BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

ĐÀO THỊ CẨM MINH

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

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

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

PGS.TS. Phạm Thị Thanh Hà

HÀ NỘI, NĂM 2019

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TT	Tên bài báo	Tên tạp chí	Số Tạp chí và thời điểm phát hành
1	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	Số 503 Tập 58. Năm 2018
2	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	Số 5 Tập 23. Năm 2018
3	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	Số 6 Tập 9. Năm 2018
4	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	Số 516 Tập 59. Năm 2019
5	Detection 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	Số 174. Năm 2019

3
2018

tạp chí

DƯỢC HỌC

SỐ 503 • NĂM THỨ 58 • THÁNG RA 1 KỲ • ISSN 0866 - 7861



Cây đậu xanh

Vigna radiata (L.) R. Wilczek

Họ Đậu - Fabaceae

BỘ Y TẾ XUẤT BẢN

Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Quận Ba Đình - Hà Nội

Tel: 0243.8461430 - 0243.7368367

TẠP CHÍ DƯỢC HỌC
ISSN 0866 - 7861
3/2018 (SỐ 503 NĂM 58)

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU - KỸ THUẬT

- PHAN NGUYỄN TRƯỜNG THẮNG, VƯU THANH TÚ QUYÊN, HUỲNH NGỌC TRINH, HÀ MINH HIỀN: Nghiên cứu xây dựng phương pháp HPLC định lượng acid rosmarinic và luteolin trong cao đặc tía tô 2
- LÊ ĐÌNH CHI, NGUYỄN TUẤN MINH, NGUYỄN THỊ ÁNH HƯỜNG, PHẠM THỊ NGỌC MAI: Định lượng tobramycin trong thuốc mỡ tra mắt bằng điện di mao quản với detector đo độ dẫn không tiếp xúc 6
- BÙI HỒNG CƯỜNG, PHÙNG HOÀ BÌNH, PHÙNG BÁ ĐỨC: Nghiên cứu cao đặc phương thuốc Vị tràng an về tác dụng kháng khuẩn, chống viêm ở đại tràng thực nghiệm 8
- VŨ ĐỨC LỢI, NGUYỄN THỊ HƯỜNG: Một số hợp chất phân lập từ phân đoạn dịch chiết ethylacetat của lá cây dâu tằm (*Morus alba* L.) thu hái tại tỉnh Thái Nguyên 14
- 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: 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 18
- NGUYỄN ĐÌNH DŨNG, NGUYỄN THU HẰNG, NGUYỄN DUY CHÍ, HỨA THÙY LINH: Khảo sát hàm lượng flavonoid trong vỏ hạt một số giống đậu xanh bằng phương pháp HPLC 23
- PHAN CƯỜNG HUY , PHẠM CẢNH EM, ĐỖ THỊ THÚY, TRƯƠNG NGỌC TUYỀN: Tổng hợp, hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của dẫn chất *N* - thế acid anthranilic 29
- TRẦN HÙNG SƠN, NGUYỄN VĂN BẠCH, CAO VĂN ÁNH, NGUYỄN THỊ THANH PHƯƠNG, TRẦN MINH NGỌC, ĐÀO VĂN ĐÔN: Nghiên cứu định lượng đồng thời acid salvianolic B và tanshinon IIA trong đan sâm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao 33
- NGÔ DUY TÚY HÀ, HÀ VĂN HUỲNH ANH, TRƯƠNG ĐỖ QUYÊN, TRƯƠNG PHƯƠNG: Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các dẫn chất imin-thioure 38
- NGUYỄN HUY VĂN, VŨ HƯƠNG THỦY, PHẠM THANH KỲ, NGUYỄN SƠN NAM: Nghiên cứu đề xuất mô hình liên kết phát triển actisô trong cộng đồng dân tộc thiểu số thuộc huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai 43
- LỮ THỊ KIM CHI, HUỲNH TỰ THUẬT, NGUYỄN NGỌC VINH: Nghiên cứu phân lập andrographolid làm chất đối chiếu từ cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) 49
- NGUYỄN SƠN NAM, NGUYỄN TRUNG HÀ, NGUYỄN QUỲNH HOA: Phân tích ABC-VEN thuốc sử dụng tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 năm 2017 53
- ĐÀO THỊ THANH HIỀN, NGUYỄN LÂM HỒNG, TRẦN VIỆT HÙNG: Phát hiện tân dược nhóm ức chế enzym phosphodiesterase-5 trộn trái phép trong thuốc đông dược và thực phẩm chức năng bằng kỹ thuật vân tay cộng hưởng từ hạt nhân (^{1}H-NMR fingerprint) 56
- TRẦN THANH HÀ, NGUYỄN VĂN ĐẬU, NGUYỄN HOÀNG MAI, PHẠM HÙNG VIỆT, DƯƠNG HỒNG ANH: Thành phần hóa học của cặn chiết diclorometan thân cây nụ đinh (*Luculia pinceana* Hook.) 61
- NGUYỄN VIỆT DŨNG, NGUYỄN DUY THUẦN, PHẠM THỊ VÂN ANH, LÊ CẢNH VIỆT CƯỜNG, HÀ XUÂN ANH, LÊ THỊ LIÊN, HOÀNG LÊ TUẤN ANH, NGUYỄN PHAN HẰNG: Các hợp chất flavonoid từ phần trên mặt đất loài ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance) 67

TIN TRONG NGÀNH

72

PHARMACEUTICAL JOURNAL
ISSN 0866 - 7861
3/2018 (N° 503 Vol. 58)

CONTENTS

RESEARCH - TECHNIQUES

- PHAN NGUYỄN TRƯỜNG THẮNG, VƯU THANH TÚ QUYÊN, HUỲNH NGỌC TRINH, HÀ MINH HIỀN: Study on development an HPLC procedure for determination of rosmarinic acid and luteolin in the condensed leaf extracts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. 2
- LÊ ĐÌNH CHI, NGUYỄN TUẤN MINH, NGUYỄN THỊ ÁNH HƯỜNG, PHẠM THỊ NGỌC MAI: Quantitative determination of tobramycin in ophthalmic ointments by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detector 6
- BÙI HỒNG CƯỜNG, PHÙNG HOÀ BÌNH, PHÙNG BÁ ĐỨC: Experimental antimicrobial and anti-inflammatory activities of the condensed extracts (*extractum pissum*) of the herbal compound remedy " Vi trang an" on rat colon 8
- VŨ ĐỨC LỢI, NGUYỄN THỊ HƯỜNG: Isolation of some natural compounds from the ethylacetate extracts of the leaves of *Morus alba* (L.) grown in Thai Nguyen province 14
- 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: Development of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of several synthetic analgesic and inti-inflammatory drugs usually illegally used to adulterate herbal remedies 18
- NGUYỄN ĐÌNH DŨNG, NGUYỄN THU HẰNG, NGUYỄN DUY CHÍ, HỨA THÙY LINH: Determination of flavonoids in the bean coat of the green bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) by HPLC 23
- PHAN CƯỜNG HUY , PHẠM CẢNH EM, ĐỖ THỊ THÚY, TRƯƠNG NGỌC TUYỀN: Synthesis and antimicrobial, antifungal bioactibity of some N-anthranilic acid-substituted derivatives 29
- TRẦN HÙNG SƠN, NGUYỄN VĂN BẠCH, CAO VĂN ÁNH, NGUYỄN THỊ THANH PHƯƠNG, TRẦN MINH NGỌC, ĐÀO VĂN ĐÔN: Simultaneous quantitative determination of salvianolic acid B and tanshinone IIA in *Radix Salviae miltiorrhizae* by HPLC 33
- NGÔ DUY TÚY HÀ, HÀ VĂN HUỲNH ANH, TRƯƠNG ĐỖ QUYÊN, TRƯƠNG PHƯƠNG: Synthesis and evaluation of antimicrobial and antifungal potential of imin-thiourea derivatives 38
- NGUYỄN HUY VĂN, VŨ HƯƠNG THỦY, PHẠM THANH KỲ, NGUYỄN SƠN NAM: Study on current production of artichoke in Sapa (Lao Cai province) for proposal of an effective integration model of artichoke production for the local ethnic communities 43
- LỮ THỊ KIM CHI, HUỲNH TỰ THUẬT, NGUYỄN NGỌC VINH: Isolation of andrographolide from *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees and establishment of the corresponding reference substance 49
- NGUYỄN SƠN NAM, NGUYỄN TRUNG HÀ, NGUYỄN QUỲNH HOA: ABC-VEN analysis of the drug use in Military Central Hospital 108 in the year 2017 53
- ĐÀO THỊ THANH HIỀN, NGUYỄN LÂM HỒNG, TRẦN VIỆT HÙNG: Detection of phosphodiesterase-5 enzyme inhibitors medicines illegally added as adulterants to herbal drugs and dietary supplements by ^{1}H-NMR fingerprint 56
- TRẦN THANH HÀ, NGUYỄN VĂN ĐẬU, NGUYỄN HOÀNG MAI, PHẠM HÙNG VIỆT, DƯƠNG HỒNG ANH: Phytochemical study of the dichloromethane extracts of the lignum of *Luculia pinceana* (Hook.) 61
- NGUYỄN VIỆT DŨNG, NGUYỄN DUY THUẦN, PHẠM THỊ VÂN ANH, LÊ CẢNH VIỆT CƯỜNG, HÀ XUÂN ANH, LÊ THỊ LIÊN, HOÀNG LÊ TUẤN ANH, NGUYỄN PHAN HẰNG: Isolation of some flavonoids from the aerial parts of *Hypericum sampsonii* (Hance) 67

NEWS IN BRANCH

72

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

Đào Thị Cẩm Minh[1,2], Thái Khoa Bảo Châu[1,2]
Trần Tuấn Phong[1], Nguyễn Phúc Khánh Nhi[1], Trần Hữu Dũng[1]
Phạm Thị Thanh Hà[2*], Nguyễn Thị Kiều Anh[2]
[1]Trường Đại học Y Dược-Đại học Huế
[2]Trường Đại học Dược Hà Nội
** E-mail: thanhha.pham@gmail.com*

Summary

A liquid chromatography coupled with tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for simultaneous determination of 9 analgesic and anti-inflammatory drugs, illegally added as adulterants to relevant herbal products. Blank matrix was based on the corresponding traditional remedy (Vietnamese Pharmacopoeia IV). Simple and rapid sample treatment was performed by methanol extraction. LC-MS/MS conditions were chosen for simultaneous determination of these 9 substances and optimized for relatively short retention time. The method was validated in accordance with AOAC 2016 and ICH 2005 guidelines. On practical application, 30 herbal products were analyzed. Of these five were detected as adulterated with paracetamol, indomethacin and dexamethasone acetate.

Keywords: *NSAIDs, glucocorticoids, herbal products, adulteration, liquid chromatography, tandem mass spectroscopy.*

Đặt vấn đề

Đã từ lâu các loại thuốc đông dược và thực phẩm chức năng có nguồn gốc từ đông dược ngày càng được sử dụng rộng rãi không chỉ ở Việt Nam, mà còn trên nhiều nước trên thế giới. Gần đây, một số báo cáo cho thấy thuốc và thực phẩm chức năng có nguồn gốc đông dược đã được làm giả mạo bằng cách trộn thêm các tân dược nhằm cải thiện tác dụng và rút ngắn thời gian điều trị [6, 11]. Trong đó, nhóm thuốc giảm đau, kháng viêm phi steroid (NSAID) và corticoid là các nhóm thuốc phổ biến hay được phát hiện trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược dùng điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp [8, 11, 12]. Tại Việt Nam, liên tục có các báo cáo công bố về việc phát hiện tân dược giảm đau, kháng viêm trong chế phẩm đông dược. Năm 2001, Nguyễn Thị Lâm và CS đã phát hiện mẫu thuốc ban nóng ho có chứa paracetamol [1]. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã nhiều lần phát hiện các chế phẩm đông dược bị trộn trái phép tân dược: thuốc giải biểu hoàn và thuốc chỉ thống có trộn paracetamol (năm 2009), thuốc Khu phong tê thấp thủy và Truy phong tê thấp thủy bị trộn betamethasone (năm 2010), một số mẫu thuốc đông dược điều trị gút cũng bị phát hiện có paracetamol, indomethacin hay dexamethason acetat [3]. Dùng các chế phẩm đông dược có trộn lẫn tân dược nhóm giảm đau, kháng viêm với liều lớn và kéo dài rất nguy hiểm cho người bệnh với các biến chứng và tác dụng phụ nguy hiểm như buồn nôn, nôn, xuất huyết dạ dày, phản ứng da nghiêm trọng, rối loạn huyết học, suy thượng thận. Vì vậy, công tác kiểm tra phát hiện các loại tân dược trộn trái phép vào thuốc đông dược là việc làm rất cấp thiết, nhằm đảm bảo an toàn cho người tiêu dùng.

Trên thế giới đã có một số công bố về các phương pháp định tính, định lượng hiện đại và có độ chính xác cao như LC-MS/MS, HPTLC, LC-UV, NMR và LC-NMR phát hiện được rất nhiều các tân dược được trộn lẫn trong thuốc đông dược, thực phẩm chức năng[5, 8, 9]. Trong đó, LC-MS/MS là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, phù hợp với nền mẫu phức tạp như chế phẩm đông dược.

Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng qui trình định tính, định lượng đồng thời 9 chất thuộc nhóm giảm đau và chống viêm: paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon và prednison trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp LC/MS và ứng dụng phương pháp trên 30 chế phẩm đông dược thu thập trên thị trường.

Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Hoá chất-thuốc thử

Chất chuẩn: Paracetamol 100,04%; piroxicam 99,49%; ketoprofen 99,54%; indomethacin 99,7%; betamethason 100,42%; dexamethason acetat 99,6%; hydrocortison acetat 99,5%; prednisolon 99,94%; prednison 99,19% (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

Hoá chất, vật tư tiêu hao: Methanol (HPLC), acetonitril (HPLC); acid formic (PA); ether dầu hỏa, methanol, n-hexan, diclorometha n, aceton, ethanol 96%, isopropanol, ethyl acetat (AR). Cột sắc kí Restek Ultra II C18 (100 mm x 2,1 mm; 1,9 µm) – Mỹ.

Thiết bị nghiên cứu: Hệ thống LC –MS/MS EVOQ Qube (Bruker, Mỹ); cân phân tích chính xác đến 0,01 mg XPE105 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); cân kĩ thuật XP 320C (Presica, Thụy Sĩ); máy ly tâm Z306 (Hermle, Đức); máy siêu âm WUC A22H (Daihan, Hàn Quốc); máy lắc xoáy Vortex ZX3 (Velp, Ý).

Đối tượng nghiên cứu

Nền mẫu: Được xây dựng dựa trên bài thuốc cổ truyền Độc hoạt kí sinh thang trong DĐVN IV gồm 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 chế được xay mịn, cân lấy từng loại theo tỉ lệ trong bài thuốc, rây qua rây kích thước 0,5 mm rồi đồng nhất mẫu. Nền mẫu được bổ sung thêm tá dược và bào chế ở dạng viên nang tại phòng nghiên cứu và phát triển sản phẩm, Công ty cổ phần Traphaco.

Mẫu thử: 30 chế phẩm đông dược và thực phẩm bổ sung hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp (viêm khớp, phong tê thấp, gout) được thu mua trên thị trường từ các nhà thuốc, lương y và qua mạng internet. Dạng bào chế chủ yếu dạng rắn, gồm 3 thuốc bột, 8 hoàn cứng, 14 viên nang, 4 viên nén và 1 trà túi lọc.

Phương pháp nghiên cứu: Thu thập mẫu từ các hiệu thuốc, thuốc gia truyền và thuốc được gửi kiểm nghiệm có tác dụng điều trị, hỗ trợ và điều trị các bệnh xương khớp. Xử lý mẫu như sau: đồng nhất mẫu, cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu vào ống ly tâm. Thêm 20 ml ether dầu hỏa (30-60), lắc xoáy 5 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó gạn, làm khô trên bếp cách thủy ở 50°C. Thêm chính xác 25 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó lọc qua màng lọc 0,22 µm, lấy phần dịch lọc, pha loãng và phân tích bằng ***LC–MS/MS***.

Kết quả nghiên cứu

Xây dựng phương pháp LC-MS

Khảo sát điều kiện khối phổ

Sử dụng các dung dịch chuẩn đơn nồng độ 2000 ng/ml tiêm không qua cột vào hệ thống ***MS*** để xác định ion mẹ, ion con định lượng và ion con định tính đối với mỗi chất. Năng lượng bắn phá phân mảnh ion (CE) được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ. Từ đó, thu được các điều kiện khối phổ được trình bày trong bảng 1 và bảng 2. Phương pháp 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) [7].

Bảng 1. *Các thông số máy khối phổ* ***MS***

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

Bảng 2. *Điều kiện MS của các chất nghiên cứu*

Tên chất	*Ion mẹ (m/z)*	*Ion con (m/z)*	*CE (eV)*	*Tỉ lệ (%)*
Paracetamol	152,1	110,1	13	80,4
		93,2	20	19,6
Piroxicam	332,1	95,2	15	67,5
		121,1	19	32,5
Ketoprofen	255,1	209	10	61,3
		105,1	19	38,7
Indomethacin	358,1	139	16	78,8
		111,1	42	21,2
Dexamethason acetat	435,2	337,1	9	52,8
		397,1	6	47,2
Betamethason	393,2	373,1	5	71,5
		355,1	8	28,5
Hydrocortison acetat	405,2	327,1	13	70,1
		241,1	18	29,9
Prednisolon	361,2	343,1	6	82,8
		173	20	17,2
Prednison	359,2	341,1	7	62,9
		313,1	8	37,1

Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng

Thay đổi các thông số sắc ký lỏng, chúng tôi lựa chọn được điều kiện sắc ký lỏng tách 9 chất phân tích với pic gọn cân đối, tách rõ ràng, thời gian lưu tương đối ngắn như sau: cột Restek Ultra II C18 (100 mm

x 2,1 mm; 1,9 µm), pha động gồm acid formic 0,1% trong nước (A) và acid formic 0,1% trong acetonitril (B); tỉ lệ pha động: gradient (0 phút, 30% B; 7 phút, 70% B; 8,5 phút, 30% B; 12 phút, 30% B); tốc độ dòng: 0,3 ml/phút; thể tích tiêm: 2 µl; thời gian phân tích: 12 phút.

Thẩm định phương pháp

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 *(bảng 3)* cho thấy hệ số biến thiên (RSD) của thời gian lưu thấp (< 1%) và RSD của diện tích pic dao động trong khoảng 2,344 – 4,713% tùy mỗi chất. Như vậy hệ thống đáp ứng yêu cầu theo AOAC 2016, ICH 2005 (RSD < 15% với mức nồng độ ≤ 100 ppb) [4, 9].

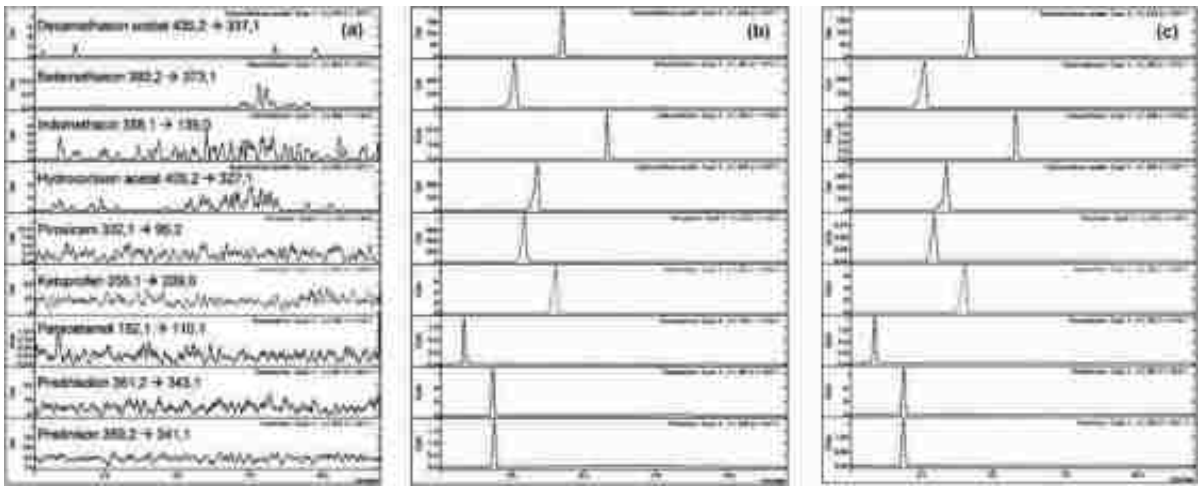
Bảng 3. *Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống **LC-MS/MS** (n = 6)*

Hoạt chất	t_R (phút)		S_{pic} (Cps)	
	Trung bình	RSD %	Trung bình	RSD %
Betamethason	2,646	0,412	4286,667	4,313
Dexamethason acetat	4,217	0,266	1506,167	3,943
Prednisolon	1,848	0,605	52111,833	4,470
Hydrocortison acetat	3,403	0,483	4664,667	3,726
Prednison	1,858	0,632	12683,667	2,579
Indomethacin	5,746	0,166	91552,500	2,344
Paracetamol	0,887	0,543	61979,500	4,535
Piroxicam	2,907	0,513	10621,167	4,713
Ketoprofen	4,019	0,401	94436,500	4,122

Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua kết quả phân tích mẫu trắng (xử lý mẫu nền theo quy trình xử lí mẫu), mẫu chuẩn (từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng với dung môi là 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) và 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). Kết quả được trình bày ở hình 1.

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. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu. Kết quả cho thấy phương pháp ***LC/MS*** là phương pháp phù hợp trong việc phân tích trên nền mẫu có nhiều thành phần như mẫu đông dược.



Hình 1. *Sắc kí đồ nền mẫu (a), mẫu trắng thêm chuẩn (b) và mẫu chuẩn (c)*

Trên các dạng nền mẫu đông dược đa dạng, chứa các thành phần dược liệu và tá dược phức tạp, khác nhau về cả tỉ lệ và thành phần giữa các nhà sản xuất, các phương pháp sắc kí thông thường như ***TLC, HPLC, HPTLC*** có thể gặp phải khó khăn ngay cả với yêu cầu đơn giản là định tính phát hiện. Với ***TLC***, nếu chỉ định tính bằng cách so sánh R_f (tương quan quãng đường dịch chuyển với chất chuẩn) thì nếu vết dược liệu trùng với vết tân dược, có thể dẫn đến kết quả dương tính giả. 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 quét và chồng phổ ***UV-VIS*** với chất chuẩn, sẽ cho kết quả chính xác hơn ***TLC***. Nếu vết dược liệu trùng với tân dược, có thể phát hiện được và kết luận âm tính nếu hệ số match không đạt. Tuy vậy, nếu chế phẩm là dương tính (có trộn tân dược) ở hàm lượng nhỏ, đồng thời vết lại bị trùng với một dược liệu nào đó ở hàm lượng lớn, 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 [1-2].

Phương pháp ***LC–MS/MS*** được xây dựng trong nghiên cứu này khắc phục được 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.

Khoảng tuyến tính

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 tỷ lệ diện tích pic các chất với nồng độ các chất được thể hiện trong bảng 4. Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic (r > 0,995) trong khoảng nồng độ 25 – 175 ng/ml đối với indomethacin, paracetamol, ketoprofen, prednison, hydrocortison acetat, prednisolon; trong khoảng nồng độ 5 – 35 ng/ml đối với piroxicam và trong khoảng nồng độ 7,5 – 52,5 ng/ml đối với dexamethason acetat, betamethason.

Bảng 4. *Sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các chất nghiên cứu*

Hoạt chất	Đường chuẩn	r	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Betamethason	y = 200,05x - 1488,7	0,9967	0,227	0,75
Dexamethason acetat	y = 73,824x - 486,71	0,9976	0,455	1,5
Prednisolon	y = 530,94x - 1565,6	0,9991	0,303	1
Hydrocortison acetat	y = 63,33x - 1527,7	0,9961	0,606	2
Prednison	y = 148,26x - 1450,6	0,9989	0,227	0,75
Indomethacin	y = 894,36x - 416,29	0,9992	0,076	0,25
Paracetamol	y = 489,84x - 1355,6	0,9969	0,455	1,5
Piroxicam	y = 659,31x - 2117,9	0,9984	0,076	0,25
Ketoprofen	y = 1008,5x - 6318,3	0,9996	0,152	0,5

LOD và LOQ

Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (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.

Tiến hành pha loãng dần dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp bằng dịch chiết mẫu trắng để xác định giá trị S/N của 9 chất trên sắc ký đồ thu được. Kết quả LOD và LOQ của 9 chất paracetamol, piroxicam, ketoprofen, indomethacin, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison được trình bày trong bảng 4.

Độ đúng và độ chính xác

Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng theo quy trình chiết đã xây dựng, thêm chuẩn ở 3 nồng độ thấp, trung bình, cao, mỗi nồng độ tiến hành phân tích 6 lần để xác định độ đúng và độ lặp trong ngày. Độ đúng và độ chính xác khác ngày được tiến hành tương tự như trên vào một ngày khác. Kết quả ở bảng 5 thể hiện tỷ lệ thu hồi của 9 chất phân tích dao động trong khoảng từ 91,29 – 102,72%; giá trị lặp lại của 9 chất phân tích có RSD nằm trong khoảng 2,00 – 5,86% và độ chính xác khác ngày của 9 chất phân tích có RSD nằm trong khoảng 2,75 – 6,08%, cho thấy phương pháp được xây dựng cho độ thu hồi và độ lặp lại đáp ứng theo yêu cầu của AOAC 2016 (độ thu hồi trong khoảng 80,0 - 110,0% ở nồng độ 150 ppb, RSD < 11% ở nồng độ 150 ppb) [4].

