

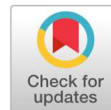


ISSN : 1859-1779

Nghiên cứu Dược học

Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh - Dược học;28(3):43-52

<https://doi.org/10.32895/hcjm.p.2025.03.05>



Xây dựng quy trình xác định 14 dược chất nguy tạo trong chế phẩm dạng rắn từ dược liệu

Lương Vĩ Khang¹, Huỳnh Tấn Phát¹, Nguyễn Thị Thùy Linh², Võ Thanh Thúy³, Nguyễn Thu Ánh³,
Ngô Thị Minh Tâm³, Phạm Văn Sơn³, Phan Văn Hồ Nam^{1*}

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Sở Y Tế Thành Phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trung Tâm Kiểm Nghiệm Thành Phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Hiện nay, tình trạng trộn trái phép tân dược vào các chế phẩm từ dược liệu diễn biến phức tạp. HPLC-UV/Vis khá hiệu quả về chi phí mà phù hợp với điều kiện của Việt Nam được lựa chọn nghiên cứu nhằm phát hiện tối đa nguy cơ này.

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng betamethason, dexamethason base, methylprednisolon, triamcinolon, prednison, aceclofenac, dexamethason acetat, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, meloxicam, acid mefenamic, piroxicam và paracetamol nguy tạo trong các chế phẩm dạng rắn từ dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị cơ xương khớp bằng HPLC-UV/Vis theo hướng dẫn của AOAC (2023).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Điều kiện sắc ký: pha tĩnh - XBridgeTM C18 (250×4,6 mm; 5 µm); pha động - ACN và triethylamin pH 3,5 (gradient); phát hiện ở 224 nm và 280 nm; mẫu thử chiết bằng siêu âm 10 phút với 2 × 20 ml ethyl acetat, loại tạp bằng SPE với 3 ml MeOH.

Kết quả: Quy trình phân tích có độ chính xác phù hợp (RSD%, n=6 < 5 %) và độ thu hồi (89,78 - 118,69%), LOQ của tất cả các hoạt chất khoảng 25 ppm. 8/50 chế phẩm có nguy tạo paracetamol, diclofenac, aceclofenac, dexamethason base và dexamethason acetat.

Kết luận: Quy trình phân tích 14 dược chất đã được thẩm định và ứng dụng để kiểm tra 50 chế phẩm đang lưu hành trên thị trường.

Từ khóa: nguy tạo; dược liệu; HPLC

Abstract

DEVELOPMENT OF THE QUANTITATIVE PROCEDURE OF 14 ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS ADULTERATED IN HERBAL SOLID PREPARATIONS

Luong Vi Khang, Huynh Tan Phat, Nguyen Thi Thuy Linh, Vo Thanh Thuy, Nguyen Thu Anh,
Ngo Thi Minh Tam, Pham Van Son, Phan Van Ho Nam

Ngày nhận bài: 16-01-2025 / Ngày chấp nhận đăng bài: 17-03-2025 / Ngày đăng bài: 28-03-2025

*Tác giả liên hệ: Phan Văn Hồ Nam. Bộ môn Phân tích - Kiểm nghiệm - Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. E-mail: phanvanhonam@ump.edu.vn

© 2025 Bản quyền thuộc về Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.

Abstract

Introduction: Currently, the illegal adulteration of pharmaceutical drugs in herbal products has become increasingly complex, especially in medicines treating bone and joint pain. This study aimed to develop an HPLC-UV/Vis procedure tailored to Vietnam's conditions to cost-effectively detect such adulteration.

Objective: To develop and validate a quantitative analytical procedure for detecting betamethasone, dexamethasone base, methylprednisolone, triamcinolone, prednisone, aceclofenac, dexamethasone acetate, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, meloxicam, mefenamic acid, piroxicam and paracetamol adulterated in herbal solid preparations used for supporting bone and joint treatment was developed and validated using HPLC-UV/Vis according to AOAC (2023) guidelines.

Methods: Chromatographic conditions: stationary phase - XBridge™ C18 (250×4.6 mm; 5 μm); mobile phase - ACN and triethylamin pH 3.5 (gradient); detected at 224 nm and 280 nm; Samples were extracted using ultrasound for 10 minutes with 2 × 20 mL of ethyl acetate, followed by impurity removal using SPE with 3 mL of methanol.

Results: The analytical procedure had suitable precision (RSD%, n=6 < 5 %) and recovery (89.78 – 118.69%), LOQ of all active ingredients were at 25 ppm. Among the 50 tested herbal solid preparations, 8 samples were found to contain adulterants, including paracetamol, diclofenac, aceclofenac, dexamethasone base, and dexamethasone acetate.

Conclusion: The validated analytical procedure effectively detected 14 pharmaceutical adulterants and was successfully applied to analyze 50 commercially available herbal products.

Keywords: adulteration; herbal; HPLC

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam, người dân sử dụng thường xuyên các thuốc có nguồn gốc từ thảo dược trong chăm sóc sức khỏe nhưng vì tác dụng thường không nhanh chóng và hiệu lực không rõ ràng như thuốc có dược chất tổng hợp, nên đã xuất hiện tình trạng làm giả và pha trộn dược chất tổng hợp trái phép vào các chế phẩm trên.

Hiện nay, việc phát hiện các dược chất tổng hợp trộn trái phép vào các sản phẩm tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào phương pháp TLC [1], LC – MS [2], HPTLC [3], LC - MS/MS [4] cho kết quả chính xác trên nhóm giảm đau kháng viêm. Tuy nhiên, phương pháp HPLC-UV-Vis khá phổ biến tại Việt Nam nhưng vẫn chưa có công bố nào về việc định lượng 14 dược chất thuộc nhóm giảm đau kháng viêm đang có nguy cơ cao nguy tạo cao trong các sản phẩm dạng rắn từ dược liệu có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị cơ xương khớp.

