dược lý, luận án đã lựa chọn 4 điều kiện khảo sát dung môi phù hợp và cho giới hạn phát hiện thấp trên nền 9 mẫu dược liệu và giới hạn phát hiện thấp theo AOAC.. Bên cạnh đó, mẫu dương tính được đánh giá vào hệ số tinh khiết ≥0,99 và hệ số chồng phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử ở các nồng độ ≥0,99, hạn chế bỏ sót những trường hợp nhầm lẫn.

4.4. Phương pháp TLC-SERS

Phương pháp 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. Cường độ của các đỉnh đặc trưng cho sidenafil tăng tuyến tính khi tăng nồng độ, là một cách tiếp cận có tiềm năng cho việc ứng dụng phát hiện và phân tích định tính hoặc bán định lượng sidenafil. Dựa vào số lượng đỉnh đặc trưng của phổ SERS, phương pháp cho thấy độ đặc hiệu cao và LOD thấp hơn so với phương pháp HPTLC.

4.5. Đánh giá khả năng ứng dụng của các quy trình

Để kiểm định mức độ khả thi và khả năng ứng dụng của các phương pháp được xây dựng, đề tài đã thu thập trên thị trường và phân tích 184 mẫu chế phẩm đông dược dạng viên nén, viên nang, viên hoàn, viên ngậm, thuốc bột, trà túi lọc; được chỉ định điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp, bệnh đái tháo đường và bệnh liệt dương. Do chỉ đóng vai trò kiểm định lại phương pháp, nên quá trình

thu thập mẫu chưa được hệ thống hóa, chỉ là ngẫu nhiên dựa trên các sản phẩm đã có và đặc biệt dựa trên các phản ứng của người dùng gặp các tác dụng không mong muốn khi dùng thuốc.

Kết quả của phương pháp HPTLC dựa vào hệ số Rf, hệ số tinh khiết và hệ số chồng phổ của mẫu thử so với mẫu chuẩn đều ≥0,99 nên loại được các kết quả dương tính giả. Bên cạnh đó, phương pháp LC-MS/MS được dùng để khẳng định lại kết quả của HPTLC và định lượng 25 mẫu dương tính trong 184 mẫu chế phẩm đông dược. 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, 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 khách quan hơn các hệ thống khác.

Với 11 mẫu dương tính với thuốc giảm đau chống viêm, 8 mẫu với giảm glucose máu vào chế phẩm đông dược, 6 mẫu với nhóm ức chế PDE-5, cho thấy việc trộn trái phép đang diễn ra và phần lớn các chế phẩm này được mua ở các cơ sở gia truyền, qua mạng internet. Các chế phẩm đông dược có tác dụng với bệnh xương khớp, bệnh đái tháo đường thường được sử dụng dài ngày nên với mức liều trên có thể gia tăng một số tác dụng phụ có hại cho sức khỏe của người tiêu dùng. Ngược lại, bệnh lý liệt dương nhất là 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, phù hợp với nhiều nghiên cứu khác.

Phương pháp TLC-SERS 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 phát hiện được 05 mẫu dương tính với sildenafil, mở ra hướng ứng dụng mới trong phát hiện 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 F254. 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

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.

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 NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

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), tr. 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), tr. 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), tr. 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.