Bảng 5. *Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác (n = 6)*

Hoạt chất	$m^*_{thêm\ vào}$ (ng)	Trong ngày			Khác ngày		
		$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (TB% ± SD)	RSD (%)	$m_{tìm\ lại}$ (ng)	Độ đúng (TB% ± SD)	RSD (%)
Dexamethason acetat	15,181	15,145	99,76 ± 5,11	5,12	15,191	100,07 ± 3,11	3,11
	30,362	29,982	98,75 ± 4,02	4,07	29,254	96,35 ± 4,32	4,49
	45,543	42,979	94,37 ± 2,38	2,52	45,098	99,02 ± 3,26	3,29
Betamethason	14,969	14,323	95,69 ± 2,11	2,20	15,201	101,55 ± 3,42	3,37
	29,938	29,055	97,05 ± 3,34	3,44	28,899	96,53 ± 3,84	3,98
	44,907	44,282	98,61 ± 2,81	2,60	44,758	99,67 ± 3,00	2,75

Indomethacin	50,098	45,735	91,29 ± 3,38	3,70	101,091	101,09 ± 4,52	4,47
	100,197	99,750	99,55 ± 4,08	4,10	101,759	101,76 ± 4,64	4,56
	150,295	153,263	101,97 ± 4,76	4,67	97,152	97,15 ± 5,91	6,08
Hydrocortison acetat	50,082	49,701	99,24 ± 4,19	4,22	102,759	102,76 ± 3,49	3,39
	100,164	94,988	94,83 ± 2,56	2,70	95,152	95,15 ± 2,98	3,13
	150,246	145,430	96,79 ± 1,94	2,00	102,721	102,72 ± 4,12	4,01
Piroxicam	9,975	9,340	93,63 ± 4,66	4,98	10,228	102,53 ± 5,19	5,06
	19,950	18,747	93,97 ± 3,05	3,25	18,475	92,61 ± 3,06	3,31
	29,925	30,486	101,87 ± 4,81	4,72	30,325	101,34 ± 5,11	5,04
Ketoprofen	49,986	48,388	96,81 ± 4,59	4,74	49,887	99,8 ± 3,14	3,15
	99,971	97,144	97,17 ± 3,46	3,56	95,386	95,41 ± 3,67	3,85
	149,957	152,359	101,6 ± 4,21	4,15	152,157	101,47 ± 5,10	5,02
Paracetamol	50,045	50,083	100,08 ± 5,87	5,86	51,218	102,34 ± 6,23	6,08
	100,090	98,496	98,41 ± 3,09	3,14	102,710	102,62 ± 4,85	4,73
	150,136	152,912	101,85 ± 2,82	2,77	152,874	101,82 ± 3,34	3,28
Prednisolon	50,552	48,945	96,82 ± 3,35	3,46	49,670	98,25 ± 5,05	5,14
	101,104	93,143	92,13 ± 2,19	2,38	97,548	96,48 ± 4,19	4,34
	151,656	147,028	96,95 ± 2,28	2,36	154,641	101,97 ± 3,36	3,30
Prednison	49,901	50,617	101,43 ± 2,41	2,37	50,913	102,03 ± 4,19	4,11
	99,802	99,520	99,72 ± 4,1	4,11	96,342	96,53 ± 4,88	5,05
	149,703	150,219	100,34 ± 2,66	2,65	152,381	101,79 ± 4,00	3,93

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

Ứng dụng phương pháp

Để kiểm định mức độ khả thi và giá trị ứng dụng của phương pháp ***LC-MS/MS*** được xây dựng, nhóm nghiên cứu đã thu thập trên thị trường và phân tích 30 mẫu chế phẩm đông dược dạng viên nén, viên nang, viên hoàn, thuốc bột, được chỉ định điều trị, hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp. 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 2) của các chất phân tích như trong các nghiên cứu thường gặp [5, 10, 12] chúng tôi tiến hành xác định thêm tỉ 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.

Kết quả cho thấy không phát hiện mẫu nào dương tính với piroxicam, ketoprofen, betamethason, hydrocortison acetat, prednisolon và prednison, trong khi có hai mẫu dương tính với paracetamol (77,28 mg/g và 590,78 mg/g), một mẫu dương tính với dexamethason acetat (0,07 mg/g). Đồng thời phát hiện một mẫu dương tính với cả hai chất paracetamol (76,52 mg/g) và indomethacin (0,89 mg/g), một mẫu dương tính với hai chất paracetamol (56,94 mg/g) và dexamethason acetat (0,14 mg/g). Điều đó đã cho thấy tính ưu việt của phương pháp này trong việc xác định được đồng thời nhiều tân dược trộn lẫn trong một mẫu đông dược trên cùng một lần phân tích, nhằm đảm bảo kết quả phân tích chính xác, nhanh chóng và tiện lợi.

Kết luận

Như vậy, phương pháp ***LC-MS/MS*** được xây dựng có thể phân tích đồng thời 9 thuốc giảm đau và chống viêm (paracetamol, piroxicam, ketoprofen, indomethacin, betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon và prednison) có thể bị trộn trái phép trong chế phẩm đông dược dùng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp. Phương pháp được thực hiện với kỹ thuật xử lý mẫu đơn giản, dung môi chiết ít độc hại, phương pháp có tính đặc hiệu cao với số điểm IP = 4, có giới hạn phát hiện thấp (0,076 - 0,606 ng/ml), tuyến tính trong khoảng khảo sát: 25 – 175 ng/ml đối với indomethacin, paracetamol, ketoprofen, prednison, hydrocortison acetat, prednisolon; 5 – 35 ng/ml đối với piroxicam và 7,5 – 52,5 ng/ml đối với dexamethason acetat,

(Xem tiếp trang 32)

derivatives", *Iranian J. of Pharmaceutical Research*,12 (2), pp. 319-323

2. Ashok Kumar et al. (2003), "Synthesis of some newer derivatives of 2-amino benzoic acid as potent anti-inflammatory and analgesic agents", *Bioorg. & Med. Chem.*, 11, pp. 5281–5291.

3. Dileep Tiwari et al. (2011), "Synthesis and pharmacological screening of N-substituted anthranilic acid derivatives", *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 3 (2), pp. 265-271.

4. Kumar A., Bansal D., Bajaj K., Sharma S., Archana and Srivastava K.V., (2003). "Synthesis of some newer anti-inflammatory and analgesic agents". *Bio. Med. Chem.*, Vol. 11, pp. 5228-5291.

5. Ming-Zhi Zhang et al., (2013). Synthesis and antifungal activity of 3-(1,3,4-oxadiazole-5-yl)-indoles and 3-(1,3,4-oxadiazole-5-yl)methyl-indoles. *Eur. J. Med. Chem.*, 63, pp. 22-32.

6. Sharma S., Srivastava K. V. and Kumar A., (2002). "Newer N-substituted anthranilic acid derivatives as potent anti-inflammatory agents". *Eur. J. Med. Chem.*, Vol. 37, pp. 689-697.

7. Zafer Asim Kaplancikli (2011), "Synthesis of some oxadiazole derivatives as new anticandidal agents", *Molecules*, 16 pp. 7662-7671.

(*Ngày nhận bài: 13/01/2018 - Ngày phản biện: 02/03/2018 - Ngày duyệt đăng: 15/03/2018)*

Xây dựng phương pháp... *(Tiếp theo trang 22)*

betamethason (với r > 0,995); độ chính xác và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC 2016 (RSD < 11%, độ thu hồi trong khoảng 80,0 - 110,0% ở nồng độ 150 ppb).

Kết quả phân tích trên 30 mẫu chế phẩm đông dược đã phát hiện 5 chế phẩm bị trộn trái phép các hoạt chất giảm đau và chống viêm (cả nhóm NSAID và corticoid). Đây là một kết quả phân tích có ý nghĩa rất lớn về khoa học và giá trị thực tiễn trong công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc, thể hiện tính ưu việt của phương pháp khi trên một lần phân tích có thể xác định được sự có mặt hay không của nhiều tân dược nhóm giảm đau, kháng viêm trong mẫu chế phẩm đông dược, cho kết quả chính xác, nhanh chóng và tiết kiệm thời gian.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Lâm và CS (2001), "Một số kinh nghiệm về việc phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép vào thuốc đông dược", *Kỷ yếu các công trình nghiên cứu khoa học 1996-2000*, Viện Kiểm nghiệm – Bộ Y tế, 95–98.

2. Đào Thị Cẩm Minh, Nguyễn Thị Hà, Lê Thị Trâm, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh (2016), "Xây dựng phương pháp xác định một số thuốc giảm đau, chống viêm trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 4+5, 91–96.

3. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), "Công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2010, định hướng năm 2011", *Báo cáo Hội nghị Kiểm nghiệm 2010*.

4. AOAC International (2016), "Guidelines for standard method performance requirements", *AOAC Official Methods of Analysis*, 1–18.

5. Bogusz M. J., Hassan H. et al. (2006), "Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies", *J. of Pharm. and Biomedical Analysis*, 41(2), 554–564.

6. Ernst E (2002), ''Adulteration of chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review", *J. of Internal Medicine,* 252, 107–113.

7. European Commission (2002), "Commission decision 2002/657/EC implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results", *Official J. of the Eur. Communities*, 8–36.

8. Health Sciences Authority (2007), HSA cautions consumers against taking two chinese proprietary medicines "zhen feng da brand xi tong wan" and "wellring brand yin qiao jie du tablets" found adulterated with indomethacin and paracetamol respectively, *Press Release, Singapore*, 1–4.

9. International Conference on Harmonisation (2005), "Validation of analytical procedures: Text and methodology", *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 1–13.

10. Kim H. J., Lee J. H. et al. (2014), "Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS", *Food Additives & Contaminants,* Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 31(6), 973-978.

11. Nuryunarsih D (2016), "Counterfeit herbal medicine adulterated with chemical drugs in Indonesia: NADFC public warning 2011-2014", *Inter. J. of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 1(1), 2–17.

12.Savaliya A. A., Prasad B. et al. (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(8), 372–381.

(*Ngày nhận bài: 25/01/2018 - Ngày phản biện: 02/03/2018 - Ngày duyệt đăng: 15/03/2018*)

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

VĂN BẢN ĐỒNG Ý CHO SỬ DỤNG BÀI BÁO/CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA ĐỒNG TÁC GIẢ

Chúng tôi là:

1. Nguyễn Thị Kiều Anh, công tác tại Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, trường ĐH Dược Hà Nội.
2. Phạm Thị Thanh Hà, công tác tại Bộ môn Hóa Phân tích-Độc chất, trường ĐH Dược Hà Nội.
3. Trần Hữu Dũng, công tác tại Khoa Dược, trường Đại học Y Dược Huế.
4. Thái Khoa Bảo Châu, công tác tại Khoa Dược, trường Đại học Y Dược Huế.
5. Trần Tuấn Phong, công tác tại công ty TNHH Servier Việt Nam.
6. Nguyễn Phúc Khánh Nhi, công tác tại Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung.

Là đồng tác giả với NCS Đào Thị Cẩm Minh trong 1 bài báo/công trình nghiên cứu sau đây:

1. 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.

Tôi hoàn toàn đồng ý cho NCS Đào Thị Cẩm Minh được sử dụng nội dung các bài báo/công trình nghiên cứu trên vào mục đích nghiên cứu, viết và báo cáo luận án tiến sĩ của NCS ở các cấp.

Hà Nội, ngày 06 tháng 04 năm 2019

Đồng tác giả

Nguyễn Thị Kiều Anh	Phạm Thị Thanh Hà	Trần Hữu Dũng
Thái Khoa Bảo Châu	Trần Tuấn Phong	Nguyễn Phúc Khánh Nhi

HỘI KHOA HỌC KỸ THUẬT PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC VIỆT NAM
VIETNAM ANALYTICAL SCIENCES SOCIETY

ISSN - 0868 - 3224

Tạp chí PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC

Journal of Analytical Sciences

T - 23

Số 5 (Đặc biệt)

2018

HỘI NGHỊ KHOA HỌC KIỂM NGHIỆM THỰC PHẨM 2018

HA NOI

MỤC LỤC

Trang

CONTENTS

1. Xác định hàm lượng Ascorbyl Palmitate trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao — 1
Determination of Ascorbyl Pamitate in functional food by high performance liquid chromatogrphy
Lưu Thị Huyền Trang, Vũ Thị Trang, Lê Thị Thủy, Vũ Thị Kim Oanh, Lê Thị Hồng Hảo

2. Xác định một số chất tạo ngọt nhóm polyols trong thực phẩm bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector đo độ dẫn không tiếp xúc (CE-C^4D) — 6
Determination of polyol sweeteners in food samples by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C^4D)
Phạm Thị Thu Phương, Nguyễn Thị Ánh Hường, Lê Thị Hồng Hảo, Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Thị Thanh Bình

3. Xây dựng phương pháp xác định các chất ức chế Phosphodiesterase-5 tổng hợp trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) — 11
Study on determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors illegal adulterated in herbal products by high performance thin layer chromatography (HPTLC)
Đào Thị Cẩm Minh, Nguyễn Thị Thanh Huyền, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh

4. Ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng đánh giá tỷ lệ các thành phần Flavonoids trong các chế phẩm thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe có chứa cao lá bạch quả — 17
Application of high performance liquid chromatography for the determination of flavonoids components in drugs and supplements consisting of gingko biloba leaft extract
Nguyễn Thành Đạt, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Đàm Thị Thu Dương Thế Bắc, Hoàng Thị Nhung, Lại Thị Phượng

5. Nghiên cứu tạo độc tố ruột tụ cầu loại C1 (sec1) tái tổ hợp trong Escherichia coli — 21
Generation of recombinant staphylococcal enterotoxin type C1 (sec1) in Escherichia coli
Trần Thị Sao Mai, Phạm Tiến Dũng, Lê Quang Hòa

6. Khảo sát khả năng ứng dụng của bộ kit thử nhanh kiểm tra dư lượng Clenbuterol, Ractopamine và Salbutamol trong thịt heo — 28
Validation of commercial rapid test kits for β_2-Agonists residues detection in pork
Nguyễn Hương Giang, Ngô Thị Lư, Huỳnh Khánh Duy, Lê Huỳnh Long

7. Xác định tính chống oxy hóa của một số Anthocyanin và Anthocyanidin bằng phương pháp đo quang sử dụng phản ứng với 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) — 33
Determination of antioxidant activity of Anthocyanidins and Anthocyanins by uv-vis using reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Đức Hảo, Nguyễn Hoài Thu, Lê Hoàng Đức, Nguyễn Xuân Trung

8. Xác định hàm lượng Cysteine trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp UV-VIS sử dụng hạt nano vàng 39
Determination of cysteine in funtional foods by UV-VIS method using gold nanoparticles
Nguyễn Văn Trang, Dương Minh Ngọc, Nguyễn Thùy Linh, Nguyễn Hoài Thu, Phạm Tiến Đức, Nguyễn Thị Ánh Hường, Phạm Thị Ngọc Mai

9. Tổng hợp các công cụ thống kê nhằm đánh giá quy trình đảm bảo chất lượng kiểm nghiệm thực phẩm hướng tới xây dựng phần mềm quản lý, kiểm soát kiểm nghiệm 44
Statistical tools for quality assurance infood analysis and developing software for foodcontrol and management
Trần Thị Oanh, Nguyễn Minh Lân, Nguyễn Thị Hồng Ngân

10. Xác định sự gian lận thịt gia súc (trâu, bò, lợn) trong các sản phẩm thịt 53
Fraud identification of cattle meat (buffalo meat, beef, pork) in meat products
Nguyễn Thị Giang , Đặng Thị Hường, Nguyễn Thùy Linh, Lê Thị Kim Chung, Trần Văn Sơn, Lê Thị Hồng Hảo

11. Ứng dụng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C^4D) xác định đồng thời một số khoáng chất trong gạo 58
Application of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detector (CE-C^4D) for simultaneous determination of some minerals in rice
Nguyễn Thị Quỳnh Hoa, Nguyễn Thị Đông, Vương Sỹ Thủy Quỳnh Hoàng Quốc Anh, Nguyễn Thị Ánh Hường

12. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng alpha Lipoic acid bằng HPLC với detector UV-VIS trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe 62
Method development and validation for determination of alpha lipoic acid in dietary supplements by RP-HPLC-UV
Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Mạc Thị Thanh Hoa, Dương Thi Mai Hoa, Cao Công Khánh, Lê Thị Hồng Hảo

13. Đánh giá sự tích lũy Cd và Cu ở cá rô phi vằn và rủi ro sức khỏe đối với người sử dụng 67
Assessment of accumulation Cd, Cu in fish orecochromis niloticus and health risk assessment for users
Nguyễn Minh Trí, Lê Thị Nam Thuận, Võ Văn Quý, Lê Thị Ngọc Trân

14. Xác định đồng thời một số Nitrosamin trong sản phẩm thịt nướng bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ hai lần 72
Simultaneous determination of nitrosamines in grilled meats by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)
Trần Cao Sơn, Bùi Cao Tiến, Đỗ Thị Thu Hằng, Lê Thị Hồng Hảo

15. Ứng dụng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ trong việc xác định dư lượng các chất chuyển hóa nhóm Nitrofuran trong cá và tôm 79
Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of nitrofuran metabolite residues in fish and shrimp
Lê Anh Tuấn, Võ Hồng Nhân, Trần Ngọc Minh Tuấn, Nguyễn Đức Thịnh

16. Xác định 2-methylimidazolvà 42-methylimidazol trong nước giải khát bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần 83
Determination of 4-methylimidazole and 2-methylimidazole in beverage using liquid chromatography mass tandem spectrometry
Bùi Cao Tiến, Trần Cao Sơn

17. Phát hiện dấu vết động vật trong thực phẩm chay bằng phương pháp PCR và real-time PCR 89
Detection of animal traces in vegetarian food using PCR and real-time PCR
Nguyễn Thị Mỹ Linh, Hồ Huỳnh Thùy Dương, Tạ Đăng Khoa
Hồ Huỳnh Thùy Dương

18. Thẩm định phương pháp định lượng Coenzyme Q10 trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector UV-VIS 94
Method validation for quantification of coenzyme Q10 in dietary supplements by high performance liquid chromatography with UV-VIS detection
Mạc Thị Thanh Hoa, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Cao Công Khánh, Lê Thị Hồng Hảo

19. Phát hiện nhanh hàn the trong thực phẩm bằng giấy Curcumin 98
Rapid detection for borax in food by curcumin paper
Thùy Châu Từ, Lê Thị Huỳnh Như

20. Phân tích dư lượng thuốc trừ sâu cơ clo (OCPs) trong chè bằng phương pháp sắc kí khí khối phổ GC/MS 102
Analysis of organochlorine pesticides (OCPs) residues in tea samples by gas chromatography-mass spectroscopy GC/MS
Lê Quang Hưởng, Nguyễn Thị Ánh Hường, Phạm Thị Ngọc Mai,
Phạm Thị Phương Thảo, Vũ Đức Nam, Nguyễn Quang Trung

21. Nghiên cứu xác định hàm lượng Caffeine trong mẫu chè bằng phương pháp Von-ampe hòa tan hấp phụ sử dụng điện cực than gương biến tính Nafion 107
Determination of caffeine in tea samples by adsorptive stripping voltammetry method using nafion modified glassy carbon electrode
Nguyễn Thị Kim Thường, Phạm Tuấn Anh, Trần Ngọc Minh, Trần Gia Khải

22. Ứng dụng phương pháp ICP-MS nhằm bước đầu đánh giá mức độ ô nhiễm một số kim loại nặng trong thực phẩm gần khu khai thác mỏ ở Thái Nguyên 112
Application of icp-ms to assess the level of heavy metals in food collected at the vicinity of mining areas in Thai Nguyen
Đinh Viết Chiến, Lê Thái Bình, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hường,
Lê Hữu Tuyến, Nguyễn Văn Anh, Nguyễn Xuân Trường

23. Tỷ lệ nhiễm Staphylococcus Aureus trong nhóm sản phẩm thịt sử dụng trực tiếp tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2017 117
The rate of staphylococcus aureus contamination in ready-to eat (rte) meat in ho chi minh city in 2017
Nguyễn Đỗ Phúc, Nguyễn Thị Hoàng Oanh

24. Xác định đồng thời 19 chất màu cấm trong gia vị bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần 121
Simultaneous determination of 19 illegal dyes in spices by liquid chromatography tandem mass spectrometry
Nguyễn Thị Hà Bình, Trần Cao Sơn, Phạm Thị Minh Hải, Nguyễn Thị Kiều Anh

25. Xác định polyphenol trong thực vật bằng phương pháp quang học sử dụng thuốc thử Folin-ciocalteu 126
Determination of polyphenol in plants by photometric method using folin-ciocalteu reagent
Lê Thái Bình, Đoàn Thị Thanh Hương, Nguyễn Thị Ánh Hường, Phạm Thị Ngọc Mai

26. Xác định đồng thời vitamin K_1 và vitamin K_2 trong thực phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ LC – MS/MS 130
Simultaneous determination of vitamin K_1 and vitamin K_2 in food, functional food by LC – MS/MS
Lê Việt Ngân, Đinh Viết Chiến , Lê Thị Thủy, Vũ Thị Trang, Lê Thị Hồng Hảo

27. Xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật Fenobucarb trong mẫu rau bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) 135
Determination of fenobucarb residue in vegetable by high performance liquid chromatography (HPLC)
Nguyễn Thị Thanh Hương, Phạm Thị Buởi, Lê Thị Hường, Nguyễn Phương Linh, Nguyễn Anh Vũ, Lê Hồng Sơn, Nguyễn Bích Hạnh

28. Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định đồng thời Hydroxytyrosol và Oleuropein trong thực phẩm chức năng bằng kỹ thuật HPLC-PDA 140
Development and validation of hplc-pda method for the simultaneous determination of hydroxytyrosol and oleuropein in dietary supplement
Cao Công Khánh, Mạc Thị Thanh Hoa, Lê Thị Hồng Hảo

29. Định lượng Collagen type 2 trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp Western blot 145
Quantification of collagen type II in supplement foods using Western blot method
Đặng Thị Hường, Nguyễn Thị Giang, Nguyễn Thùy Linh, Lê Thị Kim Chung, Lê Thị Hồng Hảo

30. Nghiên cứu thực trạng sử dụng hàn the trong một số thực phẩm lưu thông tại 9 chợ ở thành phố Nam Định năm 2016 150
Survey on borax using in food at Nam Dinh city in 2016
Trần Thị Khánh Linh, Lê Lợi

31. Khảo sát hàm lượng 3 hoạt chất nhóm Curcuminoid trong nghệ vàng và một số sản phẩm làm từ nghệ vàng trên địa bàn Hà Nội 156
A study of 3 main substances of curcuminoids content in tumeric and turmeric powder in some of hanoi areas
Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Bạch Thủy Anh, Cao Công Khánh, Lê Thị Hồng Hảo

32. Nghiên cứu phương pháp xác định hàm lượng Immunoglobulin G (IgG) trong sữa và sản phẩm từ sữa bằng sắc ký lỏng 162
Determination of immunoglobulin G (IgG) in milk and dairy products by liquid chromatography
Nguyễn Thị Minh Hoà, Nguyễn Thị Hà Bình, Trần Cao Sơn, Lê Đình Cảnh

33. Xác định đồng thời Aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong thực phẩm bằng UPLC-MS/MS 168
Simultaneous determination of aflatoxin b1 and aflatoxin (B1, B2, G1, G2) in food by UPLC-MS/MS
Nguyễn Thị Kim Xuyến, Trần Thị Ngọc Yến, Nguyễn Hữu Truyền, Phạm Bích Kiều

34. Xác định Methyl thủy ngân trong mẫu thủy sản bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối khối phổ plasma cao tần cảm ứng (LC-ICP-MS) 173
Determination of methyl mercury in seafood samples by liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS)
Phạm Công Hiếu, Chu Văn Kết, Đinh Viết Chiến, Lê Đức Dũng, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Thị Ánh Hường, Lê Thị Hồng Hảo, Phạm Công Hiếu, Đinh Viết Chiến, Lê Thị Hồng Hảo

35. Xác định hàm lượng Hypoglycine A trong quả vải bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần 177
Determination of Hypoglycine A in Vietnamese lychee by liquid chromatography tandem mass spectrometry
Trần Cao Sơn, Bạch Thủy Anh, Bùi Cao Tiến,Phạm Văn Phú, Nguyễn Thị Oanh, Lê Thị Hồng Hảo, Nguyễn Thị Ánh Hường

36. Simultaneous determination of okadaic acid, dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 in bivalve mollusk by LC-MS/MS 183
Xác định đồng thời Acid Okadaic, Dinophysistoxin-1 và Dinophysistoxin-2 trong nhuyễn thể hai mảnh vỏ bằng LC-MS/MS
Tống Thị Thanh Vượng, Lê Đình Chi, Trần Cao Sơn, Lê Thị Hồng Hảo

37. Application of CE-C^4D method for determination of cyanidin-3-glucoside in fruit juice, beverage and red wine 189
Ứng dụng phương pháp CE-C^4D để xác định hàm lượng Cyanidin-3-glucoside trong một số mẫu nước quả, đồ uống và rượu vang đỏ
Vu Thi Trang, Le Thi Hong Hao, Pham Do Thu Huyen, Nguyen Xuan Trung

38. Arsenic specification by HPLC-ICP-DRC-QMS: application for rice samples 194
Phân tích 5 dạng Asen bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối phổ khối lượng cao tần cảm ứng plasma sử dụng buồng phản ứng động học: ứng dụng để phân tích mẫu gạo
Vu Hai Anh, Nguyen Manh Ha, Tu Binh Minh, Chu Dinh Binh, Nguyen Thi Huong Giang

39. Simultaneous determination of 82 pesticides in food by gas chromatography - tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) 203
Xác định đồng thời 82 thuốc bảo vệ thực vật trong thực phẩm bằng kỹ thuật sắc ký khí ghép nối khối phổ (GC-MS/MS)
Huu Vinh Nguyen, Quoc Phuong Vuong, Tho Nguyen, Thi Phuong Le, Muoi Mat Van Nguyen, Quoc Viet Ngo, Hong-Thao Nguyen

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT ỨC CHẾ PHOSPHODIESTERASE-5 TRỘN TRÁI PHÉP TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC BẰNG SẮC KÝ LỚP MỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPTLC)

Đến tòa soạn 1-8-2018

Đào Thị Cẩm Minh
Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế - Đại học Huế
Nguyễn Thị Thanh Huyền
Bộ môn Hóa học, Trường Cao đẳng Trung ương Dược Hải Dương
Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh
Bộ môn Hóa phân tích và Độc chất, Trường Đại học Dược Hà Nội

SUMMARY

STUDY ON DETERMINATION OF SYNTHETIC PHOSPHODIESTERASE-5 INHIBITORS ILLEGAL ADULTERATED IN HERBAL PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (HPTLC)

The use of herbal remedies and dietary supplements for treatment for male erectile dysfunction has greatly increased. However, some herbal products advertised as "all natural" hal been found to be adulterated with synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors such as sildenafil, vardenafil and tadalafil. The objective of this study was to develop rapid, sensitive and selective high performance thin layer chromatography method and to quantify amount of sildenafil, vardenafil, tadalafil in real samples. The mobile phase comprised of ethylacetate-iso propanol-ammoniac 25% (45:5:2.6, v/v/v). These methods were validated in terms of selectivity, linearity, accuracy and precision in accordance with AOAC, ICH guidelines. The HPTLC method was applied on 24 products, and there were5 positive samples with sildenafil, 4 positivesamples with tadalafil, 1positive samples with vardenafil.