Chính vì vậy, một quy trình phân tích đồng thời nhiều hoạt chất nhất có thể, nhằm tiết giảm chi phí và thời gian phân tích, đảm bảo được độ tin cậy nhưng vẫn tương đối phù hợp với điều kiện thực tiễn cần được nghiên cứu để phát hiện các dược chất này nhằm góp phần quản lý chất lượng các chế phẩm từ dược liệu đang lưu hành trên thị trường, đồng thời

đáp ứng yêu cầu xây dựng phác đồ điều trị các trường hợp ngộ độc mãn tính các dược chất nguy tạo này trong lâm sàng.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

14 chất chuẩn có số kiểm soát và hàm lượng tương ứng bao gồm betamethason (BET) - QT107 080920 - 98,5 %, dexamethason base (DEX B) - QT286 020220 - 99,8 %, methylprednisolon (MPR) - QT159 080222 - 99,0 % , prednison (PNS) - QT091 110821 - 98,8%, aceclofenac (ACE) - QT220 030421 - 99,8 %, dexamethason acetat (DEX A) - QT013 111120 - 99,6 %, diclofenac (DIC) - QT005 140620 - 99,7 %, ibuprofen (IBU) - QT026 130520 - 99,5 %, ketoprofen (KET) - QT048 040916 - 99,5 %, meloxicam (MEL) - QT089 120620 - 99,5 %, acid mefenamic (MEF) - QT055 1022 - 99,68 %, piroxicam (PIR) - QT017 0422 - 99,7%, paracetamol (PAR) - QT0090322 - 99,5 % được cung cấp bởi Viện Kiểm Nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, và triamcinolon (TAC) - K1M290 - 99,6% được cung cấp bởi USP.

Mẫu placebo: hỗn hợp 7 thuốc từ dược liệu dạng rắn điều trị bệnh xương khớp không có chất phân tích đã được xác nhận bằng phân tích LC/MS-MS bao gồm: Hòa Long phong thấp hoàn, Didicera, độc hoạt Tang ký sinh, xương khớp Nhất Nhất, Tê thấp phong hoàn, thấp khớp ND, xương khớp Đại Sinh Hòa.

Mẫu giả lập: mẫu placebo thêm dung dịch chuẩn có nồng độ xác định.

2.1.1. Hóa chất - dung môi

Aceton (Macron), ethylacetat (Fisher), ethanol (Fisher), dimethyl sulfoxide (Fisher), *n*-hexan (Fisher), triethylamin (Fisher), orthophosphoric acid (Fisher) đạt tiêu chuẩn phân tích; silicagel 60 (0,040 - 0,063 mm) (Merck), SPE C₁₈ Copure 500 mg/6 mL (Biocomma); acetonitril (Fisher), methanol (Fisher), nước cất siêu lọc (TTKN thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm TP.HCM) đạt tiêu chuẩn sắc ký lỏng.

2.1.2. Trang thiết bị

Bể siêu âm J.P. SELECTA, máy đo pH Metler Toledo Model S220-K, cân phân tích độ nhạy 0,001 mg hiệu AND HR-120, cân phân tích độ nhạy 0,01 mg AND FY-300 (Nhật), máy ly tâm HETTICH, EBA 20, hệ thống HPLC-DAD Thermo, ultimate 3000.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng công thức mẫu giả lập

Tiến hành thống kê thành phần và tần suất xuất hiện các vị thuốc có trong chế phẩm từ dược liệu dạng rắn có tác dụng giảm đau, kháng viêm theo dữ liệu từ trang web của Cục Quản lý Dược [5] và trang web Hệ thống đăng ký dịch vụ công ATTP quốc gia của Cục an toàn vệ sinh thực phẩm [6], (dựa trên từ khóa cơ, xương, khớp, cốt, thống, thấp) nhằm thiết kế nên mẫu giả lập. Lựa chọn các vị thuốc sao cho: tần suất xuất hiện trên 25 % tổng số chế phẩm có tác dụng hỗ trợ điều trị cơ xương khớp, là thành phần của bài thuốc phổ biến nhất trên thị trường, có thể thu thập dễ dàng và truy nguyên được nguồn gốc hoặc định danh được chính xác.

2.2.2. Xây dựng quy trình phân tích

Khảo sát quy trình chiết xuất trên mẫu giả lập bằng cách khảo sát lần lượt từng yếu tố: dung môi chiết xuất Y, thời gian chiết xuất T phút, phương pháp chiết xuất P, số lần chiết

xuất n, phương pháp loại tạp O, nhằm loại được tạp tối đa và cho tín hiệu tương ứng 14 dược chất cao nhất.

Quy trình chiết xuất ban đầu với: Y là EtOAc; T = 10 phút; P là phương pháp siêu âm; n= 2; O là SPE. Tiến hành khảo sát các điều kiện chiết xuất bằng cách cố định điều kiện được lựa chọn phù hợp và thay đổi điều kiện tiếp theo, trong đó Y bao gồm EtOAc, ACN, EtOH, MeOH, P bao gồm phương pháp siêu âm, đun hồi lưu ở 60-70 °C và phương pháp khuấy từ, T là 10, 15, 20 phút, n là 1, 2, 3 lần và O là SPE hoặc *n*-hexan.

Đánh giá hiệu suất chiết trên mẫu chuẩn đã được xử lý mẫu tương tự như dung dịch mẫu giả lập. Hiệu suất chiết H% có yêu cầu > 70% được tính như sau: $H\% = SC_0 / SC_1 \times 100$. Trong đó: SC₀ là diện tích pic của chất phân tích trong 1 ml C₀ đã được xử lý mẫu như mẫu giả lập; SC₁: Diện tích pic của chất phân tích tương ứng trong mẫu C₁ không qua xử lý.

2.2.3. Thẩm định và ứng dụng quy trình phân tích

Quy trình phân tích

Dung môi pha mẫu (DM)

Methanol - DMSO (99 : 1).

Dung dịch chuẩn gốc (M)

Cân lần lượt 25 mg từng chất chuẩn, cho vào từng bình định mức 10 ml tương ứng, điền đầy đến vạch bằng DM và siêu âm cho đến khi hoà tan hết.

Dung dịch hỗn hợp chuẩn gốc (C₀)

Lấy 0,5 ml của từng dung dịch chuẩn gốc (M) cho vào bình định mức 10 ml, sau đó điền đầy đến vạch bằng DM.

Dung dịch chuẩn

Lấy 0,5 mL C₀ cho vào ống nghiệm, sau đó cô đến cạn. Chiết với 8 ml EtOAc trong 15 phút bằng siêu âm. Tiến hành chiết lần 2, gộp dịch lọc sau đó cô cách thủy đến cạn ở 80 °C. Thêm khoảng 0,5 g silicagel (0,040 - 0,063 mm) vào, trộn đều với cán rồi nhồi vào cột SPE C₁₈. Tiến hành rửa giải bằng 5 ml DM vào bình định mức 5 ml, điền đầy vạch bằng MeOH.

Bột mẫu thử

Lấy 20 đơn vị liều dùng của mẫu thử, tiến hành xác định khối lượng trung bình của một liều dùng. Đối với viên nén, hoàn cứng, nghiền thành bột mịn. Đối với viên nang, tách vỏ nang và bột thuốc trong nang, phần vỏ nang sẽ được làm rã trong nước, cô tới cạn và được xem

như là một mẫu thử riêng, phần bột thuốc được nghiền mịn và trộn đều được xem như là một mẫu thử riêng.

Dung dịch thử

Lấy một lượng bột mẫu thử tương ứng với ¼ liều dùng của mẫu thử, tiến hành xử lý như dung dịch chuẩn.

Dung dịch thử thêm chuẩn (mẫu spike/mẫu giả lập)

Lấy 0,5 mL dung dịch hỗn hợp chuẩn gốc (C₀) cho vào ống nghiệm, sau đó cô đến cạn. Lấy một lượng bột mẫu thử tương ứng với ¼ liều dùng của mẫu thử cho vào cùng ống nghiệm, tiến hành xử lý như dung dịch chuẩn.

Nếu phát hiện mẫu chứa được chất thuộc nhóm liều dùng cao (ACE, MEF, DIC, IBU, KET, PIR, PAR) thì pha loãng thêm 50 lần dung dịch thử và dung dịch thử thêm chuẩn.

Điều kiện sắc ký

Pha tĩnh là cột sắc ký ThermoScientific BDS Hypersil™ (250 × 4,6 mm; 5 μm), pha động là chương trình dung môi với dung môi A là acetonitril (0-6 phút: 7,0%; 12 phút: 18,0%; 27-45 phút: 23,5%; 55 phút: 40,0%; 77 phút: 45,0%; 85 phút: 50,0%; 85-95 phút: 90,0%) và B là dung dịch triethylamin 10 mM điều chỉnh đến pH 3,5 bằng acid phosphoric 1%; tốc độ dòng là 1,2 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μl, bước sóng phát hiện là 224 nm và 280 nm.

Hàm lượng X (mg) của được chất nguy tạo trong 1 liều dùng mẫu thử được tính như sau:

$$X \text{ (mg)} = \frac{S_{\text{thử}}}{S_{\text{spike}} - S_{\text{thử}}} \times C_{\text{chuẩn}} \times H\% \times 4 \times \text{DPL}$$

S_{thử}: Diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch thử;
S_{spike}: Diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch thử thêm chuẩn;
C_{chuẩn}: Nồng độ chất phân tích trong dung dịch chuẩn (mg/ml);
H%: Hàm lượng chất chuẩn tính trên chế phẩm nguyên trạng;
DPL: Độ pha loãng của dung dịch thử.

2.2.4. Thẩm định quy trình phân tích

Quy trình định lượng được tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của AOAC (2023) [7] với các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng.

2.2.5. Ứng dụng quy trình phân tích

Tiến hành thu thập 50 mẫu và phân tích theo quy trình định lượng đã thẩm định.

3. KẾT QUẢ

3.1. Xây dựng công thức mẫu giả lập

Có 80 được liệu trong 93 thuốc từ được liệu đã được thống kê, trong đó có 13 được liệu xuất hiện với tần suất lớn hơn 25 %. Có 151 được liệu trong 110 thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thể tra cứu được thành phần trong tổng số 357 sản phẩm có tên liên quan đến tác dụng hỗ trợ cơ xương khớp đang lưu hành tại Việt Nam, trong đó có 10 được liệu xuất hiện với tần suất lớn hơn 25 %. Do vậy mẫu placebo được pha chế từ hỗn hợp 7 loại thuốc được liệu trên thị trường điều trị bệnh xương khớp bao gồm: Hòa Long phong thấp hoàn, Didicera, Độc hoạt Tang ký sinh, Xương khớp Nhất Nhất, Tê thấp phong hoàn, Thấp khớp ND, Xương khớp Đại Sinh Hoàn có thành phần phù hợp với kết quả khảo sát. Mẫu placebo được xác nhận không có 14 chất phân tích bằng phân tích LC-MS/MS.

3.2. Xây dựng quy trình phân tích

Triển khai sắc ký đối với mẫu giả lập bằng các hệ dung môi khác nhau, điều chỉnh chương trình gradient khác nhau dựa trên nguyên tắc thay độ phân cực của pha động để điều chỉnh các thông số sắc ký phù hợp, thu được điều kiện sắc ký phù hợp nhất có thể tách các pic tương ứng với được chất phân tích khỏi các pic tạp như Hình 1.

Từ các kết quả khảo sát quy trình chiết xuất (Hình 2A-2E), các yếu tố phù hợp nhất để chiết được hàm lượng 14 hoạt chất hiệu quả bao gồm: Y là EtOAc; T = 15 phút; P là phương pháp siêu âm; n = 2; O là SPE. Hiệu suất quy trình chiết suất được trình bày ở Bảng 2F cho thấy hiệu suất chiết của tất cả các chất phân tích đều lớn hơn 70%, đáp ứng được yêu cầu định lượng hợp chất có hàm lượng thấp trong nền mẫu phức tạp.