***Keyword**: Synthetic phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, high performance thin layer chromatography, herbal product.*

1. MỞ ĐẦU

Theo các số liệu khảo sát năm 2017 cho thấy có trên 50% nam giới bị rối loạn cương dương ở độ tuổi từ 40 – 70; theo ước tính đến năm 2025, số lượng nam giới mắc rối loạn cương dương cần mốc 320 triệu người[1].Phần lớn nam giới khi mắc bệnh đều rất e ngại, ngại đi khám, ngại chia sẻ nên thường tự đi mua thuốc về uống. Bên cạnh các thuốc hóa dượcnhóm ức chế phosphodiesterase-5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil), các thuốc đông dược và thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) có nguồn gốc từ thảo dược, bài thuốc dân gian cũng có tác dụng điều trị, hỗ trợ điều trị rối loạn cương dương. Do vậy, tình trạng chế phẩm đông dược gồm thuốc đông dược,TPBVSKbị trộn trái phép chất ức chế phosphodiesterase-5 (PDE-5) đã và đang diễn ra, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng và uy tín của các cơ sở sản xuất đông dược.

Hiện nay,đã có một số công bố sử dụng các phương pháp phân tích hiện đại để phát

hiệncác thuốc ức chế PDE-5trộn trái phép trong đông dược như TLC, HPLC, LC-MS/MS, NMR, TLC-SERS...[2],[6],[8], [3],[9]. Trong đó, phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) là hình thức tiến tiến của sắc ký lớp mỏng với kích thước hạtpha tĩnh giảm xuống khoảng 5 µm, độ đồng đều cao cho phép nâng cao hiệu quả táchrõ rệt so với bản mỏngthông thường.Mặt khác, thiết bị HPTLC đồng bộ có thể thực hiện tự động hoặc bán tự động quá trình sắc ký từ phun mẫu, triển khai mẫu, nhận diện vết nênrất hiệu quả trong định lượng.Do đó, HPTLC đáp ứngnhu cầu cấp thiết được đặt ra là phát hiện sildenafil, vardenafil, tadalafil trộn lẫn trong chế phẩm đông dược một cách nhanh chóng, có tính đặc hiệu cao, đồng thời ứng dụng phương pháp định tính và định lượng các thuốc này trộn trong các chế phẩm đông dược đang lưu hành trên thị trường Việt Nam, bảo vệ quyền lợi người tiêu dùng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Chất chuẩn: sildenafil citrat hàm lượng 98.28% (số lô WS.0316265.03), tadalafil hydroclorid hàm lượng 97.65%, số lô (WS. 0215264.02) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Vardenafil hydroclorid, hàm lượng 100%,(CAS Number: 330808-88-3) của Hội đồng Dược Điển Châu Âu.Dung môi hữu cơ đạt độ tinh khiết phân tích.Bản mỏng HPTLC silicagel 60 F254của Merck (Đức). Hệ thống sắc kí lớp mỏng hiệu năng cao HPTLC CAMAG, CAT No 027.6200 (Thụy Sỹ): bộ phận chấm bán tự động, bộ phận khai triển tự động, máy chụp ảnh, phần mềm điều khiển winCATS và phần mềm videoScan của CAMAG.

Mẫu thử: 24 chế phẩm đông dược (22sản phẩm có số đăng ký, 02 sản phẩm thuốc đông dược mua của lương y) gồm 02 mẫu viên hoàn, 21 mẫu viên nang,01 mẫu cao thuốc có chỉ định 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.***Mẫu nền (mẫu placebo)***gồm 3 nền mẫu có thành phầnđược xây dựng dựa trên các bài thuốc cổ truyền: nền viên nang dựa trên bài thuốc *Hoàn sâm nhung bổ thận* trong Dược điển Việt Nam IV gồm 23 vị dược liệu, nền viên hoàn dựa trên bài thuốc *Minh mạng thang* gồm 20 vị dược liệu, nền cao thuốc dựa trên bài thuốc *Điều nguyên cửu bản thang* trong Hải Thượng Y tông tâm lĩnh gồm 6 vị dược liệu;các dược liệu được nấu thành cao hoặc xay thành bột, được bổ sung thêm tá dược và bào chế tại phòng nghiên cứu phát triển của Công ty cổ phần Traphaco.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký: phương pháp HPTLC gồm pha tĩnh HPTLC silica gel 60 F254;phát hiện dưới đèn UV 254 nm và quét phổ vết tương ứng của chất phân tích trên máy scanner để định tính và lựa chọn bước sóng định lượng; thể tích phun mẫu 5µl, thời gian bão hòa dung môi 20 phút, thời gian sấy bản mỏng sau triển khai 20 phút. Khảosát bằng thực nghiệm các hệ dung môi pha động, lựa chọn dung môi khai triển tách được sildenafil, tadalafil, vardenafilcho kết quảvết gọn.

Khảo sát và lựa chọn điều kiện xử lý mẫu: dựa vào khả năng hòa tan của các chất nghiên cứu trong dung môi [5] và tham khảo kết quả của các nghiên cứu[2],[7], khảo sát bằng thực nghiệm các hệ dung môi chiết gồm methanol, methanol-nước(70:30), methanol-nước-amoniac25% (75:25:1), acetonitril, từ đó lựa chọn dung môi cho hiệu suất chiết cao.Quy trình xử lí mẫu dự kiến là: nghiền mịn mẫu, cân chính xác một lượng mẫu tương ứng với khoảng ½ liều dùng mẫu thử/ mẫu placebo vào ống ly tâm. Thêm 25ml dung môi chiết. Lắc xoáy 5 phút, siêu âm 20 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, lọc qua màng lọc 0,45µm, chấm sắc ký.

Thẩm định phương pháp: theo hướng dẫn của AOAC[4], ICH với các tiêu chí gồm độ đặc hiệu, độ phù hợp của hệ thống, độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại, độ đúng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1.Xây dựng phương pháp xác định chất ức chế PDE-5 trộn lẫn trong chế phẩm đông dược

Khảo sát điều kiện sắc ký: Các chất nhóm ức chế PDE-5 được trộn lẫn trong chế phẩm đông dược thường là sildenafil, vardenafil, tadalafil. Khảosáttrênbảnmỏngsilicagel 60 F254(10×10cm) với các hệ pha động **1)**cloroform-methanol-amoniac(90:1:5); **2)** terbutylmethylether-amoniac-methanol (20:2:1); **3)** cloroform:methanol: diethylamin (90:10:1); **4)** ethylacetat-isopropanol-amoniac (45:5:1); **5)** ethanol-n-hexan -amoniac (70:30:1). Kết quả cho thấy hệ **4** cho vết củacác chất nghiên cứu tách gọn, rõ ràng. Tuy nhiên, sildenafil có R_f thấp, do đó cần tiếp tục điều chỉnh tỷ lệ dung môi.Kết quả ở hình 1 phân tích với hệ ethyl acetat-isopropanol-amoniac 25% (45:5:2,6) cho R_f của sildenafil, vardenafil, tadalafil tương ứng 0,21; 0,35; 0,56 (đạt yêu cầu R_f từ 0,2-0,8). Từ đó, hệ ethyl acetat-isopropanol-amoniac 25% (45:5:2,6) được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Kết quả khảo xát hệ dung môi pha độngphát hiện tại bước sóng UV 254nm
1: sildenafil chuẩn; 2: vardenafil chuẩn; 3: hỗn hợp chuẩn;4: tadalafil chuẩn

Khảo sát bước sóng phát hiện: Quét phổ tại các vết tương ứng các chất trên sắc ký đồ. Kết quả cho thấy sildenafil có 2 cực đại hấp thụ tại 232nm và 304 nm, ở 304 nm cho đáp ứng cao hơn;cực đại hấp thụ củavardenafil là 251nm; tadalafil có 2 cực đại hấp thụ tại 235 và 285 và nm, độ hấp thụ ở 285 nm cao hơn. Do đó, lựa chọn bước sóng định lượng của đối với sildenafil, vardenafil và tadalafil lần lượt là 304nm, 251nm và 285 nm.

Khảo sát lựa chọn dung môi chiết: Đối với các mẫu đông dược khi trộn lẫn tân dược phải ở mức liều có tác dụng dược lý, đặc biệt với các chất ức chế PDE-5 cần phải có hiệu quả rõ rệt, nhanh. Do đó, lượng mẫu dự kiến khoảng ½ liều căn cứ vào liều dùng của các chế phẩm đông dược. Khảo sát 5 qui trình để chiết bằng cách cân lượng nền mẫu placebo khoảng 0,5 g placebo, thêm hỗn hợp 3 chất phân tích, sau đó tiến hành sắc ký.Mỗi mẫu làm lập lại 3 lần lấy kết quả trung bình.Tính hiệu suất của từng chất trong các nền viên nang, viên hoàn, cao thuốcđể lựa chọn được hệ dung môi chiết hiệu suất cao.Khả năng chiết (diện tích pic/ khối lượng mẫu: A/m) đối với hỗn hợp chất nghiên cứu ở mẫu chế phẩm đông dược bằng dung môi methanol là cao nhất (hình 2); vết sắc ký gọn, sắc nét. Do vậy, lựa chọn methanol làm dung môi chiết.

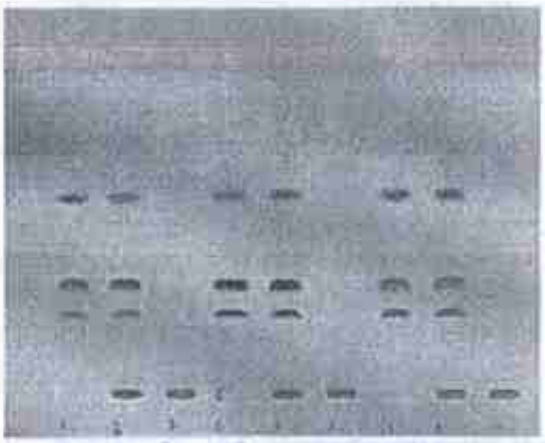


Hình 2. Kết quả khảo sát hệ dung môi chiết

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Tính chọn lọc: Phân tích đồng thời 3 mẫu gồm hỗn hợp chuẩnsildenafil (SIL), tadalafil (TAD), vardenafil (VAR) nồng độ 1mg/ml, mẫu placebo và mẫu placebo thêm chuẩn nồng độ mg/ml trên hệ thống HPTLC. Kết quả ở hình 3cho thấy trên sắc ký đồ của mẫu nền thêm chuẩn xuất hiện pic 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; vardenafil là 0,35; tadalafil là 0,56). Trên sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện vết tương ứng về vị trí với vết của

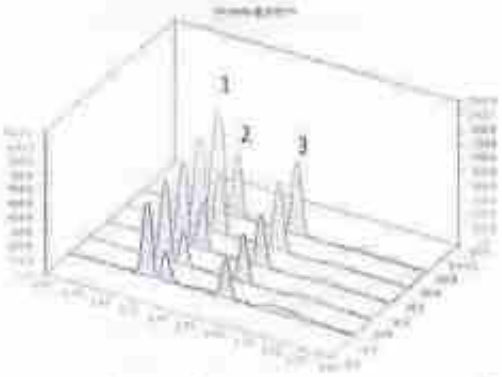
các chất phân tích. Do đó, phương pháp có tính chọn lọc đảm bảo để phát hiện các chất nghiên cứu trên 3 nền chế phẩm dông dược khảo sát.



Hình 3. Sắc ký đồ đánh giá độ chọn lọc HPTLC: 1- hỗn hợp chuẩn; 2-nền cao thuốc thêm hỗn hợp chuẩn; 3- nền cao thuốc; 4- nền viên hoàn thêm hỗn hợp chuẩn; 5- nền viên hoàn; 6- nền viên nang thêm hỗn hợp chuẩn; 7- nền viên nang

Độ thích hợp hệ thống: Phân tích lặp lại 6 lần dung dịch hỗn hợp sildenafil, tadalafil, vardenafil tại nồng độ 1 mg/ml trên hệ thống HPTLC với các điều kiện đã lựa chọn. Từ đó, tính độ lặp lại (RSD) về diện tích pic (S pic) của từng dược chất tương ứng với sildenafil, tadalafil và vardenafil,kết quả lần lượt là 1,4%; 1,9% và 1,5% (<2,0%).

Xây dựng đường chuẩn: Liều tác dụng củasildenafil, tadalafil, vardenafil lần lượt là 50 mg/lần, 10 mg/lần và10 mg/lần[7]nênxây dựng đường chuẩn trong khoảng với từng chấtlần lượt là 250 – 1600 µg/ml (sildenafil), 60 – 320 µg/ml (tadalafil và vardenafil)phatrong methanol và tiến hành sắc ký. Kết quả được trình bày ởhình 4.Xây dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic tương ứng được phương trình hồi qui của sildenafil là y = 3214,3x +10030 (R^2=0,9943); tadalafil là y = 10112x +3277,1 (R^2=0,9916); vardenafil là y = 8645,1x +2672,2 (R^2=0,9938).



Hình 4. Sắc ký đồ analog của khoảng tuyến tính của các chất nghiên cứu
1) sildenafil; 2) vardenafil; 3) tadalafil

Giới hạn định lượng (LOQ), giới hạn phát hiện (LOD): Thêm chuẩn từng chất vào 0,5 g bột nền mẫu placebo, tiến hành xử lý mẫu theo qui trình xây dựng ở trên để được các dung dịch có nồng độ sildenafil:200, 100, 50, 30 µg/ml; tadalafil và vardenafil: 100, 50, 35, 15 µg/ml trong nền mẫu. Tiến hành sắc ký, phát hiện và xử lý hình ảnh sắc ký đồ bằng phần mềm videoscan.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 được tính theo công thức LOQ = LOD x 3,3. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

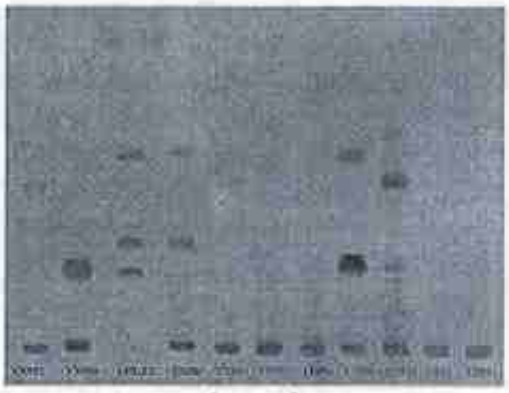
Bảng 1.Kết quả xác định LOD, LOQ của phương pháp

Chất phân tích	Nền viên nang		Nền viên hoàn		Nền cao thuốc	
	LOD (ng/vết)	LOQ (ng/vết)	LOD (ng/vết)	LOQ (ng/vết)	LOD (ng/vết)	LOQ (ng/vết)
Sildenafil	157	518	157	518	157	518
Tadalafil	174	573	174	573	174	573
Vardenafil	188	620	188	620	188	620

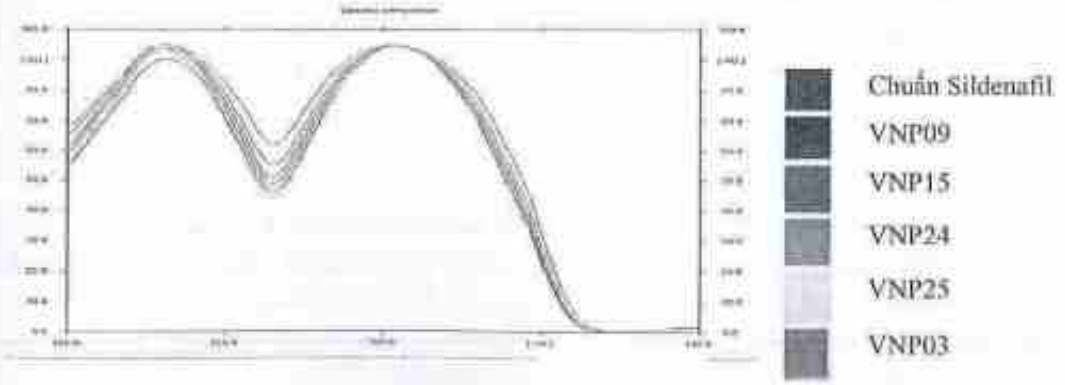
Độ chính xác và độ đúng:tiến hành trên 3 nền mẫu placebo (nang, hoàn, cao) thêm chuẩn ở các nồng độ định lượng thấp, trung bình, cao tương ứng là sildenafil (500, 1000, 1500)µg/ml); tadalafil và vardenafil (100, 200, 300 µg/ml). Mỗi mức nồng độ tiến hành lặp lại 6 lần trên 1 nền mẫu.**Độ đúng** (độ thu hồi) được xác định dựa vào phương trình hồi quy đã xây dựng trong cùng ngày phân tích và so sánh với lượng chuẩn thêm vào; **Độ chính xác trong ngày** là từ 3 nồng độ trên tính RSD. **Độ chính xác trung gian** được xác định dựa vào RSD (%) của 6 kết quả ở ngày khác ở các mức nồng độ cao, thấp, trung bình. Kết quả cho thấy: độ thu hồi của các chất phân tích dao động trong khoảng từ 90,0 % đến 106,9 % tùy theo nồng độ và hệ số biến thiên RSD dao động trong khoảng từ 0,9 % đến 4,9%. Như vậy, phương pháp đã xây dựng cho độ thu hồi và độ lặp lại đáp ứng theo yêu cầu của AOAC, ICH.

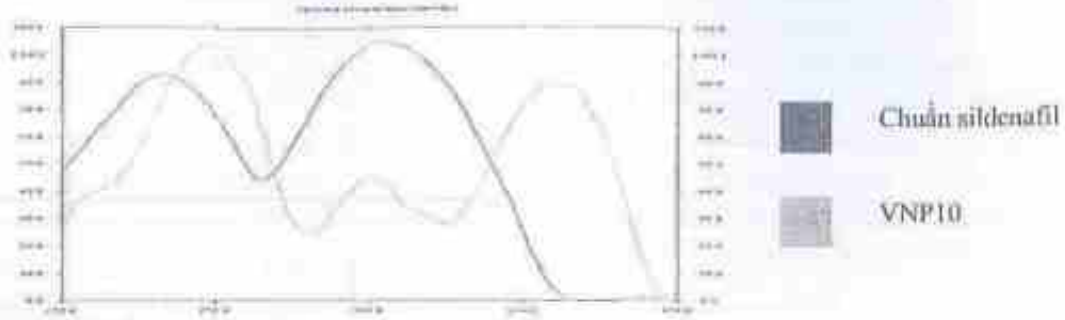
3.3. Ứng dụng phân tích mẫu thực

Ứng dụng phân tích 24 mẫu chế phẩm đông dược thu thập trên thị trường. Mẫu thử được làm đồng nhất và cân chính xác khoảng ½ liều (căn cứ vào hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất). Tiến hành xử lý mẫu và thực hiện phân tích sắc ký.Kết quả được minh họa ở hình5.Để khẳng định kết quả dương tính, quét phổ các vết tương ứng, chồng phổ với phổ của chất chuẩn, đồng thời lấy kết quả analog để tính hàm lượng đối với mẫu dương tính.Kết quả thu được là: 06 mẫu dương tính trong đó VNP03, VNP25 dương tính với 1 hoạt chất là sildenafil (15,92 – 70,78 mg/1 liều dùng); VNP04 dương tính với tadalafil (5,19 mg/liều) và vardenafil (9,78 mg/ 1 liều dùng); VNP09, VNP15, VNP24 dương tính với sildenafil (58,08-70,78 mg/liều) và tadalafil (11,66-16,27 mg/liều). Các mẫu trộn lần các chất ức chế PDE-5 đều nằm trong khoảng liều điều trị của các thuốc này[5],[7].Đặc biệt, với mẫu VNP10 có vết R_f tương đương với R_f củachuẩn sildenafil nhưng khi quét phổ UV của vết tương ứng và chồng phổ với phổ chuẩn sildenafil thì hình dạng và các cực đại hấp thụ UV khác biệt hoàn toàn. Như vậy, phương pháp HPTLC xây dựng được đã loại bỏ được kết quả dương tính giả.Kết quả được minh họa ở hình 6.



Hình 5. Sắc kí đồ phân tích một số mẫu thực





Hình 6. Kết quả chồng phổ UV các chất của mẫu nghi ngờ với chuẩn sildenafil

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được hệ dung môi triển khaiethylacetat-isopropanol-amoniac 25% (45:5: 2,6) có khả năng phân tách sildenafil với tadalafil, vardenafil; bước sóng quét phổ để định lượng sildenafil, vardenafil và tadalafil lần lượt là 304nm, 251nm và 285 nm.Quy trình phân tích được thẩm định tuân thủ theo các tiêu chí của AOAC, ICH về tính chọn lọc, tính thích hợp hệ thống, khoảng tuyến tính rộng với $R^2 \geq 0,99$; độ thu hồi của các chất phân tích dao động trong khoảng từ 90,0% đến 106,9% tùy theo nồng độ và hệ số biến thiên RSD dao động trong khoảng từ 0,91% đến 4,9%. Ứng dụng phương pháp HPTLC xây dựng được để tích 24 mẫu chế phẩm đông dược đang lưu hành trên thị trường, phát hiện thấy 6/24 mẫu (chiếm25%) mẫu có trộn các chất ức chế PDE-5 đều là TPBVSK, 5/24 mẫu dương tính với sildenafil, 4/24 mẫudương tính với tadalafil và 1/24 mẫu dương tính với vardenafil.Đặc biệt, số mẫu trộn trái phép đồng thời 2 hoạt chất chiếm 66% trong tổng số mẫu dương tính cho thấy tỷ lệ đáng báo động về tình trạng trộn trái phép nhiều thuốc hóa dược trong chế phẩm đông dược, do đó cần phải kiểm soát chất lượng các chế phẩm này một cách chặt chẽ.

Lời cảm ơn : Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Y tế *«Xây dựngphương 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»*,giai đoạn 2017 - 2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bệnh viện Nam học và hiếm muộn Hà Nội, (2017),*Cập nhật tiến bộ mới trong điều trị Rối loạn cương dương*, Hà Nội.

2. 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.

3. Fang Fang, Qi Yunpeng, Lu Feng, Yang Liangbao ((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.

4. International A, AOAC. (2016), *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.

5. JNC Merck & Co. (2006), *The Merck index*, pp. 8558-8567, pp.9935, pp.9027.

6. Lee H.-M., Kim C.S., Jang Y.M., Kwon S.W., Lee B.-J. (2011), "Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, pp. 491–496.

(xem tiếp tr. 5)

ascorbyl palmitate by high performance liquid chromatography, Journal of the American Oil Chemists' Society, Vol. 62, no. 4, 745-747.
4. Tsui-hwa Tracy Hung, Paul A. SEIB, Karl J. Kramer (1987), *Determination of L-Ascorbyl 6-Palmitate in Bread Using Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Electrochemical (EC) Detection*, Journal of food science Volume 52, No. 4, pp 948-953.
5. P. Sapiclin, M. Gas˘perlin, V.Kmetec (2001), *Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions*, International Journal of Pharmaceutics 222, pp 271–279.
6. Sheldon R. Pinnell (2002), *Ascorbyl-6-Palmitate is not Ascorbic Acid*, Journal of Investigative Dermatology, 119(5):991, p. 1103.

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT *.....(tiếp theo tr. 16)*

7. Sweetman S.C., Pharm B., PharmS F.R. (2009), *Martindale - the complete drug reference* (Thirty-sixth edition ed. Vol. 2), Pharmaceutical Press.
8. Wollein U., Eisenreich W., Schramek N. (2011), "Identification of novel sildenafil-analogues in an adulterated herbal food supplement", *J Pharm Biomed Anal*, 56(4), pp. 705-712.
9. Zhu Qingxia, Cao Yongbing, Cao Yingying C.Y., Lu Feng (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.

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

VĂN BẢN ĐỒNG Ý CHO SỬ DỤNG BÀI BÁO/CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA ĐỒNG TÁC GIẢ

Chúng tôi là:

1. Nguyễn Thị Kiều Anh, công tác tại Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, trường ĐH Dược Hà Nội.
2. Phạm Thị Thanh Hà, công tác tại Bộ môn Hóa Phân tích, trường ĐH Dược Hà Nội.
3. Nguyễn Thị Thanh Huyền, công tác tại Trường Cao đẳng Dược Trung Ương Hải Dương

Là đồng tác giả với NCS Đào Thị Cẩm Minh trong bài báo/công trình nghiên cứu sau đây:

1. 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.

Tôi hoàn toàn đồng ý cho NCS Đào Thị Cẩm Minh được sử dụng nội dung các bài báo/công trình nghiên cứu trên vào mục đích nghiên cứu, viết và báo cáo luận án tiến sĩ của NCS ở các cấp.