3.3. Thẩm định quy trình phân tích

3.3.1. Tính tương thích hệ thống - độ đặc hiệu

Quy trình phân tích đạt yêu cầu tính tương thích hệ thống với RSD% (n = 6) của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2% (Bảng 1). Kiểm tra độ đặc hiệu của quy trình bằng cách tiến hành phân tích mẫu DM, mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu giả lập thu được các sắc ký đồ của mẫu dung môi hòa tan mẫu, mẫu trắng, không cho tín hiệu tương ứng với 14 chất phân tích, trong khi mẫu giả lập cho tín hiệu chất phân tích tại khoảng thời gian lưu trùng với thời gian lưu trên mẫu chuẩn, các pic của chất phân tích đều đạt độ tinh khiết và tách nhau hoàn toàn.

3.3.2. Độ chính xác - độ đúng - tính tuyến tính

Dựa trên kết quả khảo sát tính tuyến tính (Bảng 1) của các giai mẫu chuẩn có nồng độ từ 2,5 - 5 - 12,5 - 18,75 - 25 - 50 - 75 - 100 - 125 ppm, tính toán giá trị $10 \times \sigma/a$ và xét cả giá trị S/N của mẫu tương ứng, LOQ của của các chất phân tích được thống nhất chọn là 25 ppm. Dựa trên giá trị này, tiến hành khảo sát độ đúng ở các mức 80 - 100 - 200 - 300 - 400% so với với LOQ.

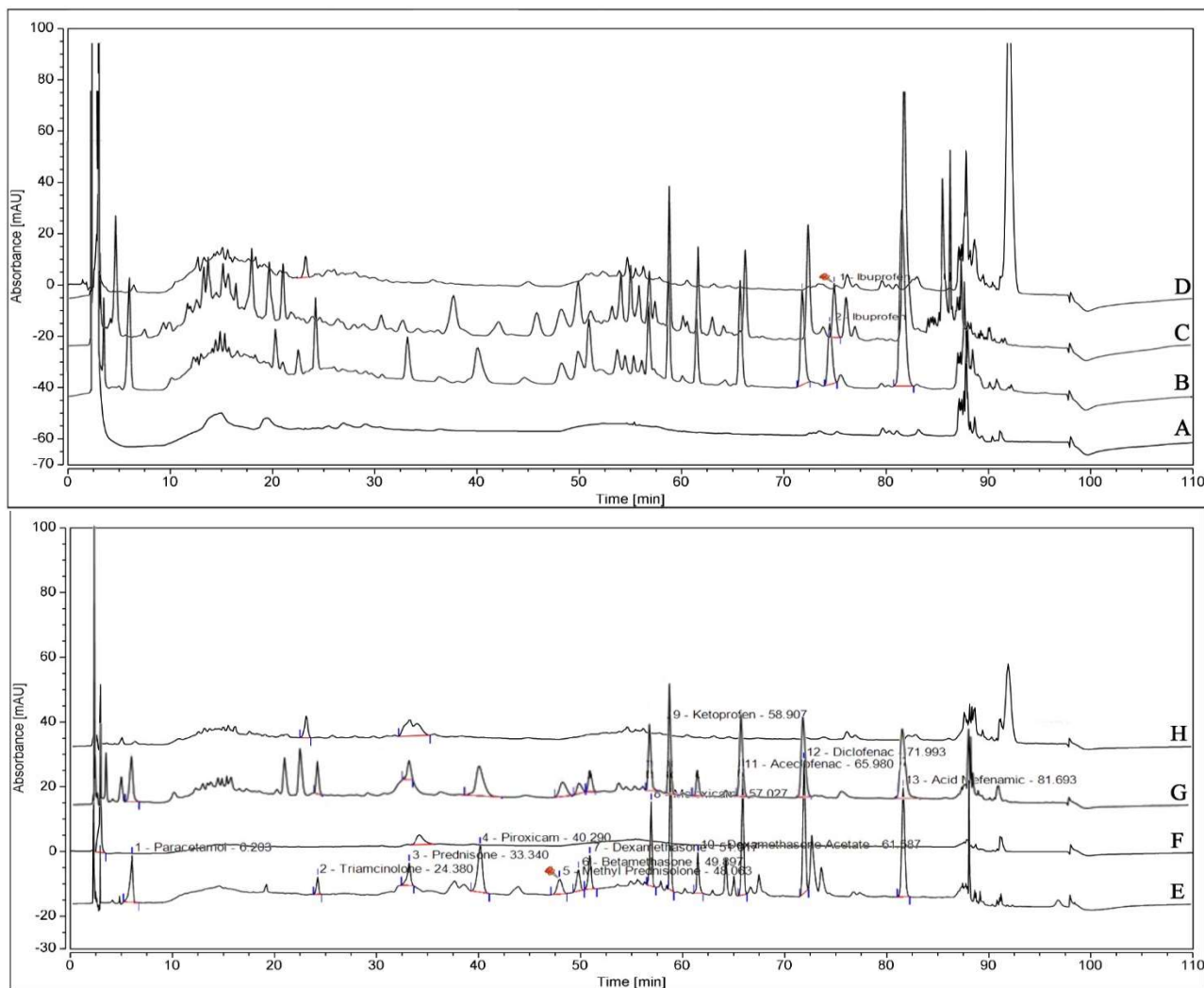
Kết quả ở Bảng 2 cho thấy quy trình đạt cả độ đúng và độ chính xác ở mỗi mức nồng độ với tỷ lệ phục hồi từ 87,18 - 114,54% và RSD% (n= 6) < 5%, đồng thời cũng có sự tương quan tuyến tính giữa tín hiệu của mẫu giả lập với nồng độ chất

chuẩn thêm vào ($r > 0,998$). Như vậy quy trình định lượng nên dựa vào phương pháp thêm.

Đối với nhóm các dược chất có liều dùng cao hơn 10 mg/liều, tín hiệu vượt ngoài khoảng tuyến tính, do đó mẫu thử sẽ được pha loãng thêm 50 lần. Kết quả Bảng 1 cho thấy quy trình đạt cả độ đúng và độ chính xác khi thêm lượng chất chuẩn tương ứng với 80%, 100%, 120% liều dùng với tỷ lệ phục hồi từ 89,78 - 118,69% và RSD% (n=6) < 5%.

3.4. Ứng dụng quy trình phân tích

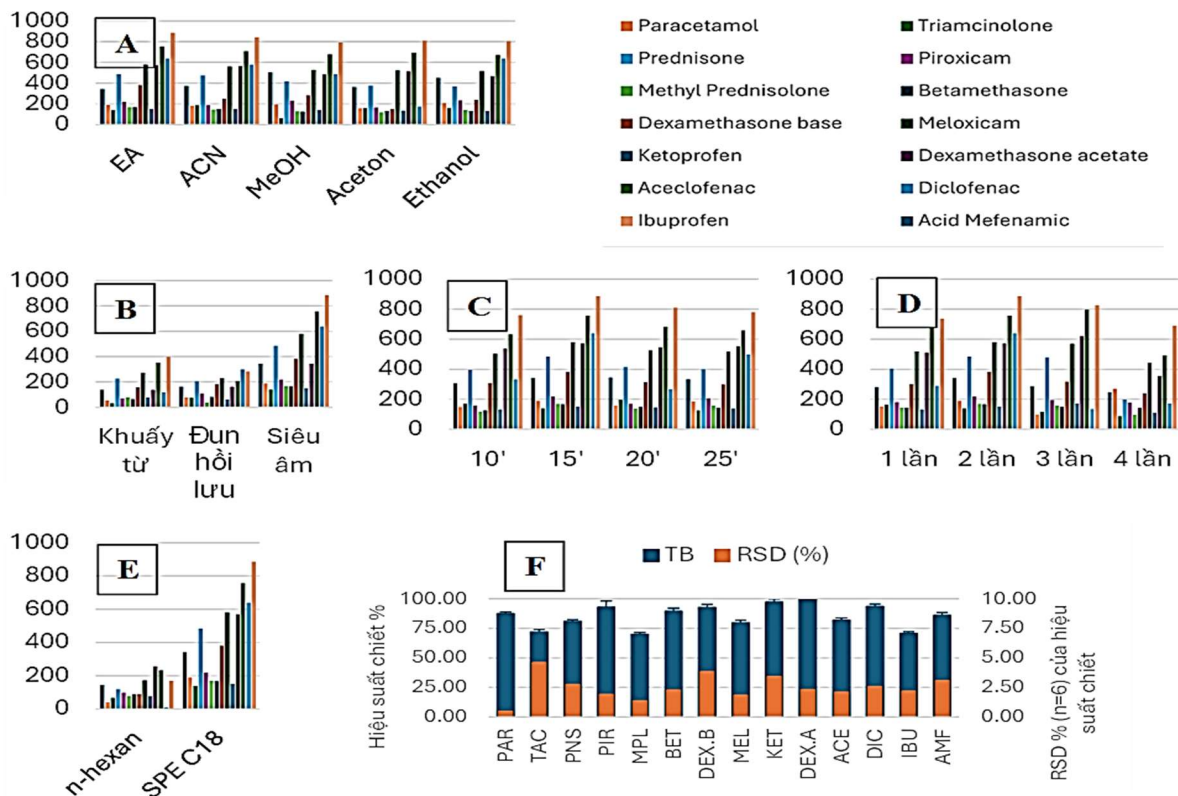
Kết quả trong Bảng 3 cho thấy có 8/50 mẫu có nguy cơ tạo PAR, DEX.B, DEX.A, ACE, DIC với hàm lượng từ tương đương đến cao hơn 25 lần so với liều dùng của dược chất tương ứng.



Hình 1. SKĐ của mẫu blank ở bước sóng 224 nm (A) và 280 nm (F); mẫu chuẩn ở bước sóng 224 nm (B) và 280 nm (E); mẫu giả lập ở bước sóng 224 nm (C) và 280 nm (G); mẫu placebo ở bước sóng 224 nm (D) và 280 nm (H); Điều kiện sắc ký: cột sắc ký ThermoScientific BDS HypersilTM (250 × 4,6 mm; 5 μm), chương trình dung môi với dung môi A là acetonitril (0-6 phút: 7,0%; 12 phút: 18,0%; 27-45 phút: 23,5%; 55 phút: 40,0%; 77 phút: 45,0%; 85 phút: 50,0%; 85-95 phút: 90,0%) và B là dung dịch triethylamin 10 mM điều chỉnh đến pH 3,5 bằng acid phosphoric 1%

Bảng 1. Kết quả tính tương thích hệ thống; phương trình hồi quy và LOD, LOQ đối với mẫu chuẩn; giá trị trung bình (TB%) và RSD % của tỷ lệ phục hồi của 14 chất ở các mức nồng độ khác nhau theo liều dùng