Hà Nội, ngày 06 tháng 04 năm 2019

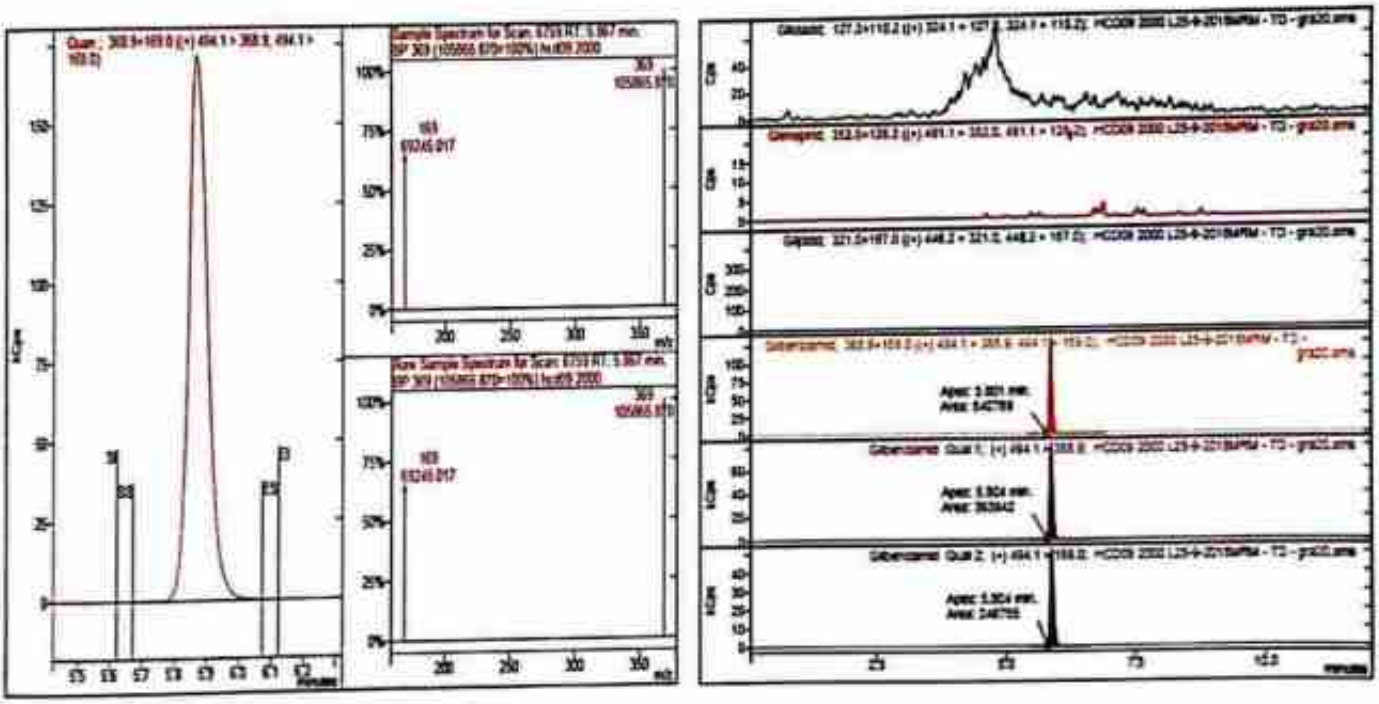
Đồng tác giả

Nguyễn Thị Kiều Anh	Phạm Thị Thanh Hà	Nguyễn Thị Thanh Huyền

Tạp chí

Nghiên cứu dược & Thông tin thuốc

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH AND DRUG INFORMATION



Phổ đồ và sắc ký đồ phát hiện (định tính, định lượng) glibenclamid trộn không khai báo trong chế phẩm đông dược HCD09 bằng LC-MS/MS

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
Địa chỉ: 13-15 Lê Thánh Tông - Hoàn Kiếm - Hà Nội
Website: www.hup.edu.vn

ISSN 1859-364X
Tập 9 - Tr. 1-40
Số 6/2018

Nghiên cứu Dược & Thông tin thuốc 2018, Tập 9, Số 6
Journal of Pharmaceutical Research and Drug information 2018, Vol 9, N°6

Kính Biếu

MỤC LỤC
Số 6, 2018

CONTENTS
N°6, 2018

BÀI NGHIÊN CỨU / **RESEARCH**

2 **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**
Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh

Determine undeclared addition of synthetic anti-diabetic drugs in herbal products by LC-MS/MS
Dao Thi Cam Minh, Pham Thi Thanh Ha, Nguyen Thi Kieu Anh

9 **Tổng quan hệ thống về phân tích kinh tế dược so sánh ticagrelor và clopidogrel theo phương pháp điều trị phổ thông và điều trị cá thể hóa trong hội chứng động mạch vành cấp**
Đặng Thanh Chúc, Đinh Nho Anh, Vũ Thị Thu Hiền, Nguyễn Minh Huyền, Nguyễn Mạnh Hải, Phạm Nữ Hạnh Vân

Cost-effectiveness of ticagrelor compared to clopidogrel in acute coronary syndromes: A systematic review
Dang Thanh Chuc, Dinh Nho Anh, Vu Thi Thu Hien, Nguyen Minh Huyen, Nguyen Manh Hai, Pham Nu Hanh Van

19 **Nghiên cứu quy trình bào chế và đánh giá phytosome quercetin**
Nguyễn Hồng Trang, Trịnh Viết Đạt, Vũ Thị Thu Giang, Phạm Thị Minh Huệ

Preparation and evaluation of quercetin phytosomes
Nguyen Hong Trang, Trinh Viet Dat, Vu Thi Thu Giang, Pham Thi Minh Hue

27 **Đánh giá ảnh hưởng của dung dịch ceri nitrat tới sự tăng sinh và di cư của nguyên bào sợi nuôi cấy**
Nguyễn Ngọc Tuấn, Đinh Văn Hân, Lương Quang Anh

Influences of cerium nitrate solution on the proliferation and emigration of cultured fibroblast
Nguyen Ngoc Tuan, Dinh Van Han, Luong Quang Anh

35 **ĐIỂM TIN THÔNG TIN THUỐC - CẢNH GIÁC DƯỢC**

Thông tin từ Hospital HealthCare Europe: Chính phủ Anh công bố kế hoạch tăng cường vai trò của dược sĩ nhằm giảm thiểu tình trạng đề kháng kháng sinh

Thông tin từ MHRA: Carbimazol làm tăng nguy cơ dị tật bẩm sinh

Thông tin từ EMA: Bổ sung thuốc đái tháo đường đường uống vào liệu pháp insulin trên một số bệnh nhân đái tháo đường typ 1

DRUG INFORMATION & PHARMACOVIGILANCE HIGHLIGHTS

Information from Hospital HealthCare Europe: UK Government announces enhanced role of pharmacists to address antimicrobial resistance

Information from MHRA: Carbimazole: increased risk of congenital malformations; strengthened advice on contraception

Information from EMA: First oral add-on treatment to insulin for treatment of certain patients with type 1 diabetes

39 **ĐIỂM TIN HOẠT ĐỘNG** / **NEWS POINT**

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

Đào Thị Cẩm Minh[1,2], Phạm Thị Thanh Hà[2], Nguyễn Thị Kiều Anh[2]*
[1]Trường Đại học Y Dược Huế - Đại học Huế, [2]Trường Đại học Dược Hà Nội
*Email: anhntk@hup.edu.vn
(Ngày gửi đăng: 15/11/2018 - Ngày duyệt đăng: 01/4/2019)

SUMMARY

The use of herbal remedies and dietary supplements for antidiabetic treatment has greatly increased. However, some herbal products advertised as "all natural" were been found to be adulterated with synthetic hypoglycemic drugs such as glibenclamide, glipizide, glimepiride, gliclazide. The objectives of this study were to develop an analytical methods for the identification and quantitation of glibenclamide, glipizide, glimepiride, gliclazide in real samples by liquid chromatography- tandem mass spectroscospy (LC-MS/MS). The method were validated in terms of selectivity, linearity, accuracy and precision in accordance with AOAC guidelines, and was applied on 41 herbal products. 8 samples were found adulterated with with glibenclamide.

Từ khóa: *Phát hiện, thuốc giảm glucose máu, LC-MS/MS, chế phẩm đông dược.*

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, xu hướng chọn sử dụng các sản phẩm từ thảo dược để phòng, hỗ trợ và điều trị bệnh ngày càng được ưa chuộng bởi người sử dụng cho rằng các sản phẩm này ít độc tính và ít có tác dụng phụ, đặc biệt với bệnh mãn tính như tiểu đường. Tuy nhiên, việc trộn nhưng không khai báo các thuốc hóa dược giảm glucose máu vào các chế phẩm đông dược đã được ghi nhận. Nhóm tác giả Trung Quốc đã 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 thảo đường tổng hợp [6]. Trong một nghiên cứu tương tự, Li và cộng sự [7] sử dụng phương pháp LC-MS/MS và phát hiện 9 loại thuốc chống đái thảo đường tổng hợp có trong 14 mẫu trên tổng số 30 mẫu thu thập từ thị trường Trung Quốc. Việc trộn nhưng không khai báo các hóa dược vào chế phẩm thảo dược có thể khiến người sử dụng phải chịu những tác dụng không mong muốn nguy hại đến sức khỏe, đặc biệt khi sử dụng trong thời gian dài.

Hiện nay, ở Việt Nam số bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường không ngừng gia tăng, các thuốc nhóm sulfonylurea gồm gliclazid, glibenclamid, glipizid, glimepirid hay được

chỉ định để điều trị bệnh. Khả năng chế phẩm đông dược bị trộn nhưng không khai báo các thuốc này rất lớn do chúng có giá thành rẻ, tác dụng mạnh ở mức liều thấp nên khó phát hiện. Với nền mẫu đông dược phức tạp, nhiều thành phần, nồng độ chất trộn lẫn thấp, yêu cầu phương pháp phân tích phải có độ chọn lọc, độ nhạy cao. Để góp phần kiểm tra, giám sát chất lượng các chế phẩm đông dược lưu hành trên thị trường, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng phương pháp định tính, định lượng các thuốc hóa dược nhóm sulfonylurea trộn lẫn trong chế phẩm đông dược nhưng không khai báo bằng LC-MS/MS.

Nguyên liệu và thiết bị

Chất chuẩn: Nguồn từ Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương gồm: glibenclamid SKS 0103129, hàm lượng 100,10 %; gliclazid SKS.WS.0215187.01 hàm lượng 99,53 %, glimepirid SKS 0115320.01 hàm lượng 99,49 %, glipizid SKS 0107207 hàm lượng 99,17 %. ***Mẫu nền (mẫu placebo):*** gồm 3 nền mẫu dạng viên hoàn, viên nang cứng, viên nén có thành phần là cao của các dược liệu có tác dụng ổn định đường huyết (15 dược liệu như Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Dây thìa canh, Chi mẫu, Khổ qua, quả Nhàu, ...) được bổ sung thêm tá dược và bào chế tại phòng nghiên cứu phát triển của Công ty cổ phần Traphaco. ***Mẫu thử:*** 41 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng viên nén, viên nang cứng, viên hoàn, trà túi lọc và dạng bột điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường, ổn định đường huyết 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). ***Dung môi, hóa chất:*** Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC và LC/MS.

Thiết bị: Tất cả các thiết bị và dụng cụ phân tích phù hợp với yêu cầu nghiên cứu. Tiến hành phân tích trên máy sắc ký lỏng khối phổ Triple Quadrupole BRUKER EVOQ Qube - Mỹ.

Phương pháp nghiên cứu

Xử lí mẫu: tiến hành với lượng mẫu tương ứng khoảng 1/2 liều dùng (0,50 g với nền nang, 0,50 g với nền nén; 1,50 g với nền hoàn). Cụ thể là mẫu thử được nghiền mịn, cân chính xác một lượng bột mẫu thử (hoặc mẫu placebo) tương ứng với khoảng 1/2 liều dùng vào ống ly tâm. Thêm chính xác 25 ml methanol. Lắc xoáy 5 phút, siêu âm 20 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, lọc qua màng lọc lỗ xốp 0,22 µm, pha loãng thích hợp.

Khảo sát điều kiện khối phổ và điều kiện sắc ký: Sử dụng các dung dịch chuẩn đơn tiêm không qua cột vào hệ thống MS để khảo sát điều kiện, thông số máy khối phổ, xác định các mảnh mẹ, các mảnh con đặc trưng của glibenclamid, glipizid, glimepirid, gliclazid. Khảo sát điều kiện sắc ký lựa chọn điều kiện tách, phát hiện đồng thời 4 chất phân tích trên 3 nền mẫu có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường.

Thẩm định phương pháp: theo hướng dẫn của AOAC [5] với các tiêu chí gồm độ đặc hiệu, độ phù hợp của hệ thống, độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại, độ đúng.

Ứng dụng: Mẫu thử chế phẩm đông dược được xử lý và phân tích theo phương pháp đã xây dựng. Tính kết quả dựa vào đường chuẩn xây dựng trong cùng ngày phân tích với $r \geq 0,99$.

Kết quả nghiên cứu

Xây dựng phương pháp phân tích

Khảo sát, lựa chọn điều kiện khối phổ

Tiêm không qua cột các dung dịch chuẩn đơn của 4 sulfonylure đều ở nồng độ 10

µg/ml vào hệ thống MS để xác định ion mẹ, ion con định lượng. Năng lượng bắn phá, thế phân mảnh ion (CE) được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ. Thông số máy khối phổ MS ở chế độ ESI (+) gồm điện áp đầu phun +3500 mV; nhiệt độ nón 250 °C; CID gas là Ar 1,5 mTorr. Điều kiện khối phổ được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện MS của cấu tử phân tích trên các dung dịch chuẩn đơn

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	CE (eV)	Ghi chú
Glibenclamid	494,1	368,9	9	Ion định lượng
		169,0	28	
Gliclazid	324,1	127,2	14	Ion định lượng
		110,2	19	
Glimepirid	491,1	352,0	10	Ion định lượng
		126,2	25	
Glipizid	446,2	321,0	20	Ion định lượng
		167,0	25	

Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký lỏng

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn 4 chất gliclazid, glibenclamid, glipizid, glimepirid nồng độ khoảng 50 ng/ml (mẫu được xử lý theo qui trình ở phần phương pháp nghiên cứu). Khảo sát các điều kiện bao gồm pha động, chương trình rửa giải, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu, chọn điều kiện cho sắc ký đồ có pic cân xứng, cường độ tín hiệu cao và ổn định. Qua kết quả khảo sát, đã chọn được điều kiện sắc ký phù hợp phân tích 4 thuốc nhóm sulfonylurea trên hệ thống LC-MS/MS với cột sắc ký Ultra II C18 (100 x 2,1 mm; 1,9 µm), pha động gồm acid formic 0,1 % trong nước (A) và acid formic 0,1 % trong acetonitril (B); chế độ pha động: gradient (0 -7 phút, 30 % B; 7 - 8,5 phút, 70 % B; 8,5 - 12 phút, 30 % B), thể tích tiêm 2 µl, tốc độ dòng 0,3 ml/phút và thời gian phân tích 12 phút.

Thẩm định phương pháp

Độ phù hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch hỗn hợp chuẩn glibenclamid, glipizid, glimepird đều là 20 ng/ml; gliclazid 160 ng/ml trong methanol vào hệ thống sắc ký. Kết quả glibenclamid, gliclazid, glimepiride, glipizide có thời gian lưu (phút) lần lượt là 5,79; 4,69; 6,18; 3,60 và RSD (%) của diện tích pic tương ứng là 1,85, 2,57, 3,34 và 2,85. Như vậy, hệ thống đáp ứng yêu cầu theo AOAC (RSD < 11 % với mức nồng độ ≤ 1000 ppb).

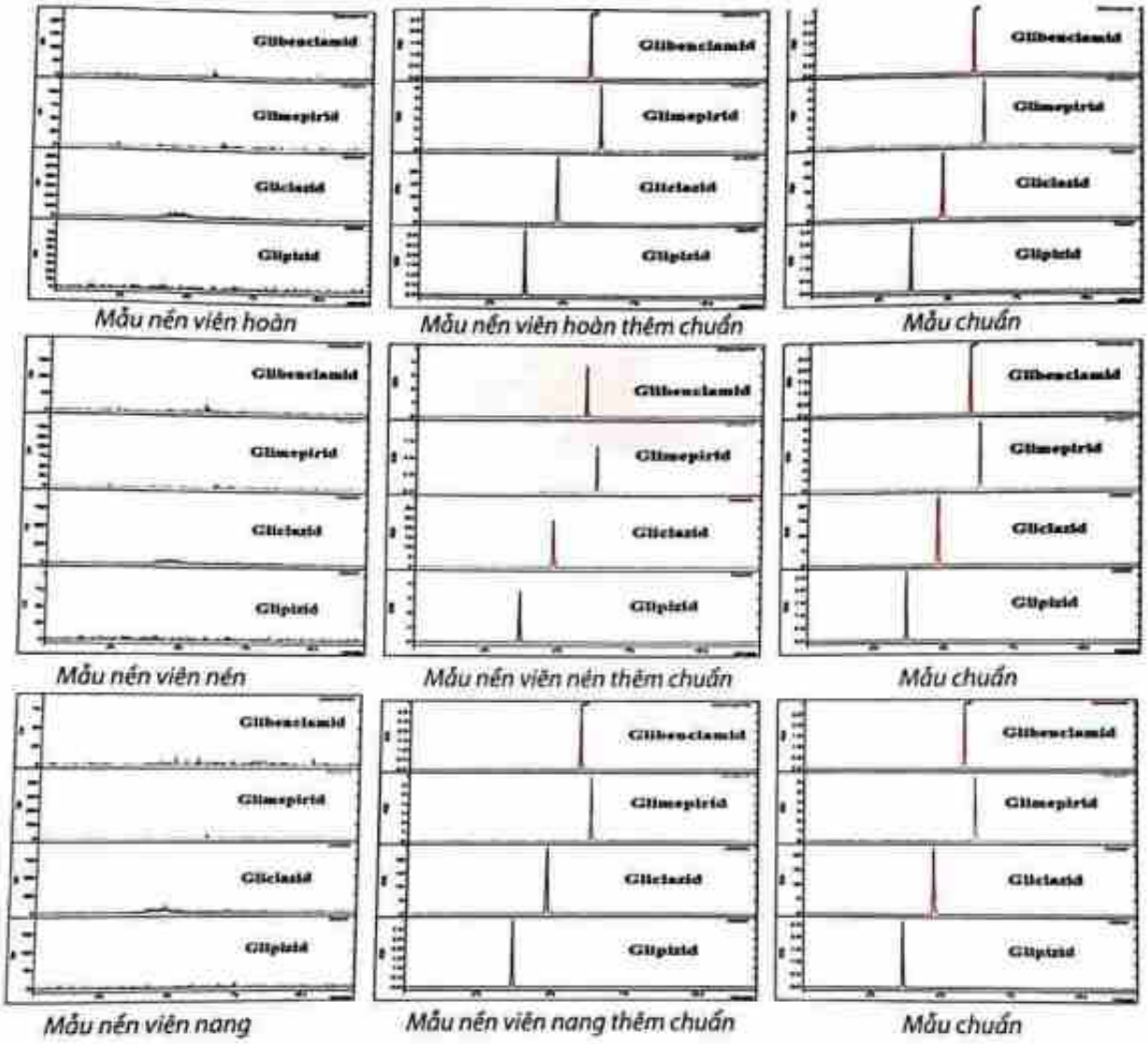
Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua kết quả phân tích trên các mẫu chuẩn hỗn hợp, mẫu nền (3 dạng viên hoàn, viên nang, viên nén) và mẫu nền thêm chuẩn được xử lý theo quy trình ở phần phương pháp nghiên cứu. Nồng độ các chất trong hỗn hợp chuẩn và mẫu nền thêm chuẩn đối với glibenclamid, glipizid, glimepird đều là 20 ng/ml và gliclazid 160 ng/ml. Kết quả được minh họa ở hình 1. Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trùng với thời gian của các 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 có hình dạng đẹp, cân đối. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, trên sắc ký đồ mẫu nền thêm chuẩn xuất hiện các pic trùng thời gian lưu với các pic tương ứng glibenclamid, glipizid, glimepird và gliclazid trong mẫu chuẩn, các pic đều gọn, cân đối; còn mẫu nền không có các pic ứng với các chất phân tích. Như vậy, phương pháp đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu

Khoảng nồng độ tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc (dung dịch glibenclamid, glipizid, glimepirid đều có nồng độ chính xác khoảng 0,2 mg/mL và gliclazid nồng độ là 1,6 mg/mL trong methanol) pha loãng bằng methanol thành dãy chuẩn hỗn hợp các chất gồm 7 điểm



Hình 1. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

nồng độ. Trong đó, khoảng nồng độ đối với glibenclamid, glipizid, glimepirid đều là 5 - 35 ng/ml và gliclazid là 40 - 280 ng/ml. Tiến hành sắc ký. Xây dựng đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic các chất với nồng độ của nó và tính hệ số tương quan hồi qui đối với từng chất. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

LOD và LOQ

Xác định LOD và LOQ của phương pháp bằng cách thêm lượng chuẩn thấp dần vào mỗi nền mẫu. Xử lý mẫu và sắc ký theo điều kiện đã lựa chọn. LOD là nồng độ có tỷ số giữa tín hiệu và nhiễu nền (S/N) khoảng bằng 3 và LOQ được xác định ở nồng độ có S/N khoảng bằng 10. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Độ chính xác và độ đúng

Độ đúng và độ lặp trong ngày được xác định bằng cách thêm chính xác lượng chuẩn của 4 chất nghiên cứu vào bột nền mẫu tương ứng khoảng 1/2 liều dùng (cân

Bảng 2. Kết quả thẩm định của phương pháp phân tích trên 3 nền mẫu

Chỉ tiêu (yêu cầu)	Glipizid	Glimepirid	Glibenclamid	Gliclazid
Khoảng tuyến tính				
Khoảng nồng độ ng/ml	5 - 35	5 - 35	5 - 35	40 – 280
Phương trình hồi qui	y = 684,84x +517	y =1147,1x -3455,7	y = 547,24x +207,14	y = 422,9x -901,43
Hệ số tương quan (r ≥ 0,99)	0,9980	0,9965	0,9973	0,9960
Độ chính xác và độ đúng				
Trong ngày (n = 7)				
Độ đúng (80,0 - 110,0%)	95,0-102,0%	94,0-102,0%	95,0-102,0%	92,0-102,0%
Độ chính xác (RSD ≤ 11%)	1,2-2,2%	1,2-3,1%	1,3-4,6%	2,4-4,6%
Khác ngày (n = 14)				
Độ đúng (80,0 - 110,0%)	96,0-102,0%	94,0-102,0%	95,0-102,0%	94,0-102,0%
Độ chính xác (RSD ≤ 11%)	1,2-2,2%	1,1-3,0%	1,3-2,7%	2,4-3,6%
LOD và LOQ				
LOD	0,3-0,4 ng/ml	0,3-0,4 ng/ml	0,3-0,4 ng/ml	0,3-0,4 ng/ml
LOQ	1,0 -1,2 ng/ml	1,0 -1,2 ng/ml	1,0 -1,2 ng/ml	1,0 -1,2 ng/ml

chính xác) của mỗi nền mẫu. Mức thêm lần lượt là 2,5 mg - 5 mg - 10 mg đối với glibenclamid, glimepirid, glipizid và 20 mg - 40 mg - 60 mg đối với gliclazid ứng với mức 3 mức LQC, MQC và HQC. Phân tích mẫu theo quy trình. Mỗi mức nồng độ làm lặp lại 7 lần. Độ đúng và độ chính xác khác ngày được tiến hành tương tự nhưng vào ngày phân tích khác và đánh giá kết quả dựa trên số liệu của 2 ngày phân tích. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Ứng dụng

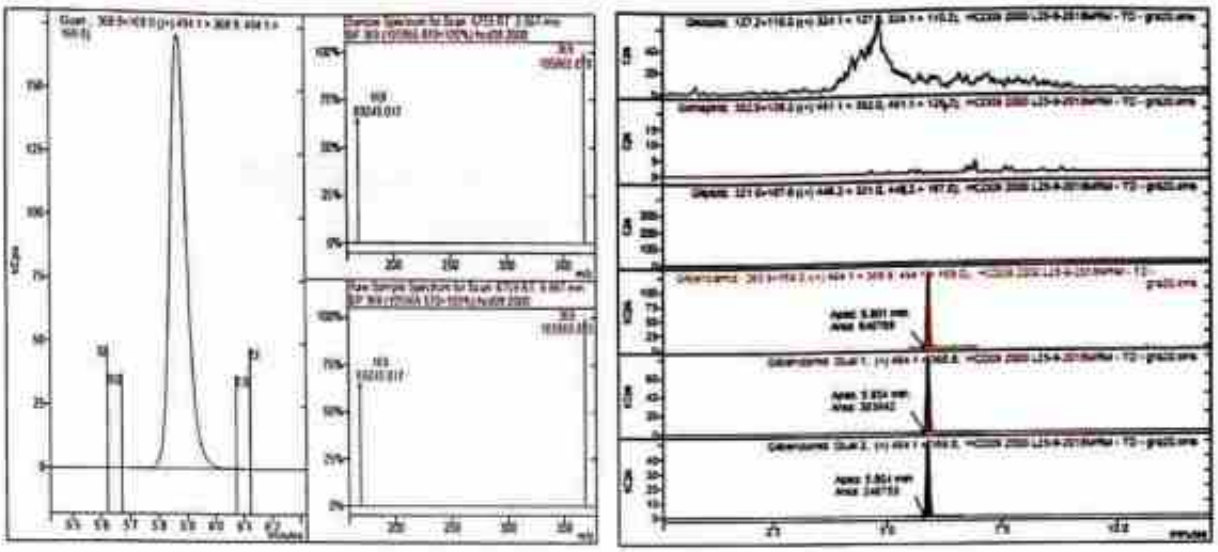
Áp dụng phương pháp đã xây dựng phân tích 41 mẫu chế phẩm đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe (15 chế phẩm hoàn cứng, 01 chế phẩm hoàn mềm, 17 chế phẩm viên nang cứng, 04 chế phẩm viên nén, 02 chế phẩm trà túi lọc, 02 chế phẩm bột). Mẫu thử được phân tích theo quy trình đã xây dựng. Kết quả 33/41 mẫu không phát hiện thấy có glibenclamid, glipizid, glimepird và gliclazid, 8/41 mẫu phát hiện có glibenclamid. Kết quả được trình bày ở bảng 3 và minh họa ở hình 2.