Hoạt chất	Tính tương thích hệ thống				Tính tuyến tính đối với mẫu chuẩn				Độ đúng theo liều dùng					
	tR (phút)		S (mAU x giây)		Phương trình	Hệ số tương quan r	LOD	LOQ	80%		100%		120%	
	TB	RSD %	TB	RSD %					TB%	RSD %	TB%	RSD %	TB%	RSD %
PAR	6,29	1,90	454,00	0,24	y=13510x	0,9986	0,0085	0,0256	99,70	2,05	100,34	2,70	100,53	1,32
TAC	24,70	0,72	214,32	0,20	y=9275x	0,9984	0,0089	0,0269	93,95	3,26	90,89	3,10	90,03	4,80
PNS	33,82	0,75	212,32	0,87	y=8837x	0,9987	0,0081	0,0246	94,88	3,51	99,33	2,85	98,22	4,53
PIR	41,10	1,02	542,96	1,04	y=23109x	0,9988	0,0077	0,0234	101,53	3,34	96,50	2,51	96,35	3,67
MPL	49,17	0,58	257,17	1,04	y=10831x	0,9991	0,0068	0,0205	89,78	3,81	94,63	4,05	118,69	2,64
BET	50,67	0,52	108,68	0,94	y=6784x	0,9988	0,0077	0,0233	90,38	4,70	100,73	4,30	103,80	4,19
DEX.B	51,61	0,42	174,60	1,08	y=7435x	0,9989	0,0072	0,0219	92,71	3,72	97,96	3,99	107,00	2,49
MEL	57,44	0,43	484,99	0,32	y=20089x	0,9987	0,0081	0,0244	96,17	2,31	91,24	2,25	97,74	3,08
KET	59,25	0,31	569,16	0,23	y=25859x	0,9988	0,0077	0,0233	96,33	3,98	99,57	2,76	101,05	1,71
DEX.A	61,93	0,25	147,90	0,58	y=6389x	0,9986	0,0082	0,0248	102,25	1,98	97,59	1,68	96,27	4,14
ACE	66,49	0,46	668,17	0,18	y=28822x	0,9988	0,0078	0,0237	104,67	4,12	100,04	1,85	93,65	3,34
DIC	72,63	0,42	772,46	0,40	y=33864x	0,9987	0,0081	0,0246	103,48	8,64	106,51	3,26	107,15	0,88
IBU	75,17	0,32	771,48	0,67	y=33463x	0,9983	0,0092	0,0278	94,56	4,46	97,76	2,99	98,43	1,74
AMF	82,46	0,41	796,67	0,93	y=37018x	0,9986	0,0082	0,0250	101,10	3,05	104,85	3,10	99,63	3,00



Hình 2. Kết quả khảo sát điều kiện chiết: (A) dung môi chiết xuất Y, (B) phương pháp chiết xuất P, (C) thời gian chiết xuất T phút, (D) số lần chiết xuất n, (E) phương pháp loại tạp O, (F) Hiệu suất chiết của quy trình được lựa chọn đối với dung dịch chuẩn

Bảng 2. Giá trị trung bình (TB%) và RSD % của tỷ lệ phục hồi của 14 chất ở các mức nồng độ khác nhau theo LOQ; phương trình hồi quy đối với mẫu giả lập

	Mức nồng độ so với LOQ										Tính tuyến tính đối với mẫu giả lập	
	80%		100%		200%		300%		400%			
Nồng độ (mg/ml)	0,02		0,025		0,05		0,075		0,1		Phương trình	Hệ số tương quan r
Hoạt chất	TB%	RSD%	TB%	RSD%	TB%	RSD%	TB%	RSD%	TB%	RSD%		
PAR	105,97	1,97	106,15	2,58	103,83	1,90	99,57	3,20	93,08	3,29	y=37x	0,9979
TAC	106,05	2,55	92,71	2,67	99,04	3,24	93,31	1,62	88,83	1,37	y=5791x	0,9978
PNS	93,89	1,43	92,73	2,47	87,25	1,26	91,04	3,01	89,13	1,53	y=6321x	0,9995
PIR	104,56	3,28	103,05	3,15	93,98	1,21	92,17	0,58	91,97	1,86	y=18974x	0,9999
MPL	112,53	1,75	103,06	2,48	114,54	2,71	109,58	2,35	96,98	1,54	y=7381x	0,9916
BET	102,10	3,22	99,98	2,30	95,03	1,03	94,75	2,30	95,60	2,27	y=5688x	0,9998
DEX.B	98,32	2,18	101,70	2,49	96,54	1,65	96,60	2,54	94,94	1,82	y=6463x	0,9999
MEL	98,04	3,04	106,07	3,80	97,63	2,15	95,32	1,78	95,66	3,61	y=14966x	0,9996
KET	95,14	2,28	94,05	2,94	91,68	1,31	94,34	4,57	90,26	1,07	y=22708x	0,9993
DEX.A	104,42	2,61	103,52	1,43	101,31	3,55	102,14	2,18	107,99	1,77	y=7131x	0,9987
ACE	107,27	1,62	103,48	2,42	105,40	5,21	102,41	2,00	93,32	1,16	y=21751x	0,9961
DIC	100,94	2,54	99,86	2,97	98,54	2,63	101,12	3,55	92,32	1,59	y=29313x	0,9969
IBU	98,14	2,97	103,14	2,62	87,18	3,92	89,92	2,50	90,86	2,66	y=20746x	0,9986
AMF	108,25	1,51	108,90	1,89	109,31	1,95	104,63	2,85	100,61	1,39	y=31578x	0,9989

Bảng 3. Kết quả hàm lượng dược chất được nguy tạo khi khảo sát 50 mẫu lấy/mẫu gửi có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến cơ xương khớp.

STT	Ký hiệu mã hoá mẫu	Nơi sản xuất	Quy mô nhà sản xuất	Nơi thu nhận mẫu	Liều dùng thấp nhất/ lần	PAR	DEX.B	DEX.A	ACE	DIC
						mg/liều dùng				
23	M023 - 271022	HONG KONG	Công Ty	Quận 1	3 Viên		12,05			
27	M027 - 271022	MALAYSIA	Công Ty	Quận 1	2 viên		12,86			
28	M028 - 271022	MALAYSIA	Công Ty	Quận 1	2 viên		13,39			
11	M011 - 011022	GIA LAI	Cá Nhân	Quận 7	1,5 g		21,18	8,42		
11	M011 - 011022	GIA LAI	Cá Nhân	Quận 7	1,5 gam		21,18	8,42		
24	M024 - 271022	AN GIANG	Cá Nhân	Quận 1	1 Gói 5g	512,25		13,16		
10	M010 - 011022	AN GIANG	Cá Nhân	Quận 1	1 Gói 5g	551,58				
4	M004 - 011022	HONG KONG	Công Ty	Quận 1	2 Viên				143,33	149,11