Bảng 3. Kết quả các mẫu dương tính với glibenclamid

Tên mẫu	Dạng bào chế	Liều dùng (đơn vị)	Hàm lượng Glibenclamid (mg)/đơn vị mẫu	Hàm lượng Glibenclamid (mg)/liều
HCD09	Viên hoàn	6	0,33	1,98
HMD10	Viên hoàn	1	2,16	2,16
BD11	Thuốc bột	1/10	0,14	0,14
HCD13	Viên hoàn	5	0,26	1,31
HCD18	Viên hoàn	2	0,75	1,50
HCD19	Viên hoàn	2	0,73	1,47
HCD22	Viên hoàn	10	0,19	1,86
VND41	Viên hoàn	1	0,58	0,58

Bàn luận

Các mẫu chế phẩm đông dược hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường lưu hành trên thị trường chủ yếu ở các dạng rắn (bột, trà, viên nang và viên nén) và viên hoàn, với thành phần gồm các dược liệu như Diệp hạ châu, Giảo cổ lam, Dây thìa canh, Chi mẫu, Khổ qua, quả Nhàu…[1], [2]. Các nền mẫu sử dụng trong xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích được chế tạo gồm cao của 15 dược



Hình 2. Phổ đồ và sắc ký đồ mẫu thực HCD09 dương tính với glibenclamid

liệu và tá dược bào chế viên hoàn, viên nén, viên nang nên tương tự phần lớn các chế phẩm điều trị, hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường trên thị trường hiện nay. Để xác định các thuốc hóa dược nói chung, thuốc giảm glucose máu nói riêng trộn nhưng không khai báo trong chế phẩm đông dược, phương pháp phân tích bằng sắc ký là lựa chọn hàng đầu. Các nghiên cứu đã công bố phát triển phương pháp xác định các thuốc giảm glucose máu trộn nhưng không khai báo trong chế phẩm đông dược bằng HPLC-UV [4], HPTLC [3] hay bằng LC-MS/MS [6], [7]. Tuy nhiên, với nền mẫu phức tạp, hoạt chất không khai báo và hàm lượng thấp thì phương pháp LC-MS/MS là phù hợp nhất do vượt trội về tính đặc hiệu và giới hạn phát hiện so với hai phương pháp còn lại.

Nghiên cứu đã sử dụng dung môi chiết là methanol với qui trình xử lý mẫu đơn giản, nhanh chóng, hòa tan tốt cả 4 sulfonylure nghiên cứu. Trong phương pháp LC-MS/MS với chế độ bắn phá mảnh ion, lựa chọn điều kiện khối phổ và điều kiện sắc ký rất quan trọng để đạt được độ đặc hiệu cao. Phương pháp đã tách được các chất nghiên cứu có pic gọn, cân đối, thời gian phân tích tương đối ngắn. Đặc biệt, các thông số về MS của phương pháp đạt yêu cầu theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) khi có ít nhất 4 điểm IP (1 ion mẹ, 2 ion con định tính và định lượng) trên cả 3 nền mẫu đối với 4 chất phân tích do đó phương pháp có độ đặc hiệu cao. Kết quả thẩm định đều đạt được độ đúng, độ chính xác với cả 4 chất nghiên cứu và đáp ứng với yêu cầu của AOAC 2016 [5]. Quan trọng nhất phương pháp đạt độ nhạy cao, phù hợp trong việc phân tích thuốc hóa dược trộn nhưng không khai báo trong chế phẩm đông dược, kết quả của nghiên cứu có LOD và LOQ thấp hơn so với nghiên cứu của Li Ning [7] với LOD nằm trong khoảng 0,9-2,0 ng/ml, còn LOQ là 1,9-10,9 ng/ml.

Trong số 41 mẫu chế phẩm hỗ trợ điều trị tiểu đường, nghiên cứu phát hiện có 8 mẫu dương tính với glibenclamid (1,3-2,2 mg/liều tương ứng khoảng 1/10-1/5 liều

của glibenclamid điều trị bệnh), chiếm 19,5 %; trong đó có 7 mẫu dương tính dạng viên hoàn, 1 mẫu dạng bột. Các mẫu này đều không có số đăng ký, 7 chế phẩm được mua tại phòng khám của lương y và 1 mẫu mua qua mạng internet. Do vậy, người bệnh không nên sử dụng các sản phẩm không có nguồn gốc xuất xứ rõ ràng, không có số đăng ký được phép lưu hành.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp LC-MS/MS phát hiện (định tính, định lượng) đồng thời glibenclamid, glipizid, glimepirid, gliclazid trộn trái phép trong chế phẩm đông dược. Mẫu thử được xử lý nhanh, đơn giản. Phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện thấp (0,4 ng/ml), độ chính xác và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC 2016. Phương pháp có tính khả thi cao trong phân tích mẫu thực lưu hành trên thị trường. Nghiên cứu đã phân tích và phát hiện 8 trong 41 mẫu chế phẩm dương tính với glibenclamid chiếm 19,5 % với mức nồng độ 1,3-2,2 mg/liều. Các mẫu dương tính đều không có số đăng ký và được mua ở phòng khám đông y hoặc qua mạng internet.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Y tế *"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"* giai đoạn 2017 - 2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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.
2. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Thị Phương Lan, 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
3. Phạm Thị Tâm, Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Minh Hoàng, Nguyễn Thị Kiều Anh (2017), "Xây dựng phương pháp xác định metformin và glibenclamid trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 8(3), tr. 25-30.
4. 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.
5. AOAC Official Methods of Analysis (2016). *"Guidelines for Standard Method Performance Requirements"*.
6. 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.
7. 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.

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

VĂN BẢN ĐỒNG Ý CHO SỬ DỤNG BÀI BÁO/CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA ĐỒNG TÁC GIẢ

Chúng tôi là:

1. Nguyễn Thị Kiều Anh, công tác tại Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, trường ĐH Dược Hà Nội.
2. Phạm Thị Thanh Hà, công tác tại Bộ môn Hóa Phân tích, trường ĐH Dược Hà Nội.

Là đồng tác giả với NCS Đào Thị Cẩm Minh trong bài báo/công trình nghiên cứu sau đây:

1. 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, Tập 9 số 6*, trang 2-8.

Tôi hoàn toàn đồng ý cho NCS Đào Thị Cẩm Minh được sử dụng nội dung các bài báo/công trình nghiên cứu trên vào mục đích nghiên cứu, viết và báo cáo luận án tiến sĩ của NCS ở các cấp.

Hà Nội, ngày 15 tháng 04 năm 2019

Đồng tác giả

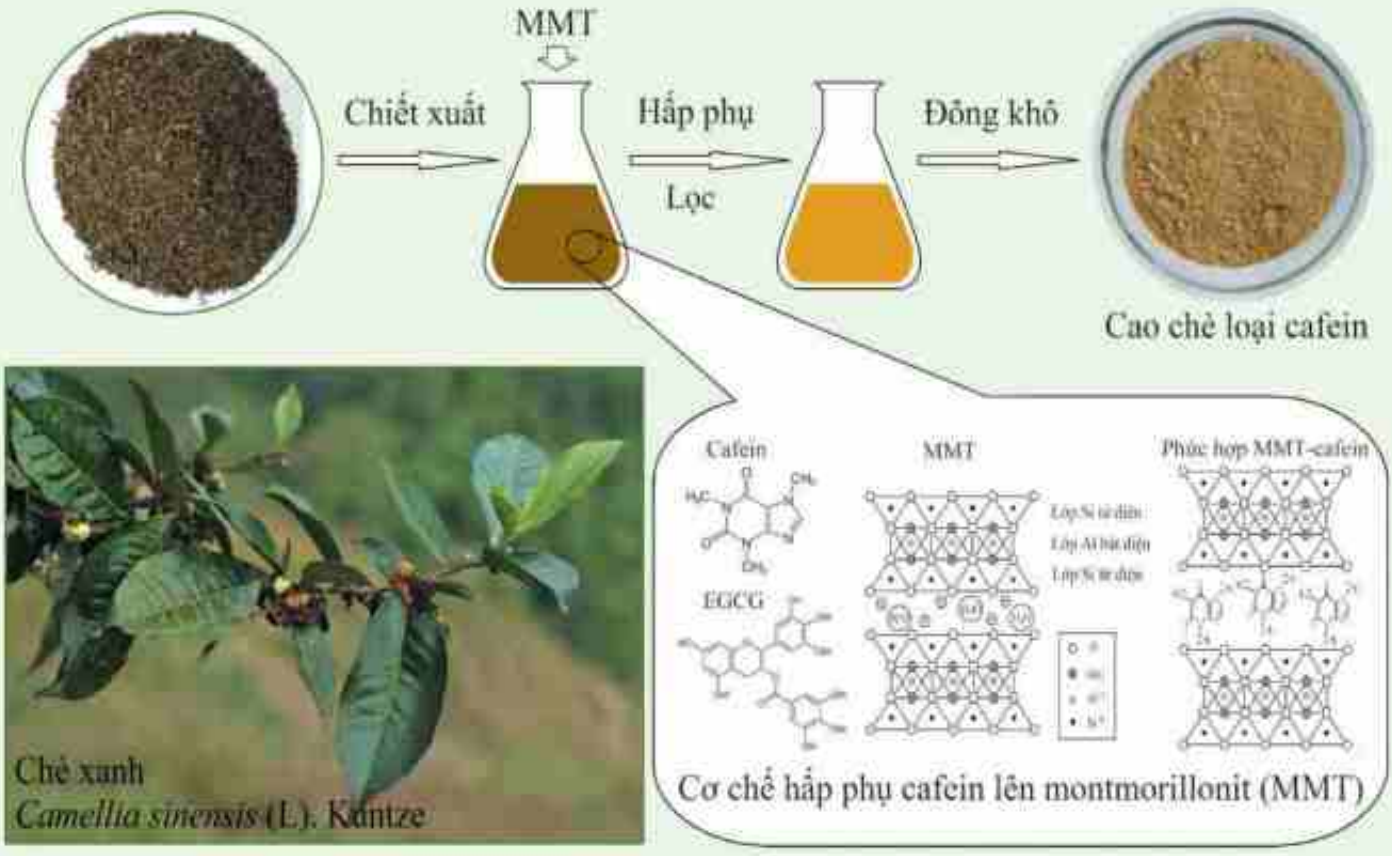
Nguyễn Thị Kiều Anh

Phạm Thị Thanh Hà

4
2019

tạp chí DƯỢC HỌC

SỐ 516 * NĂM THỨ 59 * THÁNG RA 1 KỲ * ISSN 0866 - 7861



BỘ Y TẾ XUẤT BẢN
Địa chỉ Tòa soạn: 138A Giảng Võ - Quận Ba Đình - Hà Nội
Tel: 0243.8461430 - 0243.7368367

TẠP CHÍ DƯỢC HỌC
ISSN 0866 - 7861
04/2019 (Số 516 NĂM 59)

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU - KỸ THUẬT

- VŨ ĐÌNH HOÀ, TRẦN TỐ LOAN, NGUYỄN DUY TÂN, VÕ THỊ THANH BÌNH, NGUYỄN HOÀNG ANH: Phân tích kết quả giám sát nồng độ ciclosporin và độc tính thận trên bệnh nhân ghép tế bào gốc đồng loài tại Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương 3
- TRẦN THÀNH ĐẠO, THÁI KHẮC MINH: Nghiên cứu QSAR và mô hình docking trên các chất làm bền cấu trúc G-quadruplex 8
- TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ HUYỀN: Định lượng rebamipid trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối với detector khối phổ 13
- NGUYỄN THỊ THUẬN, NGUYỄN HẢI NAM, DƯƠNG TIẾN ANH, ĐỖ THỊ MAI DUNG, HOÀNG PHƯƠNG THẢO: Tổng hợp và thử tác dụng ức chế tế bào ung thư của một số dẫn chất *(E)*-3-(4-((3-benzamidophenoxy)methyl)phenyl)-*N*-hydroxypropenamid 17
- LÊ ĐÌNH CHI, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG LAN, BÙI VĂN TRUNG: Xây dựng phương pháp định lượng trực tiếp lamivudin trong viên nén bằng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại 20
- NGUYỄN QUỲNH HOA, PHẠM THANH PHÚC, NGUYỄN TRUNG HÀ: Phân tích lượng thuốc điều trị ung thư pha chế sử dụng cho bệnh nhân tại Bệnh viện K 24
- LÊ MINH TRÍ, TRẦN THÀNH ĐẠO, NGUYỄN ĐỨC KHÁNH THƠ, NGUYỄN TƯỜNG QUANG, NGUYỄN SĨ TỊNH THÙY, VÕ DUY NHÀN, MAI THÀNH TẤN, THÁI KHẮC MINH: Nghiên cứu mô hình 2D-QSAR trên các dẫn chất ức chế telomerase 30
- BÙI THỊ XUÂN, VŨ ĐỨC LỢI, NGUYỄN THỊ HOÀI THU, NGUYỄN THỊ HỒNG, TRẦN MINH NGỌC: Ba hợp chất flavonoid phân lập từ phân đoạn dịch chiết ethylacetat của lá cây khôi đốm (*Sanchezia nobillis* Hook.f.) 33
- PHAN HOÀNG ĐOAN PHƯƠNG, NGUYỄN ĐỨC HẠNH: Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời quercetin và curcumin I trong vi nhũ tương quer-cur bằng phương pháp HPLC 37

PHARMACEUTICAL JOURNAL
ISSN 0866 - 7861
04/2019 (N° 516 Vol. 59)

CONTENTS

RESEARCH - TECHNIQUES

- VŨ ĐÌNH HOÀ, TRẦN TỐ LOAN, NGUYỄN DUY TÂN, VÕ THỊ THANH BÌNH, NGUYỄN HOÀNG ANH: Retrospective study on the concentration and nephrotoxicity of ciclosporin on the patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in the National Institute of Haematology and Blood Transfusion 3
- TRẦN THÀNH ĐẠO, THÁI KHẮC MINH: Study on 2D-QSAR and molecular docking model for stabilizers of the G-quadruplex structure 8
- TẠ MẠNH HÙNG, PHAN THỊ NGHĨA, NGUYỄN THỊ HUYỀN: Develpment of an UPLC tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for determination of human plasma rebamipide 13
- NGUYỄN THỊ THUẬN, NGUYỄN HẢI NAM, DƯƠNG TIẾN ANH, ĐỖ THỊ MAI DUNG, HOÀNG PHƯƠNG THẢO: Synthesis and inhibitive bioactivity on cancer-cell lines of some *(E)*-3-(4-((3-benzamidophenoxy)methyl)phenyl)-*N*-hydroxypropenami derivatives 17
- LÊ ĐÌNH CHI, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG LAN, BÙI VĂN TRUNG: Development a near infrared spectrophotometry for direct detemination of lamivudine in tablets 20
- NGUYỄN QUỲNH HOA, PHẠM THANH PHÚC, NGUYỄN TRUNG HÀ: Analysis of antineoplastic agents in ordering and prepation for cancer patients at Vietnam National Cancer Hospital 24
- LÊ MINH TRÍ, TRẦN THÀNH ĐẠO, NGUYỄN ĐỨC KHÁNH THƠ, NGUYỄN TƯỜNG QUANG, NGUYỄN SĨ TỊNH THÙY, VÕ DUY NHÀN, MAI THÀNH TẤN, THÁI KHẮC MINH: 2D-QSAR modelling on telomerase inhibitors 30
- BÙI THỊ XUÂN, VŨ ĐỨC LỢI, NGUYỄN THỊ HOÀI THU, NGUYỄN THỊ HỒNG, TRẦN MINH NGỌC: Three flavonoids isolated from the ethylacetate extracts of the leaves of *Sanchezia nobillis* Hook.f. 33
- PHAN HOÀNG ĐOAN PHƯƠNG, NGUYỄN ĐỨC HẠNH: Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of quercetin and curcumin I in QUER-CUR microemulsion 37

Mục lục

- TRẦN TRỌNG BIÊN, NGUYỄN THU HÀ, PHẠM QUỐC TUẤN, NGHIÊM THỊ MINH, NGUYỄN VĂN HÂN: Nghiên cứu ứng dụng montmorillonit trong loại cafein từ dịch chiết lá chè xanh (*Camellia sinensis* L.) 42
- LÊ THỊ HỒNG NHUNG, NGUYỄN MẠNH HÀ, NGUYỄN NGỌC THANH, NGUYỄN QUANG TÙNG, VŨ MINH TÂN: Xây dựng phương pháp xác định hiệu suất phản ứng tổng hợp felodipin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao 46
- NGUYỄN MẠNH QUÂN, LỮ THIỆN PHÚC, ĐỖ CHÂU MINH VĨNH THỌ: Nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích tạp hydrazin của allopurinol bằng phương pháp HPLC/PDA 49
- ĐẶNG KIM THU, NGUYỄN LỆ QUYÊN, NGUYỄN THỊ HUYỀN, NGUYỄN THANH HẢI, BÙI THANH TÙNG: Đánh giá tác dụng chống oxy hóa và khả năng ức chế enzym protein tyrosin phosphatase 1B của các phân đoạn dịch chiết quả lựu (*Punica granatum* Linn.) 54
- ĐÀO THỊ CẨM MINH, PHẠM THỊ THANH HÀ, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH: 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 57
- LÊ THỊ HƯỜNG HOA, ĐỖ THU TRANG, LÊ ĐÌNH CHI: Xác định tạp đồng phân đối quang R-ketoprofen trong viên nén dexketoprofen bằng phương pháp HPLC 62
- MAN THANH LONG, NGUYỄN THỊ NỤ, NGUYỄN QUỐC TUẤN, TRỊNH NAM TRUNG, LÊ NGỌC DUY, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG, PHƯƠNG THIỆN THƯƠNG: Flavonoid và terpenoid phân lập từ phần trên mặt đất cây bồ công anh Việt Nam (*Lactuca indica* L.) 68
- TRƯƠNG PHƯƠNG, NGUYỄN THỊ KIM TUYẾN: Nghiên cứu điều chế oxybenzon 71
- NGUYỄN TẤN ĐẠT, NGUYỄN MINH ĐỨC, NGUYỄN THỊ NGỌC VÂN: Tổng hợp và thiết lập chuẩn đối chiếu tạp chất A của diclofenac 76
- VÕ TRẦN NGỌC HÙNG, ĐỚI HẢI LINH, LÊ THỊ HƯỜNG HOA, THÁI NGUYỄN HÙNG THU: Nghiên cứu xây dựng quy trình định tính, định lượng các kháng sinh clindamycin, lincomycin và tetracyclin trong một số dạng mỹ phẩm bằng HPLC 79
- NGUYỄN THỊ THANH HƯƠNG, NGUYỄN XUÂN TRUNG: Phân tích danh mục thuốc kháng sinh sử dụng tại Bệnh viện Quân y 354 năm 2017 84

TIN TRONG NGÀNH 88

- TRẦN TRỌNG BIÊN, NGUYỄN THU HÀ, PHẠM QUỐC TUẤN, NGHIÊM THỊ MINH, NGUYỄN VĂN HÂN: Removal of cafein from the green tea extracts by montmorillonite 42
- LÊ THỊ HỒNG NHUNG, NGUYỄN MẠNH HÀ, NGUYỄN NGỌC THANH, NGUYỄN QUANG TÙNG, VŨ MINH TÂN: Establishment of an HPLC method for estimation of the yield of felodipine synthesis by Hanzsch reaction 46
- NGUYỄN MẠNH QUÂN, LỮ THIỆN PHÚC, ĐỖ CHÂU MINH VĨNH THỌ: Study on determination of hydrazine-related impurities of allopurinol in bulk and pharmaceutic products by HPLC/PDA 49
- ĐẶNG KIM THU, NGUYỄN LỆ QUYÊN, NGUYỄN THỊ HUYỀN, NGUYỄN THANH HẢI, BÙI THANH TÙNG: Estimation of antioxidant potential and inhibitive activity on protein tyrosin phosphatase 1B of the extracts from the fruits of *Punica granatum* (Linn.) (*Frucctus Punicae*) 54
- ĐÀO THỊ CẨM MINH, PHẠM THỊ THANH HÀ, NGUYỄN THỊ KIỀU ANH: Detection of analgegic, anti-inflamatory and hypoglycemic synthetic actives mixed adulterantly to herbal medicines by high performance thin-layer chromatography (HP-TLC) 57
- LÊ THỊ HƯỜNG HOA, ĐỖ THU TRANG, LÊ ĐÌNH CHI: Development of an HPLC for determination of enantiometric impurity R-Ketoprofen in Ketoprofent tablets 62
- MAN THANH LONG, NGUYỄN THỊ NỤ, NGUYỄN QUỐC TUẤN, TRỊNH NAM TRUNG, LÊ NGỌC DUY, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG, PHƯƠNG THIỆN THƯƠNG: Isolation of flavonoid and terpenoid compounds from the aerial parts of Lactuca Indica L. (*Herba Lactucae*) of Vietnam 68
- TRƯƠNG PHƯƠNG, NGUYỄN THỊ KIM TUYẾN: Synthesis of oxybenzone 71
- NGUYỄN TẤN ĐẠT, NGUYỄN MINH ĐỨC, NGUYỄN THỊ NGỌC VÂN: Synthesis and establishment of a reference standard of the impurity A of diclofenac 76
- VÕ TRẦN NGỌC HÙNG, ĐỚI HẢI LINH, LÊ THỊ HƯỜNG HOA, THÁI NGUYỄN HÙNG THU: Development of an HPLC procdure for simultaneous qualitative and quantitative analysis of clindamycine, lincomycine and tetracycline antibiotics in cosmetics 79
- NGUYỄN THỊ THANH HƯƠNG, NGUYỄN XUÂN TRUNG: Analysis of the 2017's drug list of the Military Hospital 354 84

NEWS IN BRANCH 88

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

Đào Thị Cẩm Minh[1,2], Phạm Thị Thanh Hà[2,*]
Nguyễn Thị Kiều Anh[2]
[1]Trường Đại học Y Dược Huế - Đại học Huế,
[2]Trường Đại học Dược Hà Nội
**E-mail: thanhha.pham@gmail.com*

Summary

As herbal remedies and dietary supplements for arthritismic, antidiabetic, advertised as "all natural", but some have been found adulterated with synthetic drugs, a high performance thin layer chromatography (HPTLC) were developed for the identification of 3 groups of synthetic drugs (analgesics, non steroid antiinflamatory drugs, hypoglucomeia drugs) used as adulterants therein, using the TLC plates silica gel 60 F254. The mobile phases were cloroform-ethyl acetat-ethanol (8.5:1:0.5) for corticoids; n-hexan-ethyl acetat-acid acetic (6:2.5:1.5) for NSAIDs and n-butyl acetat-acid formic (100:0.5) for hypoglycemics. The methods were validated in terms of selectivity and limit of dectetion (LOD) in accordance with AOAC guidelines. As a preliminary application of the proposed methods, 160 marketed herbal products were tested. Of these, 19 samples were found adulterated with dexamethasone acetate, paracetamol, indomethacine, glibenclamide.

Keywords: *Analgesics, non steroid antiinflamatory drugs, hypoglucomeia drugs, high performance thin layer chromatography (HPTLC), herbal products.*

Đặt vấn đề

Ngày nay, số lượng người mắc các bệnh mãn tính ngày càng tăng do nhịp sống hiện đại, đặc biệt là bệnh xương khớp, bệnh tiểu đường đối với người già và có xu hướng trẻ hóa dần. Bên cạnh các thuốc hóa dược có tác dụng điều trị, các chế phẩm Đông dược và thực phẩm bảo vệ sức khỏe có nguồn gốc thảo dược có tác dụng phòng, hỗ trợ và điều trị các bệnh này ngày càng được ưa chuộng bởi người sử dụng cho rằng các sản phẩm này ít độc tính và ít có tác dụng phụ. Tuy nhiên, nhiều nhóm tác giả ghi nhận sự trộn trái phép các paracetamol và piroxicam trong 3 mẫu kiểm tra tại Indonesia [9]; 9 trong 26 mẫu thuốc gia truyền tại Trung Quốc dương tính với 7 thuốc nhóm giảm glucose máu [7].

Tại Việt Nam, khả năng chế phẩm Đông dược bị trộn 4 nhóm thuốc này rất lớn do chúng có giá thành hợp lý, tác dụng mạnh ở mức liều thấp nên khó phát hiện... Để góp phần kiểm tra, giám sát chất lượng các chế phẩm Đông dược lưu hành trên thị trường, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng phương pháp định tính 13 thuốc hóa dược nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu trộn lẫn trong chế phẩm Đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (***HPTLC***), đồng thời ứng dụng phát hiện các thuốc này trộn trái phéptrong chế phẩm Đông dược đang lưu hành trên thị trường.

Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn: Từ Viện Kiểm nghiệm thuốc TW: nhóm NSAID gồm: paracetamol (100,04 %), piroxicam (99,49 %), ketoprofen (99,54 %), indomethacin (99,7 %); nhóm corticoid gồm: betamethason (100,42 %), dexamethason acetat (99,6 %); hydrocortison acetat (99,5 %); prednisolon (99,94 %), prednison (99,19 %); Nhóm giảm glucose máu gồm: glibenclamid (100,10 %), gliclazid (99,53 %), glimepirid (99,49 %), glipizid (99,17 %).

Hóa chất, dụng cụ: Methanol, ethyl acetat, isopropanol, amoniac, cloroform, toluen, n-hexan, ethyl acetat, acid acetic và các dung môi hữu cơ đạt độ tinh khiết phân tích. Bản mỏng ***TLC*** silica gel 60 F254 của Merck (Đức).

Thiết bị nghiên cứu: Tất cả các thiết bị và dụng cụ phân tích phù hợp với yêu cầu nghiên cứu. Tiến hành phân tích trên hệ thống sắc kí lớp mỏng hiệu năng cao ***HPTLC*** CAMAG, CAT No 027.6200 (Thụy Sỹ): Bộ phận chấm bán tự động, bộ phận khai triển tự động, máy chụp ảnh, bộ phận phát hiện ***UV-VIS*** scanner của Camag và phần mềm điều khiển winCATS.

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử: Gồm 160 mẫu chế phẩm Đông dược, thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng bào chế viên nén, viên nang cứng, viên hoàn, cao thuốc, trà túi lọc và dạng bột trong nhóm chế phẩm có nguy cơ bị trộn trái phép: 119 chế phẩm điều trị bổ/hỗ trợ điều trị bệnh xương khớp (với nhóm NSAID và nhóm corticoid), 41 chế phẩm điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường (nhóm giảm glucose máu) 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.