4. BÀN LUẬN

Về lựa chọn đối tượng nghiên cứu, các chất phân tích là những chất có tác dụng giảm đau, kháng viêm phổ biến, dễ thu mua, rẻ tiền, dẫn tới nguy cơ nguy tạo cao. Lựa chọn hỗn hợp một số thuốc và thực phẩm bảo vệ sức khỏe từ dược liệu trên thị trường điều trị bệnh xương khớp không có chất phân tích làm mẫu placebo và mẫu giả lập sẽ đảm bảo tính đại diện cho thành phần phức tạp của mẫu chế phẩm từ dược liệu, mà cũng đảm bảo được nguồn gốc của thành phần mẫu placebo, do các thuốc này đều được sản xuất theo hướng dẫn GMP, có hồ sơ đăng ký thuốc. Bên cạnh đó, một số thuốc được bào chế bằng các phương pháp hiện đại, có sử dụng các tá dược phổ biến, nên càng đại diện cho thành phần phức tạp và đa dạng của nền mẫu. Mặc dù nhu cầu giám sát và kiểm tra việc trộn trái phép dược chất chỉ là định tính, nhưng một số bệnh nhân sau một thời gian dài sử dụng các sản phẩm bị nguy tạo đã bị tình trạng lệ thuộc thuốc, do đó xuất hiện yêu cầu kiểm tra hàm lượng để có phác đồ điều trị phù hợp. Ngoài ra, việc định lượng cũng góp phần cảnh báo mức độ an toàn của sản phẩm bị nguy tạo khi mà nhiều sản phẩm có hàm lượng dược chất lớn hơn đến 25 lần so với liều dùng khuyến cáo của thuốc tương ứng. Với tình hình tại Việt Nam, việc áp dụng LC-MS/MS để phát hiện nguy tạo dược chất trong chế phẩm từ dược liệu là không khả thi mặc dù các chế phẩm này có đặc điểm là nền mẫu phức tạp, hàm lượng chất nguy tạo không biết rõ. Trở ngại lớn nhất đối với phương pháp này ngoài chi phí đầu tư ban đầu và bảo trì cao còn đến từ việc lựa chọn và sự sẵn có của nội chuẩn là đồng vị phù hợp với các chất phân tích, đảm bảo loại được sai số do quy trình xử lý mẫu và điều kiện MS bị ảnh hưởng lớn bởi nền mẫu quá phức tạp. Do đó, việc xây dựng phương pháp định lượng bằng HPLC-UV/Vis, một thiết bị phổ biến hơn trong các phòng thí nghiệm tại Việt Nam có ý nghĩa thực tiễn hơn. Tại các Trung tâm kiểm nghiệm thuộc hệ thống quản lý chất lượng thuốc nhà nước, phương pháp phổ biến nhất để kiểm tra nguy tạo corticoid trong chế phẩm từ dược liệu vẫn là sắc ký lớp mỏng và thực hiện lần lượt với từng chất nghi ngờ, chưa đáp ứng được nhu cầu xác định hàm lượng để đề xuất phác đồ điều trị đối với các trường hợp bệnh nhân bị ngộ độc mãn tính các chế phẩm có nguy tạo. Một số nghiên cứu về việc phát hiện nguy tạo dược chất tổng hợp bằng HPLC-UV/Vis trước đây đã được công bố nhưng tập trung trên nhóm hợp chất corticoid [8] với số lượng dược chất được xác định đồng thời tối đa là 6 hoặc một vài NSAID đơn lẻ [9].

Dựa vào thực nghiệm, cần khoảng 30 phút rửa cột và 20 phút để cân bằng cột, khoảng cách trung bình giữa các pic của các dược chất nên là 5 phút để có thể tách khỏi ảnh hưởng của các pic tạp thì khoảng thời gian phân tích 120 phút cho 14 hợp chất là phù hợp. Phương pháp phân tích sử dụng sắc ký lỏng pha đảo nên các chất phân cực được rửa giải sớm hơn các chất kém phân cực. Kết quả khi tiến hành thử độ đặc hiệu với các mẫu chuẩn riêng biệt và mẫu hỗn hợp chuẩn cho thấy thứ tự rửa giải phù hợp với giá trị LogP tương ứng. Sử dụng ethyl acetat để chiết sẽ loại bớt các tạp phân cực, và SPE C₁₈ để loại các tạp kém phân cực là phù hợp với 14 hợp chất mục tiêu trong nền mẫu rất phức tạp là dược liệu. Quy trình này cũng là một sự kế thừa nghiên cứu trước đây về việc định lượng đồng thời 8 dược chất nguy tạo trong nền mẫu là thuốc dược liệu [10]. Tuy nhiên, áp dụng chương trình gradient hệ dung môi ACN - acid phosphoric pH 3,5 của công bố này hoặc hệ dung môi MeOH - ACN - acid formic pH 2,5, đã không thể tách được MEL và KET. Do vậy, hệ dung môi ACN - triethylamin pH 3,5 là lựa chọn thích hợp để tách được đầy đủ 14 chất cho các thông số sắc ký về hệ số bất đối, diện tích pic, số đĩa lý thuyết và độ phân giải đều đạt yêu cầu trong phân tích. Bên cạnh đó, để cải thiện hiệu suất chiết của meloxicam, quy trình phân tích mới sử dụng thêm DMSO trong thành phần dung môi pha mẫu, nhưng việc này đồng thời đã gia tăng nguy cơ xuất hiện thêm pic tạp trên sắc ký đồ. Quy trình phân tích mới đã phân tích thêm 6 dược chất có nguy cơ nguy tạo, giảm được số lần phân tích và giảm chi phí phân tích đáng kể.