Mẫu nền: Để có mẫu trắng chứa nền dược liệu nhưng không chứa các dược chất nghiên cứu, với mỗi nhóm thuốc tân dược, 3 mẫu nền (ở 3 dạng bào chế khác nhau) được xây dựng công thức và tiến hành bào chế tại Phòng Nghiên cứu phát triển của Công ty CP Traphaco. Các mẫu nền được thiết kế công thức sao cho các thành phần trong 3 mẫu placebo bao trùm được hầu hết các dược liệu và các chất độn, tá dược hay sử dụng trong các chế phẩm Đông dược trên thị trường. Dạng bào chế của mẫu nền thiết kế khác nhau với các nhóm, tùy thuộc chế phẩm khảo sát và thu thập được trên thị trường [1,7,2].

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký: Phương pháp ***HPTLC*** gồm pha tĩnh ***HPTLC*** silica gel 60 F254; quét phổ vết tương ứng của chất phân tích trên máy scanner để định tính và lựa chọn bước sóng định lượng; thể tích phun mẫu 5 µl, thời gian bão hòa dung môi 20 phút, thời gian sấy bản mỏng sau triển khai 20 phút. Khảo sát bằng thực nghiệm các hệ dung môi pha động đã tham khảo một số tài liệu [4,5,8], lựa chọn dung môi khai triển tách riêng từng nhóm chất corticoid, phi steroid (NSAID), giảm glucose máu.

Quy trình xử lí mẫu: Nghiền mịn mẫu, cân chính xác một lượng mẫu tương ứng với khoảng ½ liều dùng mẫu thử/ mẫu placebo vào ống ly tâm. Thêm 25 ml dung môi chiết. Lắc xoáy 5 phút, siêu âm 10 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Riêng với nhóm corticoid, do hàm lượng dược chất rất thấp, để tăng khả năng phát hiện, cần bổ sung thêm bước làm giàu mẫu bằng cô cách thủy 2,0 ml dịch lọc đến cắn rồi hòa tan lại trong 1,0 ml methanol. Tiến hành chấm sắc ký.

Thẩm định phương pháp: Theo hướng dẫn của AOAC với các tiêu chí gồm độ chọn lọc, giới hạn phát hiện (LOD).

Kết quả nghiên cứu

Xây dựng phương pháp phát hiện các chất nhóm giảm đau, chống viêm, giảm glucose máu trộn lẫn trong chế phẩm Đông dược

Khảo sát điều kiện sắc ký

Nhóm corticoid: Pha dung dịch chuẩn betamethason, dexamethason acetat, hydrocortison acetat, prednisolon, prednison có nồng độ khoảng 1 mg/ml trong methanol. Phân tích mẫu chuẩn đơn, chuẩn hỗn hợp và mẫu nền (đã xử lý theo quy trình xử lý mẫu đã mô tả trong phương pháp nghiên cứu) trên bản mỏng ***HPTLC***. Dựa vào độ tan của các chất phân tích trong dung môi và tham khảo các nghiên cứu đã công bố, tiến hành khảo sát trên 6 hệ pha động gồm: Hệ 1: toluen-ethyl acetat-nước (7:3:5); Hệ 2: cloroform-aceton-nước (8:2:5); Hệ 3: cloroform-ethyl acetat (9:1); Hệ 4: cloroform-methanol (9:1); Hệ 5: cloroform-ethanol (9:1); Hệ 6: cloroform-ethyl acetat-ethanol (8,5:1:0,5). Kết quả cho hệ dung môi được lựa chọn cuối cùng 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 (hình 1).

Nhóm NSAID: Pha các dung dịch chuẩn gốc paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen trong methanol có nồng độ khoảng 500 µg/ml. Phân tích mẫu chuẩn đơn, chuẩn hỗn hợp và mẫu nền trên bản mỏng. 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: cloroform-methanol-amoniac 25 % (18:15:5); Hệ 2: toluen-n-propanol-acid formic (5:4:1); Hệ 3: cloroform-methanol (9:1); Hệ 4: n-hexan-ethyl acetat-acid acetic (6:2,5:1,5). Kết quả cho thấy hệ dung môi được lựa chọn 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 (hình 1).

Nhóm giảm glucose máu: Pha dung dịch chuẩn glipizid, glimepirid, glibenclamid, gliclazid nồng độ 1 mg/ml trong methanol. Dựa vào độ tan của các chất phân tích trong dung môi và tham khảo các nghiên cứu đã công bố, tiến hành khảo sát trên 5 hệ pha động gồm: Hệ 1: n-butanol-acid acetic-nước (11:2:2); Hệ 2: methanol-nước-acid acetic băng (6:4:0,25); Hệ 3: n-butanol-acid acetic-nước-methanol (12:4:1:2); Hệ 4: n-butyl acetat-acid formic (100:0,5); Hệ 5: ethyl acetat-toluen-diethylether-acid acetic (30:10:10:0,1). Kết quả hệ dung môi n-butyl acetat-acid formic (100:0,5) cho kết quả tách tốt nhất, với R_f các chất từ 0,24–0,72 (hình 1).

Khảo sát bước sóng phát hiện

Quét phổ tại các vết tương ứng các chất trên sắc đồ, cho kết quả như sau:

Nhóm NSAID: Paracetamol 1 cực đại ở 247 nm, piroxicam 2 cực đại ở 236 nm và 282 nm, indomethacin 2 cực đại ở 271 nm và 318 nm, và ketoprofen 1 cực đại ở 255 nm.

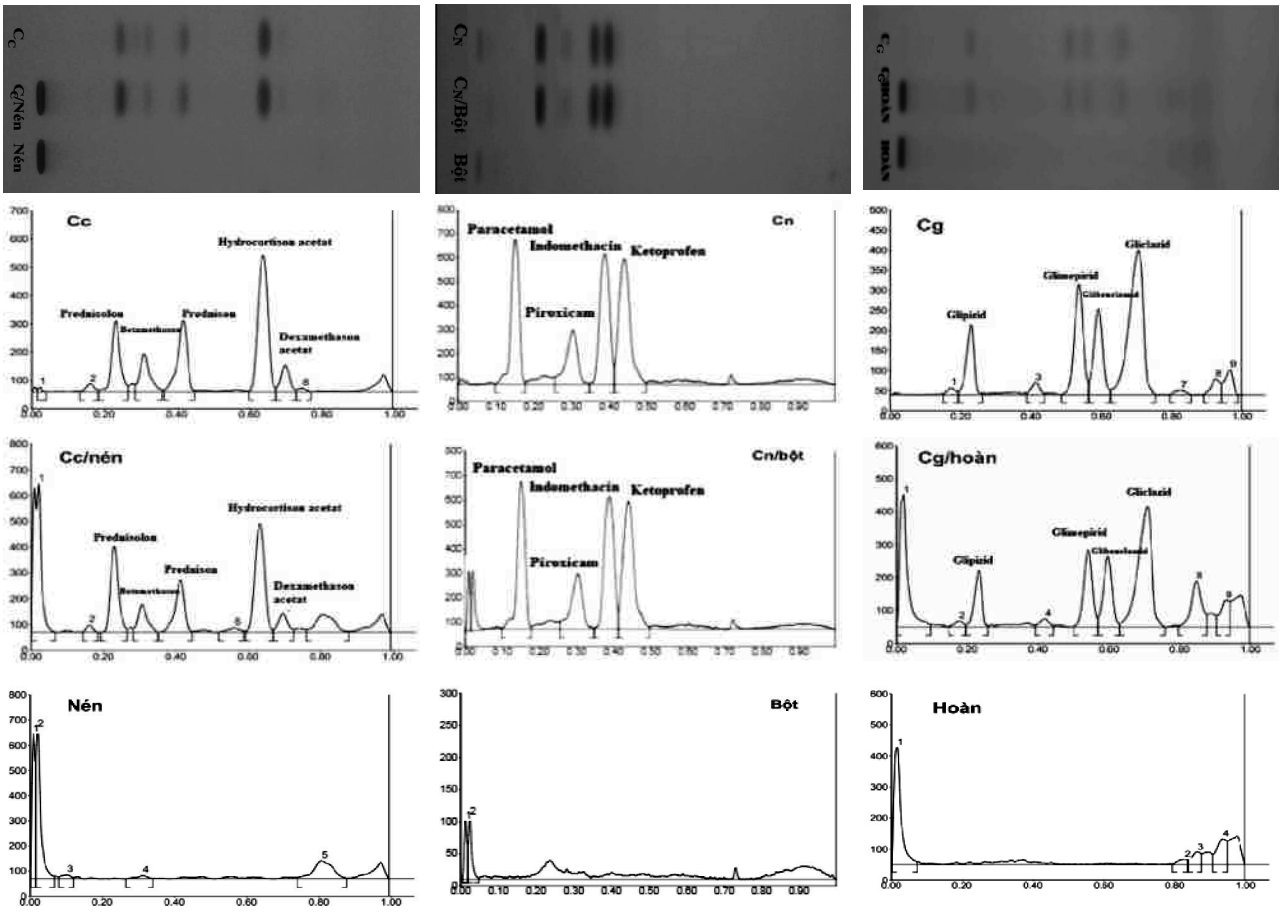
Nhóm giảm glucose máu: Glibenclamid 2 cực đại ở 235 nmm và 310 nm; glipizid 2 cực đại ở 233 nm và 279 nm; gliclazid 1 cực đại ở 232 nm và glimepirid 1 cực đại ở 235 nm.

Nhóm corticoid: 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.

Thẩm định phương pháp phân tích

Tính chọn lọc

Tính chọn lọc của các phương pháp phân tích được đánh giá thông qua kết quả phân tích trên các mẫu chuẩn hỗn hợp (mẫu chuẩn), 3 mẫu nền và 3 mẫu nền tương ứng được thêm chuẩn (mẫu thêm chuẩn). Mỗi nhóm chất đều được khảo sát trên 1 mẫu chuẩn, 3 mẫu nền và 3 mẫu thêm. Các mẫu được xử lý theo quy trình ở phần phương pháp nghiên cứu, tiến hành sắc ký trên hệ thống ***HPTLC***.



Hình 1. *Độ chọn lọc* **–** *Hình chụp bản mỏng sắc ký của 3 hệ dung môi tương ứng cho từng nhóm: Corticoid (C_c), NSAID (C_n) và giảm glucose máu (C_g), mỗi nhóm chọn lấy ví dụ đại diện 1 mẫu nền trong 3 dạng bào chế nghiên cứu. Tương ứng là các sắc đồ* ***HPTLC*** *của các mẫu chuẩn (C_c, C_n và C_g); của 3 mẫu nền với 3 dạng bào chế (Nén – viên nén, Bột – thuốc bột và Hoàn – viên hoàn); và của 3 mẫu thêm chuẩn (C_c/nén – chuẩn corticoid trộn với mẫu nền viên nén, C_n/bột – chuẩn NSAID trên mẫu nền thuốc bột, và C_g/hoàn – chuẩn thuốc giảm glucose máu trên mẫu nền viên hoàn).*

Nhóm corticoid: Nồng độ các chất trong mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn là: betamethason, dexamethason acetat 3,0 mg/ml mỗi chất; prednisolon, prednison 5,0 mg/ml mỗi chất và hydrocortison acetat 2,5 mg/ml. Các mẫu nền cho nhóm corticoid gồm viên nang, viên nén và thuốc bột. 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. 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 - hình 1). Khi quét phổ ***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. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ chọn lọc.

Nhóm NSAID: Nồng độ các chất trong mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn là 1,0 mg/ml với cả 4 chất paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen, 3 mẫu nền là 3 dạng bào chế viên nang, viên nén và thuốc bột. 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 - hình 1), 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 trong mẫu thêm chuẩn đều > 0,99.

Nhóm giảm glucose máu: Nồng độ các chất trong mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn là 1,0 mg/ml với cả 4 chất glipizid, glimepirid, glibenclamid và gliclazid, 3 mẫu nền có dạng bào chế là viên nang, viên nén và viên hoàn. Tương tự như với 2 phương pháp trên, 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 - hình 1), 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.

Giới hạn phát hiện (LOD)

Với cả 3 nhóm hoạt chất, tiến hành xác định LOD tương tự nhau như sau, mỗi nhóm thực hiện trên 3 mẫu nền tương ứng. Cân một lượng nền mẫu tương đương khoảng ½ liều dùng. Sau đó thêm vào mỗi mẫu nền 1,0 ml các dung dịch chuẩn hỗn hợp với nồng độ giảm dần cho đến nồng độ không còn phát hiện được chất cần phân tích. Làm đồng đều mẫu và cô cách thủy đến khô, thu được các mẫu thêm chuẩn. Tiến hành xử lý mẫu như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu.

Tiến hành phân tích bằng ***HPTLC*** theo các điều kiện đã xây dựng, phát hiện và xử lý hình ảnh sắc đồ bằng ***UV-VIS*** scanner. Giới hạn phát hiện được xác định ở hàm lượng cho hệ số S/N (đáp ứng/nhiễu nền) khoảng 3. Kết quả được trình bày ở bảng 1, tính theo khối lượng hoạt chất trên vết sắc ký (ng/vết) với thể tích chấm 5 µl.

Bảng 1. *Kết quả xác định LOD (ng/vết) của phương pháp*

Nhóm giảm glucose máu	***Nén***	***Nang***	***Hoàn***	***Nhóm NSAID***	***Nén***	***Nang***	***Bột***
Glipizid	180	30	60	*Paracetamol*	50	50	50
Glimepirid	60	30	30	*Piroxicam*	50	50	50
Glibenclamid	30	60	30	*Indomethacin*	50	50	35
Gliclazid	60	60	120	*Ketoprofen*	50	50	50
Nhóm corticoid	***Nén***	***Nang***	***Bột***	***Nhóm corticoid***	***Nén***	***Nang***	***Bột***
Betamethason	20	20	40	*Prednisolon*	60	30	120
Dexamethason acetat	40	40	40	*Prednison*	60	30	120
Hydrocortison acetat	30	30	60				

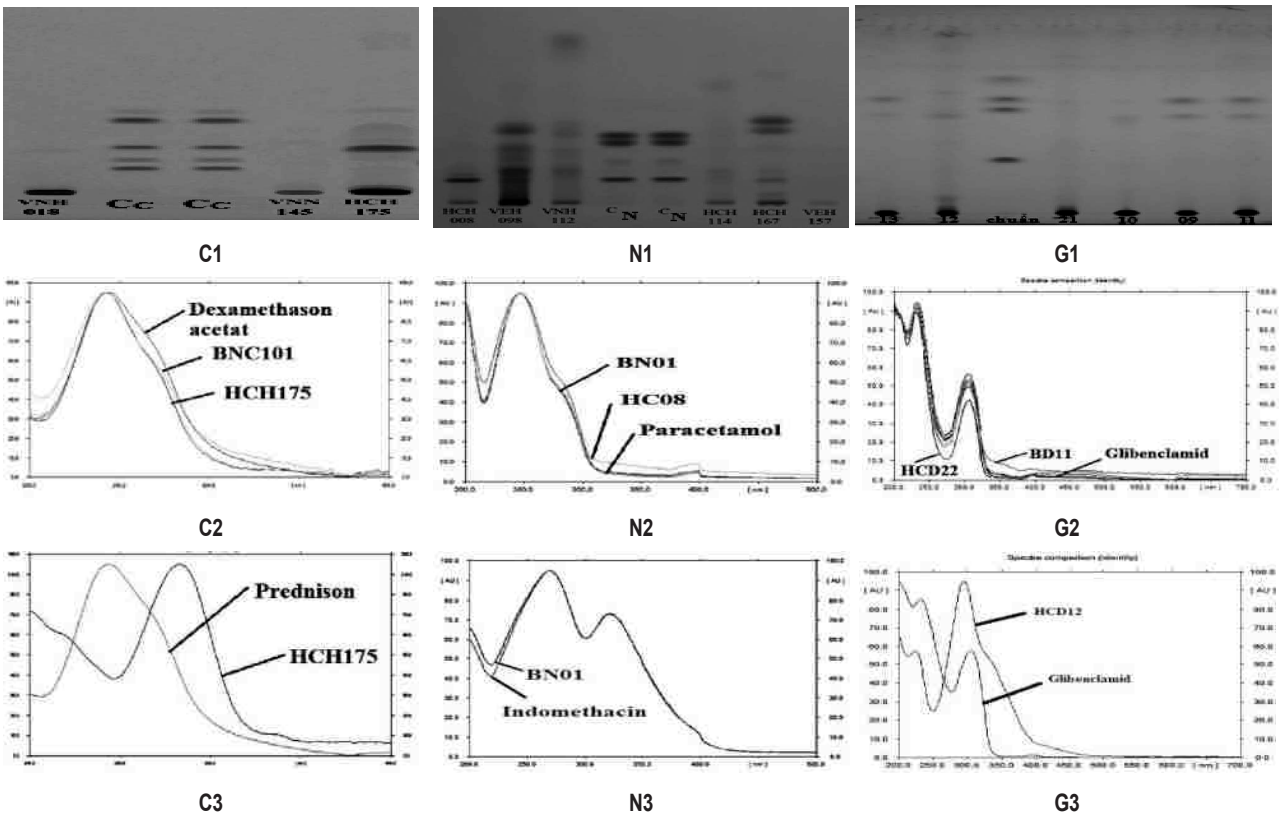
Với nền mẫu phức tạp, hoạt chất không khai báo với hàm lượng tùy ý và số lượng mẫu lớn thì phương pháp ***HPTLC*** rất phù hợp do vượt trội về tính đặc hiệu và giới hạn phát hiện so với ***TLC*** thông thường; do khả thi, tiết kiệm về chi phí và thời gian so với ***HPLC*** [6] và ***LC-MS*** [6]. Kết quả thẩm định đều đạt được độ chọn lọc và giới hạn phát hiện theo AOAC, nhóm giảm glucose máu có LOD thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Kumaska K. [8] với LOD nằm trong khoảng 250 - 500 ng/vết; với nhóm corticoid có LOD thấp hơn so với nghiên cứu của Lê Đào Khánh Long [4] với LOD từ 100 - 200 ng/vết.

Ứng dụng phân tích mẫu thực

Nhóm corticoid và nhóm NSAID: Tiến hành khảo sát chung với 119 mẫu thử (bệnh xương khớp), trong đó có 44 mẫu viên nang, 20 mẫu viên nén, 45 mẫu hoàn cứng, 4 mẫu thuốc bột, 1 mẫu túi trà, 1 mẫu viên ngậm, 2 mẫu thuốc nước và 2 mẫu hoàn mềm. Kết quả 11 mẫu dương tính với nhóm corticoid và nhóm NSAID trong đó có 7 mẫu dương tính với paracetamol (BN01, hình 2-N_1), 1 mẫu dương tính với cả paracetamol (BN01, hình 2-N_2) và indomethacin (BN01, hình 2-N_3), 1 mẫu dương tính với cả paracetamol và dexamethason acetat (HCH176),

2 mẫu dương tính với dexamethason acetat (BNC101 và HCH175, hình 2-C_2). Trong đó, HCH175 có 2 vết có R_f tương đương với dexamethason acetat và prednison (hình 2-C_1); nhưng kết quả chồng phổ chỉ dương tính thực với dexamethason acetat, mà âm tính với prednison (hình 2-C_3). Nếu định tính chỉ bằng R_f (trong ***TLC*** thông thường), mẫu HCH175 sẽ bị kết luận dương tính giả với prednison (có thể do thành phần khác trong mẫu rửa giải trùng vị trí với prednison). Như vậy, phương pháp ***HPTLC*** sẽ tránh được hiện tượng dương tính giả này, cho kết luận định tính tin cậy hơn.

Nhóm giảm glucose máu: Khảo sát 41 mẫu chế phẩm Đông dược trong đó 22 mẫu mua tại nhà thuốc có số đăng ký, 19 mẫu đặt mua qua mạng internet hoặc của lương y, lương dược không có số đăng ký. Kết quả cho thấy có 8 mẫu bị trộn trái phép glibenclamid, với hệ số chồng phổ > 0,99 và độ tinh khiết pic > 0,99 (hình 2-G_2); hệ số chồng phổ với mẫu HCD12 (so với vết glibenclamid) nhỏ hơn 0,99 và hình dạng và cực đại ***UV*** khác hoàn với glibenclamid (hình 2-G_3).



Hình 2. *Sắc đồ mẫu thực kiểm tra nhóm corticoid (C_1), nhóm NSAID (N_2), nhóm giảm glucose máu (G_1); hình ảnh chồng phổ phát hiện mẫu dương tính với dexamethason (C_2), paracetamol (N_2), indomethacin (N_3), glibenclamid (G_2) và mẫu âm tính với prednison (C_3) và glibenclamid (G_3)*

Trong số 160 mẫu chế phẩm được kiểm tra, nghiên cứu phát hiện có 19 mẫu dương tính (11,9 %) với 4 hoạt chất dexamethason acetat, paracetamol, indomethacin, glibenclamid, đặc biệt có 2 mẫu dương tính với 2 hoạt chất chiếm 1,3 %. Trong 19 mẫu dương tính, dạng bào chế thuốc bột chiếm 26,3 % chủ yếu dương tính với nhóm NSAID; dạng viên hoàn chiếm 57,9 % với nhóm giảm glucose máu có số lượng dương tính nhiều nhất; dạng viên nang chiếm 15,8 % số mẫu dương tính với nhóm NSAID và nhóm giảm glucose máu.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được 3 phương pháp ***HPTLC*** phát hiện cho riêng từng nhóm corticoid, nhóm NSAID và nhóm giảm glucose máu với 13 hoạt chất thường trộn trái phép trong chế phẩm Đông dược. Mẫu thử được xử lý nhanh, đơn giản. Phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cao trên 3 nền mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh xương khớp, 3 nền mẫu điều trị và hỗ trợ điều trị tiểu đường, giới hạn phát hiện thấp (20 - 120 ng/vết), đáp ứng yêu cầu của AOAC 2016. Phương pháp có tính khả thi cao với yêu cầu ứng dụng phân tích số lượng mẫu thực lớn lưu hành trên thị trường. Nghiên cứu đã phát hiện 19 trong 160 mẫu chế phẩm dương tính với 4 hoạt chất (chiếm 11,9 %).

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Y tế "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" giai đoạn 2017-2019.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Trung Đàm (2012), ''Các cây thuốc có tác dụng làm hạ glucose huyết và điều trị đái tháo đường'', *Tạp chí Dược học,* số 432(4), tr. 06-10.

2. 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, số 405* (1), tr. 30-35.

3. Cao Công Khánh, Nguyễn Tường Vy, Hoàng Quỳnh Trang (2013), ''Nghiên cứu quy trình xác định đồng thời sibutramin, furosemid, dexamethason và piroxicam trong thực phẩm chức năng bằng kỹ thuật HPLC'', *Tạp chí Dược học,* số 445 (5), tr. 40-44.

4. 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.

5. Phạm Thị Tâm, Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Minh Hoàng, Nguyễn Thị Kiều Anh (2017), ''Xây dựng phương pháp xác định metformin và glibenclamid trộn trái phép trong chế phẩm Đông dược bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao'', *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc,* 8(3), tr. 25-30.

6. 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.

7. 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.

8. 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 chrom. and high-performance liquid chrom.'', *J. of Health Sci.,* 51(4), pp. 453-460.

9. 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'', *Inter. J. of Pharm. and Pharm. Sci.,* 5(4), pp. 749-753.

(*Ngày nhận bài: 11/01/2019 - Ngày phản biện: 27/02/2019 - Ngày duyệt đăng: 10/04/2019*)

Xác định tạp đồng phân đối quang R-ketoprofen trong viên nén dexketoprofen bằng phương pháp HPLC

Lê Thị Hường Hoa[1]*, Đỗ Thu Trang[1], Lê Đình Chi[2]

[1]Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

[2]Trường Đại học Dược Hà Nội

**E- mail: hoalethihuong@gmail.com*

Summary

An HPLC method was proposed for determination of R-enantiometric impurity of Ketoprofen. Chromatographic conditions were as follows: Culumn - Chiral column (150 x 4.0 mm) containing 5 µm packing alpha glycoprotein acid; temperature – ambient; Detector - UV (240 nm); Mobile phase - the following mixture: to 1000 ml of 10mM Sodium dihydrogen phosphate solution, 1.0ml of N,N-Dimethyloctylamine and 30 ml of Isopropanol were added; Flow rate - 0.8 ml/minute; Injection volume - 20 µL. The method was validated for the specificity, linearity, precision, accuracy, LOD and LOQ. These all proved the method suitable for determination of R-Ketoprofen impurity in Ketoprofen tablets.

Keywords: *Dex-ketoprophen, R-ketoprophen, enantiometric.*

Đặt vấn đề

Dexketoprofen (Dke) là đồng phân S của ketoprofen. Dexketoprofen là thuốc kháng viêm không steroid làm giảm tổng hợp prostagladin thông qua ức chế hoạt tính cyclooxygenase [3,4]. Giới hạn tạp đồng phân R-ketoprofen (RKe) là một trong những chỉ tiêu cần kiểm tra để đánh giá chất lượng dexketoprofen trong nguyên liệu và các thành phẩm thuốc chứa nguyên liệu này. Hiện nay, trong các dược điển chưa có phương pháp xác định tạp đồng phân R của ketoprofen [1,4]. Một số bài báo quốc tế xác định tạp đồng phân này bằng cột sắc ký đối quang Chiralpak IC với pha động không phân cực n-hexan- isopropanol [2]. Sau đây chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu xác định tạp đồng phân đối quang R-ketoprofen trong viên nén Dexketoprofen bằng cột đối quang Chiral AGP.

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

VĂN BẢN ĐỒNG Ý CHO SỬ DỤNG BÀI BÁO/CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA ĐỒNG TÁC GIẢ

Chúng tôi là:

1. Nguyễn Thị Kiều Anh, công tác tại Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, trường ĐH Dược Hà Nội.
2. Phạm Thị Thanh Hà, công tác tại Bộ môn Hóa Phân tích, trường ĐH Dược Hà Nội.

Là đồng tác giả với NCS Đào Thị Cẩm Minh trong 1 bài báo/công trình nghiên cứu sau đây:

1. 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*, số 516 tập 59, trang 57-62.

Tôi hoàn toàn đồng ý cho NCS Đào Thị Cẩm Minh được sử dụng nội dung các bài báo/công trình nghiên cứu trên vào mục đích nghiên cứu, viết và báo cáo luận án tiến sĩ của NCS ở các cấp.

Hà Nội, ngày 15 tháng 04 năm 2019

Đồng tác giả

Nguyễn Thị Kiều Anh

Phạm Thị Thanh Hà

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Editors

C. Barbas, Universidad San Pablo, Boadilla del Monte, Spain

B. Chankvetadze, Tbilisi State University, Tbilisi, Georgia

S. Furlanetto, Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino, Italy

J. Haginaka, "School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences". Mukogawa Women's University, 11-68 Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya 663-8179, Japan. E-mail: jpba@mukogawa-u.ac.jp

S. Li, University of Macau, Taipa, Macau, China

R. Moaddel, Baltimore, MD. 21224. USA. Tel: - +1-301-792-6579. E-mail ID rmoaddel@hotmail.com

J.-L. Veuthey, Université de Genève, Centre Medical Universitaire (CMU), Geneva

M. Ganzera University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

S. Ozkan Ankara University, Ankara, Turkey

Editorial Advisory Board

S. Baertschi (Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, USA)
C. Bertucci (Università di Bologna, Bologna, Italy)
F. Bressolle (Université de Montpellier, Montpellier, France)
F. Busardò (Università Politecnica delle Marche Ancona, Italy)
L. Ciesla (University of Alabama, Tuscaloosa, Alabama, USA)
S. Fanali (University of Verona Verona, Italy)
S. FEKETE (Université de Genève Geneva, Switzerland)
A. Garcia (Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain)
S. Görög (Budapest 10, Hungary)
R. Gotti (Università di Bologna, Bologna, Italy)
K. Hamase (Kyushu University Fukuoka, Japan)
B.L. He (Bristol-Myers Squibb Company New Brunswick, New Jersey, USA)
T. Higashi (Tokyo University of Science Noda, Japan)
E. Hilder (University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia)
U. Holzgrabe (Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Germany)
P. Hubert (Université de Liège Sart-Tilman Liège 1, Belgium)
Z. Jiang (Jinan University Guangzhou, China)
K. Jozwiak (Medical University of Lublin, Lublin, Poland)
M. Markuszewski (Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland)
L. Mercolini (Università di Bologna Bologna, Italy)
R.H.H. Neubert (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany)
R. Oliveira (Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil)
B. Olsen (Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, USA)
S. Orlandini Università degli Studi di Firenze, Firenze FI, Italy)
F. Pellati (University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy)
K. Phinney (National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, Maryland, USA))
S. Pichini (Ist. Superiore di Sanita, Rome, Italy)
S. Pinzauti (Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino, Italy)
S. Rudaz (Université de Genève, Geneva, Switzerland)
G.K.E. Scriba (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany)
K. Shimada (Sendai, Japan)
S. Singh National Inst. of Pharma. Education & Research, Punjab, India)
S. Suzuki (Kindai University, Higashi-osaka, Japan)
E. Szökö (Semmelweis University of Medicine, Budapest, Hungary)
T.-H. Tsai (National Yang Ming University, Miaoli, Taiwan)
A. Van Schepdael (KU Leuven, Leuven, Belgium)
Y. Vander Heyden (Vrije Universiteit Brussel (VUB), Bruxelles, Belgium)
B. Venhuis (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)
I.D. Wilson (Imperial College London, London, England, UK)
G. Xu (Chinese Academy of Sciences (CAS), Dalian, China)
M. Ye (Peking University, Beijing, China)

Processed at Thomson Digital, Gangtok (India)

doi: 10.1016/S0731-7085(19)31825-4

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 174 (2019) 340–347

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Detection of sildenafil adulterated in herbal products using thin layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy: "Double coffee-ring effect" based enhancement

Dao Thi Cam Minh[a,b], Le Anh Thi[c], Nguyen Thi Thanh Huyen[a,d], Le Van Vu[e], Nguyen Thi Kieu Anh[a], Pham Thi Thanh Ha[a,*]

[a] Department of Analytical Chemistry and Toxicology, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam
[b] Department of Drug Quality Control – Analytical Chemistry – Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue, Vietnam
[c] Institute of Research and Development, Duy Tan University, Da Nang 550000, Vietnam
[d] Department of Chemistry, Hai Duong central college of pharmacy, Hai Duong, Vietnam
[e] Center for Material Sciences, Faculty of Physics, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 February 2019
Received in revised form 19 May 2019
Accepted 20 May 2019
Available online 2 June 2019

Keywords:
Sildenafil
TLC
SERS
Herbal
CRE
Adulteration

ABSTRACT

Sildenafil is an inhibitor of the phosphodiesterase type 5 which is commonly adulterated in herbal health products. In this study, a rapid, sensitive and selective method using thin layer chromatography (TLC) combined with surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was developed for identification of sildenafil adulteration in herbal drugs and dietary supplements. TLC separation method was developed and different SERS factors were investigated: nanosilver colloid preparation, concentration and volume, and coffee-ring effect (CRE) enhancement for SERS measurement. "Double CRE" - a newly observed effect that resulted in the redistribution of both silver nanoparticles and sildenafil molecules – was reported for the first time in TLC-SERS applications. This method presented an efficient TLC-SERS performance enhanced by the "hot spots" obtained under double CRE. The method was validated in terms of selectivity on three blank matrixes (capsule, granule, and herbal extract) and sensitivity with a limitation of detection (LOD) of 2 ng/spot for sildenafil. The validated method was implemented on 9 herbal products sold on the market as erectile dysfunction therapy. Two products were detected with sildenafil adulteration by the TLC-SERS method and confirmed by parallel LC–MS/MS analysis. These results exhibited the reliability and feasibility of the developed method in adulteration screening for sildenafil. On the other hand, the novel findings on double CRE provided extra information for CRE optimization in TLC-SERS applications.
© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sildenafil (SIL) is a phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitor used in men erectile dysfunction treatment. During the past few decades, it has been adulterated into many traditional and herbal medicines and dietary supplements, resulting in serious health problems for users [1,2]. Many modern analytical techniques are used to detect adulterants in traditional herbal medicines and dietary supplements. Some common methods include high-performance liquid chromatography (HPLC) [3] or high-performance thin layer chromatography (HPTLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) [4] or liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) [5]. These methods require delicate equipments, therefore are not always practical for onside detection. Thin layer chromatography (TLC) is a fast, simple, portable analytical method for screening of unapproved analyses in a complex matrix [6,7]. It is officially included in the GPHF-Minilab™ – the on-site analysis tool kit for protection of counterfeit medicines provided by Global Pharma Health Fund. However, the selectivity of TLC is not sufficient for confirmation of illegal adulteration.

On the other hand, Raman spectroscopy, especially surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a highly specific analytical technique that can be efficiently used for chemical and physical structure illucidation [8,9], and for qualitative analysis [10] as well. However, SERS is not easily used to detect analytes in the complex matrix. Matrix like herbal products contain many components with high fluorescence that can inhibit the SERS measurement.

* Corresponding author.
E-mail address: thanhha.pham@gmail.com (P.T.T. Ha).

https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.043
0731-7085/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Therefore, combining TLC with SERS is a recent solution to detect adulterated drugs in complexed ingredient samples. TLC-SERS setup includes 2 steps: (1) separating analytes of interest from the intefering matrix on TLC plates and (2) introducing metal nanoparticle colloids onto the spots of analyte on TLC plate, followed by immediate measurement of the enhanced Raman scattering signals. The combination helps to overcome disadvantages of both techiniques: TLC separation minimizes the influence of complexed ingredients on the SERS scattering signal of the analyte of interest, and SERS significantly improves the selectivity and sensitivity of TLC detection. Various analytes were successfully detected by TLC–SERS methods in complexed matrixes for multiple purposes namely natural compounds study in herbs [11], environmental pollutant analysis [12], food safety evaluation [13], forensic analysis [14] and therapeutic drug monitoring (TDM) analysis in human plasma [15] and urine [16], and especially in adulteration screening in herbal dietary supplements products [17–20].

Concerning sildenafil adulteration in herbal products, X. Hu et. al. developed a TLC-SERS method for detection of 6 PDE-5 inhibitors including sildenafil, vardenafil and 4 of their analogues [18]. The developed method was utilized for analysis of 3 real samples, but no adulteration was found. In the present paper, a TLC-SERS method was developed, validated and successfully applied for the detection of sildenafil adulteration in herbal medicines and dietary supplements collected from local market. In addition, coffee-ring effect (CRE) phenomenom [16] which significantly affects the efficacy and repeatability of TLC-SERS performance was thoroughly investigated and analyzed in this study. The “double coffee-ring effect” phenomenon was described for the first time, in which CRE affected the redistribution of both nano silver particles and the analyte molecules (sildenafil). Optimization was done on the preparation, concentration and volume of the nanosilver colloid, as well as the position of colloid introduction onto TLC plate and position to measure Raman signal. This is the basis for releasing a rapid, sensitive and selective method of detection of sildenafil adulterated in real samples collected from Vietnam local market. The double CRE pattern discovered can also be helpful for further studies on TLC-SERS analysis of other substances.

2. Materials and methods

2.1. Chemical reagents and materials

National reference standards of sildenafil citrate (98.28%) and tadalafil hydrochloride (97.65%) were purchased from National Institute of Drugs Quality Control of Vietnam (NIDQC), whereas European Pharmacopeial reference standard of vardenafil hydrochloride (100.0%) was obtained from EDQM. Silver nitrate ($AgNO_3$), sodium citrate, and organic solvents were purchased at analytical grade. Classical silica gel 60 F254 TLC plates (Merck, Germany) were used.

2.2. Apparatus and equipment

Ultraviolet-visible absorption spectra of silver colloids were obtained with a UV-spectrophotometer Probe (Shimadzu, Japan). An HPTLC system (Camag, Switzerland) was used for repeatable sampling, reproducible development conditions with temperature and humidity control. Raman spectra were recorded with a LabRAM HR μ-Raman (Horiba Jobin Yvon S.A.S, France) with input laser light of 633 nm. LC–MS/MS analysis was implemented on an EVOQ Qube™ Triple Quadrupole LC–MS system (Bruker, USA), with Ultra C18 (Restek, USA) column (100 mm x 2.1 mm; 1.9 μm). Other equipments included Labinco BV 146 vortex (Labinco, Netherlands), Elma D-78224 Singen/Htw ultrasonic (Elma, Germany), Kubota 6500 centrifuge (Kubota, Japan).

2.3. Sample preparation

Traditional and herbal products for treatment of erectile dysfunction in men were purchased online and directly from pharmacies. The samples included 1 granule, 7 capsules and 1 herbal extract.

Placebo samples were prepared from major representative herbal medicines and excipients which were presented clearly in Vietnamese Pharmacopoeia 5th edition (2017) and official books for traditional medicine: Minh Mang remedy, and Hai Thuong traditional remedy handbook. Three formulations of *placebo samples* were designed to comprehensively cover herbal and traditional ingredients for erectile dysfunction treatment, and to cover 3 most commonly found dosage forms: capsule, granule, and herbal extract. These *placebo samples* were used for method development and validation to ensure the selectivity of the analysis on complexed ingredient products available on the market.

The sample was grinded and mixed to obtain a homogeneous and representative sample. An aliquot of sample equivalent to half a dose was transferred into a 25 ml volumetric flask, suspended with 20 ml of methanol, vortexed in 5 min, ultrasonicated in 10 min, then diluted with methanol to volumn and thoroughly mixed. The sample was then centrifuged in 5 min at 13,522 *g* and filtered through a 0.45 μm filter membrane before analysis.

2.4. Silver colloid preparation

Nanosilver colloid was prepared according to the method of Lee-Meisel [21] adjusted by Wei Meng [22]. First, 194 ml of distilled water was heated to 100 °C under reflux with vigorous stirring. Upon boiling, 2 ml of 0.1 mol/L $AgNO_3$ and 4 ml of 1% sodium citrate were added successively to start the reaction. The solution was refluxed for 40 min then cooled to room temperature. After that, the solution was stored in the refrigerator for use during 6 months. Necessary dilutions could be made before analysis for the best SERS enhancement.

2.5. Analytical methods

2.5.1. TLC-SERS method

Using Linomat 5 automatic TLC sampler (Camag), 5 μl of sample solution was sprayed on a 20 × 10 cm aluminium TLC plate. The separation was then developed in automatic developing chamber ADC2 (Camag) with saturation time of 10 min, development time of 20 min (humidity controlled by saturated KSCN at 43%RH and 25 °C). TLC spot equivalent to the retardation factor (R_f) of sildenafil was marked under UV illumination at 254 nm in UV Cabinet 4 (Camag), then 1,5 μl of silver colloid was applied directly on the marked spot on TLC plate. Finally, SERS spectrum for each separated spot was recorded using LabRAM μ-Raman with a CCD camera and input laser beam of 633 nm in 60 s, through a 50x microscope objective. The obtanied data were proccessed and interpreted by LabSpec 5 software. Validation of the selectivity and limit of detection according to AOAC [23].

2.5.2. LC–MS/MS method

An LC–MS/MS method with conditions according to Lee E.E et al [24] with some improvements was used for the analysis of real samples collected from market. TLC-SERS identification results were verified by LC–MS/MS. An Ultra C18 column (100 mm × 2.1 mm; 1.9 μm) was used with a mobile-phase gradient prepared from water with formic acid 0,1% (A) and acetonitrile with formic acid 0.1% (B); the gradient began 30% B; linear increase from 30 to 70% B

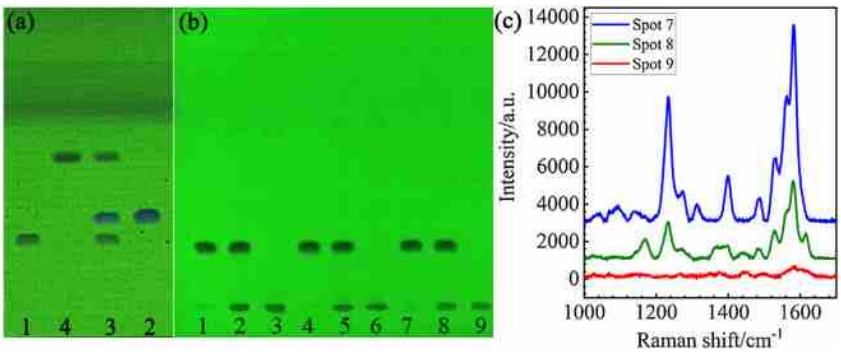


Fig. 1. Image of TLC separation of sildenafil from 2 other PDE-5 inhibitors: (a) 1-sildenafil, 4: tadalafil, 2-vardenafil and 3-mixture of 3 references; (b) sildenafil from the capsule placebo matrix: 7-sildenafil reference, 8-sildenafil in capsule matrix and 9-placebo capsule matrix and (c) the corresponding SERS spectra of the 3 spots.

in 7 min; linear decrease from 70-30% B in 1.5 min, and held at 30% B for 3.5 min, injection volume was 2 μl, the flow rate was 0.3 ml/min, and the column temperature was 40 °C, analysis time was 12 min. Sildenafil was detected on ESI (+) mode with *m/z* of parent ion of 475.2 and two product ions of 100.3 and 283.0; the ratio of the product ions were 76.3% ±20% and 23.7% ±20% for 100.3 and 283.0, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of mobile phase (TLC)

Three most commonly used PDE-5 inhibitors include sildenafil, tadalafil and vardenafil. Therefore, the TLC method was developed to separate these 3 compounds from one another and from the compounds from complexed herbal ingredients in the *placebo samples*. The reference solutions of 1 mg/ml of each compound and the extract of *placebo samples* were applied to TLC plates. Six different solvent mixtures were tested as mobile phase: methanol-chloroform (4:1, v/v), diethyl ether-25% ammonia-methanol (70:5:3, v/v/v), chloroform-methanol-diethylamine (90:10:1, v/v/v); chloroform-methanol-ammonia (90:1:5, v/v/v) ethyl acetate-isopropanol- 25% ammonia (45:5:1, v/v/v) and ethanol- n-hexane – 25% ammonia (70:30:1, v/v/v). After development, spots corresponding to the standards were observed under UV light (254 nm and 366 nm).

The results showed that the ethyl acetate-isopropanol- 25% ammonia (45:5:1, v/v/v) mobile phase gave clearly resolved and well separated with the other components. However, sildenafil had a low R_f and should continue adjusting the solvent ratio. It is found that the ratio of ammonia in the mobile phase significantly affects the mobility and separation of sildenafil from the sample. With adjusted mobile phase of ethyl acetate-isopropanol-25% ammonia (45:5:2.6, v/v/v), sildenafil was completely separated from tadalafil, vardenafil (Fig. 1(a)) and the matrix (Fig. 1(b) and (c)), with R_f of 0.21.

3.2. Optimization of TLC-SERS method

3.2.1. Characterization of silver nanoparticles (Ag NPs)

UV-Vis spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM) was used to characterize the morphology of the silver nanoparticles (AgNPs) colloids, which is illustrated in Fig. 2. The UV–vis absorbance peak was fit with a Gaussian curve with a maximum of 417 nm (Fig. 2(a)). The full width at half-maximum (FWHM) value obtained from a Guassian fit was approximately 77 nm. This result indicated a relatively good uniformity of AgNPs size. The same finding can be observed from TEM image (Fig. 2 (b)). TEM image shows that the particles are quasi-spherical, uniform with average size of nearly 35 nm (measured as equivalent circle diameter). Both characteristics (small nano size and uniformity of size) are beneficial for the formation of "hot spots", which would result in better enhancement of SERS.

3.2.2. The Raman characteristic peaks of sildenafil

The Raman spectra of sildenafil powder and sildenafil solution (without AgNPs enhancement) and SERS spectrum of sildenafil solution (with AgNPs enhancement) were recorded to investigate the characteristic peaks (Raman shifts) of sildenafil. Table 1 presents the Raman shifts recorded on sildenafil powder Raman spectrum and sildenafil solution SERS spetrum, compared to literature [25]. The Raman spectrum of 100 μg/ml sildenafil solution hardly showed any peaks, whereas the SERS spectrum of the same solution presented many typical peaks of sildenafil with high intensity. Fig. 3(a) showes a significant Raman enhancement in the SERS spectrum of sildenafil, with typical peaks in accordance with that of the Raman spectrum of the sildenafil powder.

In general, there are usually some changes in vibrational frequencies of the SERS spectrum of a compound, when compared with its normal Raman spectrum. For sildenafil, some minor changes were also observed (Fig. 3(a) and Table 1). According to the frequencies and intensity of the Raman peaks and the corresponding chemical bonds in sildenafil structure, some typical Raman shifts were characterized, in accordance with previous study [25]. The strong vibration appeared at the 1232 cm^{-1} was identified as the torsional vibration of C_{23}=C_{19}-C_{21}, whereas 1580 cm^{-1} belonged to the breathing vibration of ring 3, and the torsional vibration of C_{25}=C_{22}=C_{26} and the stretching vibration of C_{21}=N_8 contributed to the 1580 cm^{-1}. These two peaks with highest intensity were chosen as major typical peaks for identification of silfenafil in the real sample. Other characteristic peaks of Raman shifts of sildenafil were detected and analyzed in more details, as shown in Table 1.

3.2.3. Optimization of the concentration of sildenafil

Fig. 3(b) shows the SERS spectra of the spots of sildenafil on TLC plates after separation with sildenafil concentrations ranging from 0.02-0.2 mg/ml. It's shown that the spectral intensity of the 2 major peaks of sildenafil decreased when the concentration decreased. The peaks at 1230 and 1580 cm^{-1} had "shoulder" peakshape as observed in Fig. 3(c). The corresponding linear relationship of spectral intensity at concentrations of 0.02-0.2 mg/ml is presented in Fig. 3(d). The calibration curves reflect good linearity with two correlation coefficients (R^2) of 0.98 and 0.99 for 1230 cm^{-1} and 1580 cm^{-1}, respectively. The results indicated that the calibration curve in Fig. 3(d) could be used for semi-quantitation of sildenafil in the investigated concentration range.

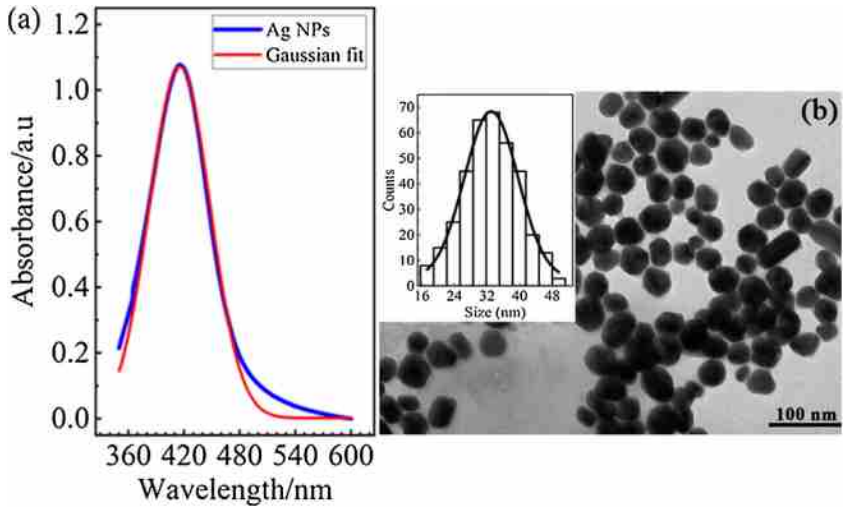


Fig. 2. (a) UV–Vis spectrum of Ag NPs (blue curve) fit with a Gaussian curve (red curve) with a maximum at 417 nm, (b) TEM image and inset is particle size distribution of AgNPs.

Table 1
Vibration frequencies obtained from sildenafil powder Raman spectral measurement and sildenafil solution SERS measurement (with silver colloid enhancement).

[a]Theoretical/cm^{-1}	Powder/cm^{-1}	SERS/cm^{-1}	Description
638	648	649	δ(Ring 2)+ν(C_{28}-O_5)
709	736	–	
–	749	–	
–	782	781	
801	816	816	δ(Ring3)+ν(C_{23}-O_4)+δ(N_8=C_{21}=N_{11})
913	926	921	δ(C_{31}-C_{29}-C_{27})
1040	1101	1088	δ(C_{30}-H_x)+δ(Ring 4)
1177	–	1145	δ(Ring 1)+δ(Ring 2)
–	1223	–	
1242	1238	1232	δ(C_{23}=C_{19}-C_{21})
1277	1270	1269	δ($C_{18,20,24,27,29,31}$-H_x)+ν(N_8-H_{48})
1316	–	1314	ν(C_{26}-C_{28})+ δ(Ring 1)
1394	1404	1399	ν(C_{32}-C_{33})+δ(C_{16}=C_{18}=C_{19})+δ(Ring 1)
1435	1441	–	ν(C_{26}=N_{33})+ δ($C_{27,30}$-H_x)
1457	1465	–	δ($C_{17,29,30,32}$-H_x)
1482	1485	1483	δ($C_{30,32}$-H_x)
1533	1529	1529	ν(C_{21}=N_{11})+ν(C_{26}=N_9)+δ(C_{22}=C_{25})
1567	1563	1560	δ(Ring 2)+δ(Ring 3)
1578	1581	1580	δ(Ring 3)+δ(C_{25}=C_{22}=C_{26})+ν(C_{21}=N_8)
1603	1601	1596	δ(Ring 3)+δ(N_8-C_{21})

Note: ν-stretch vibration; δ-bend vibration. [a] Reference of Theoretical Calculation (Zhao et al, 2017 [25]).

3.2.4. *Effects of silver colloids*

It is well known that the concentration of silver colloids is important for enhancing the Raman spectrum signals [11]. A part from the nanosize required, the concentratino of AgNPs should also be high enough to form a layer on substrate particle, to create "hot spot". But if the concentration increases above the level required to form a monolayer, AgNPs will accumulate on the substrate, leading to SERS signal reduction, i.e. poorer enhancement obtained. These results were mentioned in the previous reports [11,17].

In this study, different concentrations of AgNPs were investigated to determine the suitable dilution of colloids that exhibited best Raman signal enhancement. On the other hand, the influence of the amount of the silver colloids introduced to the TLC spot must also be taken into account. The experiments revealed that the Raman intensity of sildenafil continuously increased along with the increase of the volume of AgNPs colloid in the range of 0.5–3.0 μl. The intensities of two major peaks (1232 cm^{-1} and 1580 cm^{-1}) dependent on the volume of silver colloids are shown in Fig. 3(b). The SERS signals increased more vigorously with the AgNPs amount from 0.5 μl to 1.5 μl and then slightly increased with the AgNPs amount from 1.5 μl to 3.0 μl. Volumes higher than 3.0 μl were also investigated, but signals did not increased further.

This phenomenon may arise from the increase of AgNPs amount leading to accretion of AgNPs monolayer coverage, however, if the amount further increases, resulting in multilayer accumulation, less SERS signal enhancement will be observed [12]. On the other hand, the increase of AgNPs amount would lead to AgNPs aggregation, which enabled the enhancement of SERS intensity, but extreme aggregation would decrease the Raman activity of AgNPs. Although in Fig. 3(b), the volume of silver colloid with highest Raman intensity was 3.0 μl, but when tested with lower concentration of sildenafil, 3.0 μl offered weaker signal than 1.5 μl. Possible explanation is provided in the next section discussing coffee-ring effect (CRE). Thus, the volume of the AgNPs colloid of 1.5 μl was chosen to perform the following tests.