Về thẩm định quy trình phân tích, hiệu suất chiết các dược chất đều lớn hơn 70%, nhưng cũng không thể gọi là lý tưởng, do đó sai số của quy trình đến từ giai đoạn này là chủ yếu. Bên cạnh đó, nền mẫu quá phức tạp, nên việc áp dụng phương pháp thêm sẽ giúp loại trừ được sai số do nền mẫu và do quy trình xử lý mẫu. Việc thẩm định quy trình kết hợp tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác cũng góp phần khẳng định việc loại trừ ảnh hưởng này tốt hơn

5. KẾT LUẬN

Quy trình phân tích 14 hoạt chất bằng phương pháp HPLC UV/Vis, một công cụ hiệu quả cao về phân tích nhưng phù hợp về chi phí với thực tiễn tại Việt Nam, đã được xây dựng, thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC (2023). Ứng dụng quy trình trên 50 chế phẩm

từ dược liệu phát hiện 8/50 mẫu hiện diện PAR, DIC, ACE, DEX.B, DEX.A.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, Trung Tâm Kiểm Nghiệm Thành Phố Hồ Chí Minh, Sở An toàn thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh, Sở Y Tế thành phố Hồ Chí Minh, Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ hoàn thành nội dung nghiên cứu.

Đây là sản phẩm khoa học công nghệ do Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh tài trợ kinh phí.

Nguồn tài trợ

Nghiên cứu nhận được kinh phí tài trợ từ Sở Khoa học và công nghệ TP.HCM theo hợp đồng Thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ số 28/2022/HĐ-QKHCN ngày 12/9/2022.

Xung đột lợi ích

Không có xung đột lợi ích nào liên quan đến nghiên cứu này.

ORCID

Phan Văn Hồ Nam

<https://orcid.org/0000-0003-4496-3071>

Phạm Văn Sơn

<https://orcid.org/0000-0002-8425-0386>

Đóng góp của các tác giả

Ý tưởng nghiên cứu: Phan Văn Hồ Nam.

Đề cương và phương pháp nghiên cứu: Phan Văn Hồ Nam, Phạm Văn Sơn, Nguyễn Thị Thùy Linh.

Thu thập dữ liệu: Phan Văn Hồ Nam, Lương Vĩ Khang, Huỳnh Tấn Phát, Nguyễn Thị Thùy Linh, Võ Thanh Thúy, Nguyễn Thu Ánh, Ngô Thị Minh Tâm.

Giám sát nghiên cứu: Phan Văn Hồ Nam, Phạm Văn Sơn.

Nhập dữ liệu: Nguyễn Thị Thùy Linh.

Quản lý dữ liệu: Phạm Văn Sơn, Phan Văn Hồ Nam.

Phân tích dữ liệu: Phan Văn Hồ Nam, Lương Vĩ Khang, Phạm Văn Sơn, Nguyễn Thị Thùy Linh.

Viết bản thảo đầu tiên: Lương Vĩ Khang.

Góp ý bản thảo và đồng ý cho đăng bài: Phan Văn Hồ Nam.

Cung cấp dữ liệu và thông tin nghiên cứu

Tác giả liên hệ sẽ cung cấp dữ liệu nếu có yêu cầu từ Ban biên tập.

Chấp thuận của Hội đồng Đạo đức

Nghiên cứu này miễn trừ Hội đồng Đạo đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đào Khánh Long, Vũ Văn Hiếu, Trương Ngọc Huyền. 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. 2011;15(1):617-621.
2. Nguyễn Quang Nam, Trần Hùng. Phát hiện nhanh một số corticoid pha trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng kỹ thuật khối phổ với chế độ tiêm mẫu trực tiếp. Y Học Thành Phố Hồ Chí Minh. 2011;15(1):633-640.
3. 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. Dược Học. 2019;59(516):57-62.
4. Đào Cẩm Minh, Thái Bảo Châu Khoa, Trần Tuấn Phong, Nguyễn Phúc Khánh Nhi, Trần Hữu Dũng, Phạm Thị Thanh Hà, et al. 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. Dược Học. 2018;58(503):18-22.
5. Cục quản lý Dược - Bộ Y tế. Tra cứu giấy đăng ký thuốc, nguyên liệu làm thuốc tại Việt Nam 2020. [cited 2020 Aug 5]. <https://dichvucong.dav.gov.vn/congbothuoc/index>.
6. Cục an toàn thực phẩm - Bộ Y tế. Tra cứu hồ sơ đăng ký quảng cáo các chế phẩm là thực phẩm bảo vệ sức khỏe được công bố tại cục An toàn thực phẩm của bộ Y tế 2021 [cited 2021 Jul 15]. <https://nghidinh15.vfa.gov.vn/>.
7. Appendix K guidelines for dietary supplements and botanicals. In: Latimer GW, editor. Official Methods of Analysis of AOAC International. 22nd ed. USA: Oxford University Press;2023. p.AK-1-AK-32.
8. Nguyễn Thị Quỳnh, Hồ Thị Hồng Thắm, Bùi Thị Luyến, Hồ Lương Nhật Vinh. Xây dựng phương pháp định tính,

định lượng dexamethason acetat trong một số chế phẩm đồng dược có tác dụng hỗ trợ hoặc điều trị viêm khớp bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Khoa Học và Công Nghệ Đại Học Thái Nguyên. 2018;188:75-81.

9. Bùi Thị Luyến, Nguyễn Thị Quỳnh, Bùi Thị Thanh Châm. Nghiên cứu xác định thuốc diclofenac natri lẫn trong chế phẩm đồng dược được sử dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Khoa Học và Công Nghệ Đại Học Thái Nguyên. 2018;187(11):31-7.

10. Phan Văn Hồ Nam, Lê Thị Lư, Nguyễn Thị Thùy Linh. Xây dựng quy trình định lượng 8 hoạt chất tân dược nguy tạo trong thuốc được liệu điều trị giảm đau kháng viêm bằng phương pháp HPLC-PDA. Y Học Việt Nam. 2023;527(1B-2023):379-84.