3.2.5. *CRE based optimization for SERS measurement*

During the course of optimization of TLC-SERS method, SERS measurement was conducted at different positions on the TLC spot. SERS signals of sildenafil was lowest at the center of the spot, and got higher when moving to the edge. This finding contradicts with the normal distribution of analyte on normal TLC spot, which usually possesses Gaussian-type distribution (with highest density of analyte at the center, and lower on the edge). The lower signal at

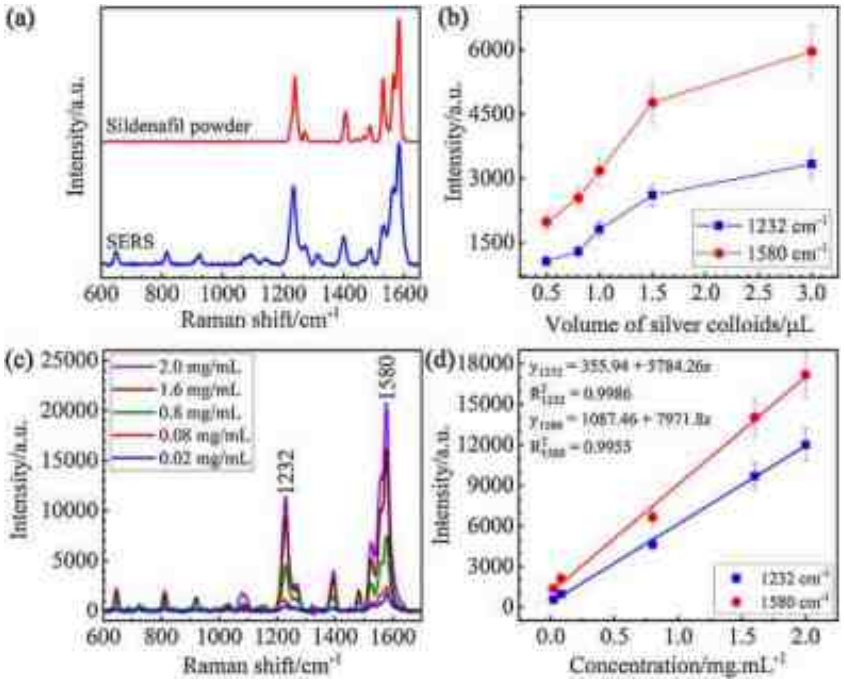


Fig. 3. (a) SERS spectrum of the 100 μg/ml sildenafil solution (blue lower line) and Raman spectra of sildenafil powder (red upper line); (b) SERS spectra of sildenafil solutions at different concentrations; (c) the relationship between Raman signal intensities (at 1232 and 1580 cm^{-1}) and sildenafil concentrations; (d) the relationship between intensities and volume of silver colloid introduced.

the center was possibly caused by the distribution of AgNPs – the crucial factor for "hot-spot" formation that enables SERS effect. The distribution of AgNPs in the present study was consitent with a phenomenon was described as "coffee-ring effect" (CRE) on silver colloid reported in a recent study by Q. Zhu et al on TLC-SERS application [16]. In CRE, because of the porous, dry plates, the solvent of silver colloid (water) flows fast and leads to fewer silver nanoparticles adsorbed in the center of the spot, and highest on the edge of the spot. The CRE occurs when a droplet of solutions containing nonvolatile solutes dries on a solid surface, it leaves a dense and ring-like deposition of the solutes along the perimeter [26], it is similar with the shape of a dried coffee drop. During the drying process, the layer of the dried coffee droplet will stick tightly to the substrate, and capillary flows outward from the center of the droplet will move suspended particles (AgNPs) to the edge as an evaporation process. After evaporation, the suspended AgNPs will concentrate with high density along the edge of the droplet. CRE occurred even more easily on TLC plate with the narrow cappilary space between silica gel particles. The coffee-ring of silver colloid in this study, which was easily observed in daylight, has confirmed the CRE on AgNPs described in literature [16].

However, there was another observation that had never been described elsewhere before. That was the redistribution of sildenafil molecules on the TLC plate after introduction of silver colloid droplet. Densitograms of sildenafil spots were recorded by taking pictures under UV light 254 nm on Camag TLC Visualizer 2 (Camag, Switzerland), with the same TLC spot of sildenafil, before and after silver colloid introduction (Fig. 4(a) and 4(b)). The densitograms of sildenafil TLC spot before adding silver colloid (Fig. 4(a)) showed Gaussian distribution with higher density of sildenafil in the center as expected. And the same TLC spot after adding silver colloid droplet (Fig. 4(b)) showed CRE distribution with lower density of sildenafil in the center. This meant the CRE occurred on TLC plate affected both AgNPs and sildenafil, pushed the sildenafil molecules out of the center to form a circle with the interplay between silver and sildenafil molecules (temporarily called "double coffee-ring effect"). In previous study on CRE-SERS [16], the CRE was observed only for the AgNPs, not for the analyte – clozapine, probably because clozapine is only slightly soluble in water, hence clozapine molecules are not influenced by the capillary flow of water (silver colloid) as sildenafil (with water solubility 2000 times higher).

To confirm the explanation for this "double CRE" phenomenon and to optimize the CRE-SERS method, the SERS performance was investigated at many different positions along the radial of the coffee ring (arrow points from 1 to 9 in Fig. 4(b)). The SERS spectra of the sample with different positions (1–9) are shown in Fig. 4(c). The relationship between the Raman signal intensity of two peaks at 1232 and 1580 cm^{-1} and measuring positions of sildenafil is shown in Fig. 4(d). The SERS intensity increased gradually with the positions from 1 to 5 but then decreased for positions from 6 to 9. At position 5 (right on the edge of the spot, Fig. 4(b)), the highest SERS enhancement was obtained. The AgNPs were densed at position 5, which increased the hot-spots, plus sildenafil was also densed at this position, reflected in the higher spectral intensity.

The redistribution of sildenafil also contributed to the explanation why higher volume of silver colloid (3.0 μl) did not offer better enhancement for low concentration of sildenafil, but only for high concentration. When the concentration of sildenafil in the sample was low (to some limit), higher volume of colloid would lead to bigger coffee-ring, i.e. sildenafil was redistributed on a wider diameter, making the density of analyte lower at one point, and the SERS signal, therefore, would decrease. A reasonable volume that kept the analyte remain within the original sample plot (1.5 μl) would enable highest SERS effect. This also helped to avoid the fluorescent influence of lead in the pencil, if the silver colloid solution runs through it, and drags lead onto the coffee-ring edge (pencil was used to mark the TLC spot before adding silver colloid).

This double CRE phenomenon led to a different experimental set-up for TLC-CRE-SERS in this study, compared to previous study [18]. Since clozapine distribution was not much affected by CRE, the sample spot remained the same before and after colloid introduction. Therefore, Raman spectrum was recorded on the edge of silver colloid spot, but at the center of the TLC spot of analyte, i.e. the TLC

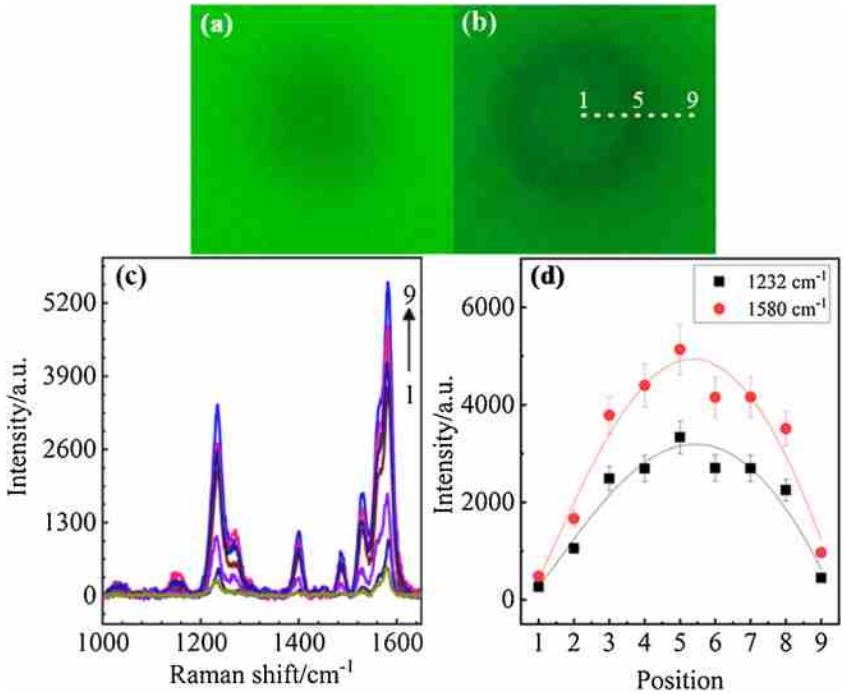


Fig. 4. (a) TLC spot before introducing sillver colloid under UV 254 nm, (b) the same spot after introducing silver colloid, creating "coffee ring" under UV 245 nm, with positions of 1–9 represent different position along the "coffee ring" diameter; (c) The SERS spectras of sample with different positions 1–9; (d) Plots of intensities versus the different positions for sildenafil at 1232 and 1580 cm^{-1}.

spot and the colloid spot did not coincide, or it is necessary to have UV 254 nm light for observation during silver colloid introduction and Raman measurement. In this study, thanks to the redistribution of sildenafil, it was not necessary to adjust the silver colloid droplet out of the sample plot to obtain high density of both analyte and AgNPs for SERS "hot spots". Therefore, the practical protocol was as follows: 1) TLC spot was observed under UV light and marked by pencil; 2) the AgNPs colloid droplet was introduced right to the center of the spot so that it stayed right within the pencil trace; 3) Raman measurement was done at the edge of the nanosilver spot.

3.3. Validation of TLC-SERS method

3.3.1. Selectivity

Three set of samples (for 3 types of matrix: capsule, granule, and herbal extract) were investigated with the optimized experimental conditions. Each set of samples (designed for one matrix) was separated on TLC plate with 3 sample spots: 1 sildenafil reference solution, 1 placebo matrix extract and 1 sildenafil spiked sample extract. As an example for capsule, Fig. 1(b) and 1(c) shows the TLC image and the corresponding SERS spectra of 3 samples in the set. The results showed that the sildenafil spot in the chromatogram of the reference (No.7) had the same R_f value and spot color as the spot in the chromatogram of spiked sample (No.8). Besides, no trace or spot at R_f = 0.21 was found in the chromatogram of the (Fig. 1(b)). Raman spectra were recorded based on the above-mentioned CRE optimization and the results are shown in Fig. 1(c). Typical Raman shifts of sildenafil were observed for spiked sample, whereas no peaks were detected for placebo samples.

A small amount of silver colloid on the spot with $R_f \approx 0.21$, receiving the SERS spectra, which showed that the sildenafil had perform TLC-SRE-SERS analysis as developed. The characteristic peaks of sildenafil at 10 μg/ml (equivalent to 2 ng/spot) were repetitive characteristic signals around the major SERS shift of the standard in the sample. The placebo was not significantly affected by the positions of the characteristic vertices of the sildenafil. The peak of 1398 cm^{-1} on capsule matrix significantly altered the peak amplitude (spot No.8), so it was not a characteristic peak for activity as seen in Fig. 1(c). The graph in Figs. 1(c) presented clearly with characteristic peaks at 1232.05 cm^{-1}, 1268.3 cm^{-1}, 13,953 cm^{-1}, 1486.1 cm^{-1}, 1529.8 cm^{-1}, 15,816 cm^{-1} for spot 2; at 1232.3 cm^{-1}, 1265.7 cm^{-1}, 13,969 cm^{-1}, 1486.5 cm^{-1}, 1527 cm^{-1}, 15,812 cm^{-1} for spot 5 and at 1231.6 cm^{-1}, 1266.3 cm^{-1}, 1485.5 cm^{-1}, 1526.1 cm^{-1}, 15,811 cm^{-1} for spot 8. These results are obtained from fitting of the SERS spectra of the samples using the multi-Lorentzian function. Thus, the characteristic peaks of the herbal products mixed with sildenafil are approximated value at 1232 ± 1, 1268 ± 2, 1485 ± 1, 1529 ± 2, 1580 ± 1 cm^{-1}, respectively.

The characteristic vertices of sildenafil are 1232 cm^{-1} ($\delta(C_{23}=C_{19}-C_{21})$, 1268 cm^{-1} ($\delta(C_{18,20,24,27,29,31}-H_x)+\nu(N_8-H_{48})$, 1527 cm^{-1} ($\nu(C_{21}=N_{11})+\nu(C_{26}=N_9)+\delta(C_{22}=C_{25})$), 1580 cm^{-1} (δ(Ring 3)$+\delta(C_{25}=C_{22}=C_{26})+\nu(C_{21}=N_8)$). Peaks of 1580, 1485 cm^{-1} typical of sildenafil (based on the TLC-SERS method) was repeated against as the typical sildenafil reference and the pharmaceuticals drugs; the peaks of 1232, 1268, 1398, 1529 cm^{-1} had a minor bias compared to reference [26], because they used a different excitation wavelength (785 nm).

3.3.2. Limit of detection (LOD)

The reference solutions of sildenafil citrate were prepared at different concentrations 300; 200; 100; 50; 20; 10 and 5 μg/ml. An amount of 1 ml of each reference solution was added to the *placebo samples*, followed by sample treatment as described in *sample preparation*. The obtained extract was analyzed using the developed TLC-CRE-SERS method. With the extract from 10 μg/ml reference solution, the intensity signals obtained at 1232 and 1580 cm^{-1} was higher than 3 times the intensity of the noise obtained from placebo samples, whereas at 5 μg/ml the intensity was not significantly higher than noise. Therefore, LOD of sildenafil was determined at 10 μg/ml of reference solution added, which was equivalent to 2 ng/spot.

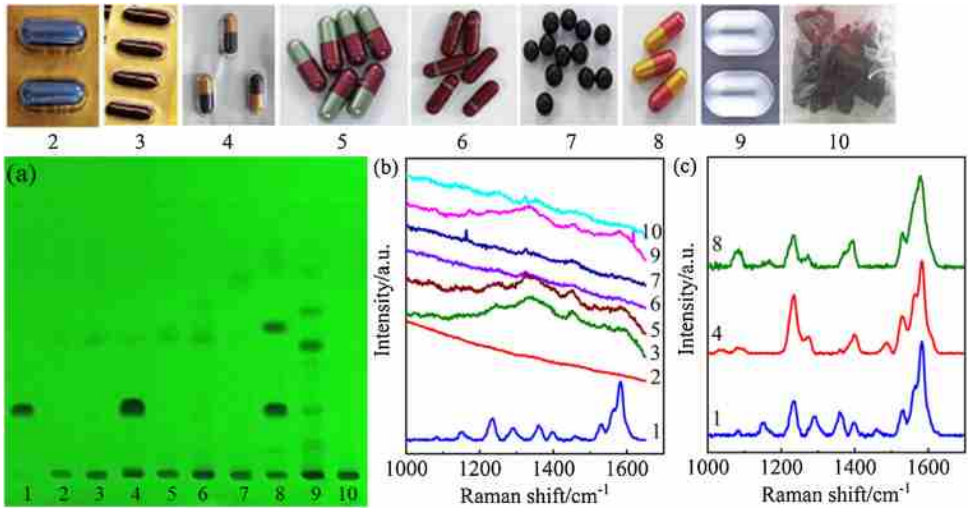


Fig. 5. (a) Results from TLC analysis of nine real samples developed with methanol, 1 (references Sildenafil), 2–10 (samples), and the SERS spectra of nine spots; (b) Sildenafil references (spot 1), samples (spot 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10); and (c) Sildenafil reference (spot 1), samples (spot 4, 8).

3.4. Analysis of real samples

3.4.1. TLC-SERS analysis

To evaluate the feasibility of this method, TLC–SERS was employed in the detection of nine real samples including herbal extract, granule, and capsules. Results from TLC analysis of ten spots including references Sildenafil (Plot 1) and real samples (plot 2 to plot 10) were presented in Fig. 5(a). The results indicated that three real samples were adulterated with sildenafil (Plots 4, 8 and 9 contained spots with $R_f = 0.21$, equivalent to that of plot 1 – reference sildenafil, in Fig. 5(a)). Six other real samples (Plots 2, 3, 5, 6, 7 and 10) were found negative to sildenafil: no spots equivalent to sildenafil in Fig. 5(a), and SERS spectra of the marked position with $R_f = 0.21$ showed no typical peaks of sildenafil SERS spectrum (Fig. 5(b)). Plot 9 contained a spot with $R_f = 0.21$, but the SERS spectrum also showed no typical peaks of sildenafil, which meant this sample could also be a negative sample. The two remaining positive samples warned by TLC (plot 4 and 8) both exhibited SERS spectrum of sildenafil. Fig. 5(c) presented SERS spectra of the spots at $R_f = 2.1$ on plot 4 (red line) and plot 8 (olive line), which were similar to reference spot of sildenafil (blue line). The graph presented clearly with characteristics peaks at 1232.9, 1397.8, 1530.6 and 1581.4 cm^{-1} for spot 4, and 1231.2, 1397.1, 1530.5 and 1579.6 cm-1 for spot 8. Consequently, it can be confirmed that there was adulteration of sildenafil in the real samples.

3.4.2. LC–MS/MS analysis

In order to further confirm the TLC-SERS results, all the real samples were analyzed by LC–MS/MS. The results obtained by LC–MS/MS totally in agreement with TLC-SERS results. Sildenafil was also found adulterated in sample 4 and 8, and not in sample 9. Using LC–MS/MS, mother ion was determined at $m/z = 475.2$ and two product ions at $m/z = 100.3$ and 283.0, complying with the demand of IP = 4. The rates of $76.3 \pm 20\%$; $23.7\% \pm 20\%$ for ions $m/z = 100.3$ and 283.0 were obtained respectively, which confirmed the presence of sildenafil.

The application results with adulteration detection proved the feasibility of the developed TLC-SERS method in practical drug and dietary supplement quality control. Analyses were conducted on a benchtop μ-Raman spectrometer, which means for screening purposes, only the TLC separation can be done on-site, and the suspected samples (positive sildenafil detected by TLC) will be sent to the laboratory to conduct CRE-SERS. During the course of the study, we also attempted to use also handheld (NanoRAM, Horiba) and portable (AvaRaman, Avantes) Raman spectrometers available locally in several provinces in Vietnam, but all the tested instruments did not offer sufficient sensitivity for this SERS method. To obtain a fully rapid on-site TLC-SERS method (as in [18]), further investigation should to be done in the future, when we have access to a portable Raman spectrometer with sufficient sensitivity.

4. Conclusion

In summary, the developed TLC-SERS method is simple, selective and sensitive method to detect illegally adultered sildenafil in herbal products in 3 dosage forms including capsule, granule and herbal extract. Especially, the application of the TLC-SERS method successfully detected the adulteration with sildenafil in 2 samples out of 9 traditional medicinal preparations and herbal dietary supplements which are circulating in the local markets. Although the number of samples included in the study was small, the ratio of adulteration was alarming. The results confirmed the potential risks concerning counterfeit health products, and manifested the necessity of developing useful adulteration screening tools. In addition, TLC-SERS method also demonstrated reliable performance as confirmed by LC–MS/MS analyses.

On the other hand, the investigations on several SERS factors showed that CRE was an important factor that affected signal enhancement, sensitivity, and repetition of the TLC-SERS method. The novel observations with double CRE in this study facilitated a convenient set-up where silver colloid droplet enables not only the creation of “hot-spot” region of AgNPs, but also the redistribution of sildenafil to the same region (on the edge of the coffee-ring). It can be helpful for future TLC-CRE-SERS studies on other analytes, considering its polarity and solubility in the solvent of silver colloid solution.

References

[1] V. Gilard, S. Balayssac, A. Tinaugus, N. Martins, R. Martino, M. Malet-Martino, Detection, identification and quantification by 1H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 476–493.
[2] M. Pellegrini, M.C. Rotolo, F.P. Busardo, R. Pacifici, S. Pichini, Non-allowed pharmacologically active substances in physical and sexual performance enhancing products, Curr. Neuropharmacol. 15 (5) (2017) 724–730.
[3] M.M. Baker, T.S. Belal, M.S. Mahrous, H.M. Ahmed, H.G. Daabees, High-performance liquid chromatography with diode array detection method for the simultaneous determination of seven selected phosphodiesterase-5

inhibitors and serotonin reuptake inhibitors used as male sexual enhancers, J. Sep. Sci. 39 (9) (2016) 1656–1665.
[4] I. Papoutsis, P. Nikolaou, S. Athanaselis, G. Alevizopoulos, C. Pistos, C. Paraskevopoulou, C. Spiliopoulou, Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of sildenafil and desmethyl-sildenafil in whole blood, J. Sep. Sci. 34 (21) (2011) 3037–3042.
[5] S. Singh, B. Prasad, A.A. Savaliya, V.M. Gohil, A. Kaur, Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs, TrAC - Trends Anal. Chem. 28 (1) (2009) 13–28.
[6] M.V. Cañamares, D.A. Reagan, J.R. Lombardi, M. Leona, TLC-SERS of mauve, the first synthetic dye, J. Raman Spectrosc. 45 (11-12) (2014) 1147–1152.
[7] G. Rouser, A.N. Siakotos, S. Fleischer, Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots, Lipids 1 (1) (1966) 85–86.
[8] X. Wu, X. Chen, F. Gao, W. Ma, L. Xu, H. Kuang, A. Li, C. Xu, SERS encoded nanoparticle heterodimers for the ultrasensitive detection of folic acid, Biosens. Bioelectron. 75 (2016) 55–58.
[9] R. Dasari, F.P. Zamborini, Surface enhanced raman spectroscopy at electrochemically fabricated silver nanowire junctions, Anal. Chem. 88 (1) (2016) 675–681.
[10] A. Lanzarotta, J.B. Crowe, M. Witkowski, B.M. Gamble, A multidisciplinary approach for the analysis of an adulterated dietary supplement where the active pharmaceutical ingredient was embedded in the capsule shell, J. Pharm. Biomed. Anal. 67-68 (2012) 22–27.
[11] F. Pozzi, N. Shibayama, M. Leona, J.R. Lombardi, TLC-SERS study of Syrian rue (*Peganum harmala*) and its main alkaloid constituents, J. Raman Spectrosc. 44 (1) (2013) 102–107.
[12] D. Li, L. Qu, W. Zhai, J. Xue, J.S. Fossey, Y. Long, Facile on-site detection of substituted aromatic pollutants in water using thin layer chromatography combined with surface-enhanced Raman spectroscopy, Environ. Sci. Technol. 45 (9) (2011) 4046–4052.
[13] Z. Xie, Y. Wang, Y. Chen, X. Xu, Z. Jin, Y. Ding, N. Yang, F. Wu, Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish, Food Chem. 230 (2017) 547–552.
[14] R. Huang, S. Han, X.S. Li, Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography, Anal. Bioanal. Chem. 405 (21) (2013) 6815–6822.
[15] A. Lucotti, M. Tommasini, M. Casella, A. Moreganti, F. Gramatica, G. Zerbi, TLC-surface enhanced Raman scattering of apomorphine in human plasma, Vibrat. Spectrosc. 62 (2012) 286–291.
[16] Q. Zhu, X. Yu, Z. Wu, F. Lu, Y. Yuan, Antipsychotic drug poisoning monitoring of clozapine in urine by using coffee ring effect based surface-enhanced Raman spectroscopy, Anal. Chim. Acta 1014 (2018) 64–70.
[17] Q. Zhu, Y. Cao, Y. Cao, Y. Chai, F. Lu, Rapid on-site TLC-SERS detection of four antidiabetes drugs used as adulterants in botanical dietary supplements, Anal. Bioanal. Chem. 406 (7) (2014) 1877–1884.
[18] X. Hu, G. Fang, A. Han, Y. Fu, R. Tong, S. Wang, 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, J. Sep. Sci. 40 (11) (2017) 2316–2521.
[19] F. Fang, Y. Qi, F. Lu, L. Yang, 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 (2016) 351–357.
[20] D. Lv, Y. Cao, Z. Lou, S. Li, X. Chen, Y. Chai, F. Lu, Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS, Anal. Bioanal. Chem. 407 (5) (2015) 1313–1325.
[21] P.C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols, J. Phys. Chem. 86 (17) (1982) 3391–3395.
[22] W. Meng, F. Hu, X. Jiang, L. Lu, Preparation of silver colloids with improved uniformity and stable surface-enhanced Raman scattering, Nanoscale Res. Lett. 10 (2015) 34.
[23] AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC (Association of Analytical Communities International), USA, 2013.
[24] E.S. Lee, J.H. Lee, K.M. Han, J.W. Kim, I.S. Hwang, S. Cho, S.Y. Han, J. Kim, Simultaneous determination of 38 phosphodiestrase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 83 (2013) 171–178.
[25] H. Zhao, W. Hasi, L. Bao, S. Han, X. Sha, J. Sun, X. Lou, D. Lin, Z. Lv, Rapid detection of sildenafil drugs in liquid nutraceuticals based on surface-enhanced raman spectroscopy technology, Chin. J. Chem. 35 (10) (2017) 1522–1528.
[26] P.J. Yunker, T. Still, M.A. Lohr, A.G. Yodh, Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions, Nature 476 (7360) (2011) 308–311.

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

VĂN BẢN ĐỒNG Ý CHO SỬ DỤNG BÀI BÁO/CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA ĐỒNG TÁC GIẢ

Chúng tôi là:

1. Phạm Thị Thanh Hà, công tác tại Bộ môn Hóa Phân tích-Độc chất, trường ĐH Dược Hà Nội.
2. Nguyễn Thị Kiều Anh, công tác tại Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, trường ĐH Dược Hà Nội.
3. Lê Văn Vũ, công tác tại Khoa Vật Lý, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
4. Nguyễn Thị Thanh Huyền, công tác tại trường Cao đẳng Dược Trung Ương Hải Dương.
5. Lê Anh Thi, công tác tại Viện Nghiên cứu và phát triển, trường Đại học Duy Tân.

Là đồng tác giả với NCS Đào Thị Cẩm Minh trong 1 bài báo/công trình nghiên cứu sau đây:

1. Detection 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.

Chúng tôi hoàn toàn đồng ý cho NCS Đào Thị Cẩm Minh được sử dụng nội dung các bài báo/công trình nghiên cứu trên vào mục đích nghiên cứu, viết và báo cáo luận án tiến sĩ của NCS ở các cấp.

Hà Nội, ngày 14 tháng 06 năm 2019

Đồng tác giả

Phạm Thị Thanh Hà	Nguyễn Thị Kiều Anh	Lê Văn Vũ	Nguyễn Thị Thanh Huyền	Lê Anh Thi