

# Xác định 14 dược chất nguy tạo trong chế phẩm dạng lỏng từ dược liệu bằng phương pháp HPLC-UV/VIS

Phan Văn Hồ Nam<sup>1</sup>, Vương Thanh Ngân<sup>2</sup>, Đàm Tố Uyên<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thùy Linh<sup>3</sup> và Phạm Văn Sơn<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trung tâm Kiểm nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Sở Y tế Thành phố Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Hiện nay, các quy trình phân tích dược chất ở Việt Nam có tác dụng giảm đau, kháng viêm có nguy cơ nguy tạo cao trong chế phẩm từ dược liệu trước đây thường tập trung vào chế phẩm rắn, không phù hợp chế phẩm lỏng, nang mềm và hoàn mềm, cũng có nguy cơ tương đương. **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 trong các chế phẩm dạng lỏng, nang mềm, hoàn mềm từ dược liệu hỗ trợ điều trị bệnh cơ xương khớp bằng phương pháp HPLC-UV/Vis. **Phương pháp nghiên cứu:** Điều kiện sắc ký gồm pha tĩnh là cột C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm); pha động là hỗn hợp dung dịch triethylamin 10 mM pH 3.5 và acetonitril (gradient); phát hiện ở 224 nm, 280 nm. Mẫu thử được chiết với ethyl acetat, loại tạp bằng SPE C18. Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC (2023) **Kết quả:** Quy trình phân tích đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tuyến tính từ 8 - 100 ppm, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện của phương pháp đối với betamethason và piroxicam là 0.16 mg/L, 12 dược chất còn lại là 0.11 mg/L. **Kết luận:** Đã xây dựng, thẩm định và ứng dụng quy trình định lượng 14 dược chất nguy tạo trong chế phẩm từ dược liệu.

**Từ khóa:** nguy tạo, dược liệu, HPLC

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thị trường, các sản phẩm thuốc, thực phẩm chức năng từ dược liệu rất đa dạng, được người bệnh tin tưởng sử dụng vì cho rằng an toàn, ít tác dụng phụ. Lợi dụng tâm lý đó, các cơ sở sản xuất đã trộn trái phép thuốc hóa dược vào chế phẩm dược liệu nhằm tăng hiệu quả điều trị, thu hút khách hàng, đem lại lợi nhuận lớn. Tình trạng này diễn ra thường xuyên, tinh vi và khó kiểm soát.

Nhiều nghiên cứu đã công bố các phương pháp kiểm nghiệm một số dược chất thuộc nhóm NSAID và glucocorticoid trộn trái phép trong các chế phẩm từ dược liệu [1, 2]. Tuy nhiên, thực tế tại Việt Nam, đa số các trung tâm kiểm nghiệm được trang bị thiết bị HPLC-UV/Vis để phục vụ công tác kiểm tra sản phẩm và có chi phí khá phù hợp. Bên cạnh đó, các quy trình phân tích đã công bố chỉ phù hợp với mẫu dạng rắn (bao gồm viên nén, viên nang, hoàn cứng...), mà không phù hợp với mẫu dạng lỏng, nang mềm và hoàn mềm, cũng là các dạng bào chế phổ biến đang lưu hành trên thị trường. Các mẫu phân tích này có đặc điểm liều dùng lớn, nồng độ dược chất nếu được nguy tạo sẽ giảm, phương pháp chiết xuất đối với mẫu rắn không phù hợp.

Dexamethason, betamethason, triamcinolon, paracetamol, dexamethason acetat, prednison, methylprednisolon, piroxicam và diclofenac đã được lựa chọn dựa vào khảo sát trên các mẫu thực tế gần đây và các công bố từ năm 2018 đến nay tại Việt Nam [1 - 5] về các nghiên cứu tương tự. Bên cạnh đó bổ sung thêm 5 dược chất là aceclofenac, ibuprofen, ketoprofen, meloxicam, acid mefenamic có nguy cơ cao do sự phổ biến cũng như giá thành thấp của nguyên liệu/ chế phẩm tân dược của các dược chất này trên thị trường.

Do vậy, cần nghiên cứu để bổ sung thêm một quy trình phân tích khả thi trong điều kiện thực tiễn tại Việt Nam, có thể xác định nhiều hoạt chất nhất có nguy cơ nguy tạo trong các chế phẩm từ dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị cơ xương khớp.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu placebo: Hỗn hợp 5 chế phẩm dược liệu trên thị trường điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh cơ xương khớp được xác nhận không có chất phân tích bằng LC-MS/MS, được lựa chọn đảm bảo có đủ các

Tác giả liên hệ: TS. Phạm Văn Sơn

Email: [phamvansonyt@gmail.com](mailto:phamvansonyt@gmail.com)

thành phần dược liệu có tần suất xuất hiện từ 25% trở lên trong tổng số các sản phẩm dạng lỏng, nang mềm và hoàn mềm được thống kê dữ liệu từ trang web của Cục Quản lý Dược [6] (có 16 chế phẩm) và trang web Hệ thống đăng ký dịch vụ công An toàn

thực phẩm quốc gia của Cục an toàn vệ sinh thực phẩm [7] (có 11 chế phẩm), dựa trên từ khóa cơ, xương, khớp, cốt, thống, thấp: Cao Đổ trọng, Khu phong hóa thấp Xuân Quang, Cốt vị vương Nam Hà, Độc hoạt tang ký sinh Bidiphar, Hoàn phong thấp.

**Bảng 1.** Công thức mẫu giải lập (dược liệu in đậm có tần suất xuất hiện trong thành phần của các chế phẩm được thống kê với tỷ lệ trên 25% so với tổng chế phẩm)

STT	Tên chế phẩm	Dạng bào chế	Nhà sản xuất	Thành phần dược liệu
1	Cao Đổ trọng	Cao lỏng	Công ty TNHH 1 TV SX&TM Thiên Hòa Đường	Đổ trọng, Độc hoạt, Tang ký sinh, Ngưu tất, Phòng phong, Đương quy, Xuyên khung, Quế, Tế tân, Tần giao, Bạch thược, Địa hoàng, Nhân sâm, Cam thảo.
2	Khu phong hóa thấp Xuân Quang	Cao lỏng	Công ty TNHH Đông Dược Xuân Quang	Đổ trọng, Ngũ gia bì chân chim, Thiên niên kiện, Tục đoạn, Đại hoàng, Đương quy, Xuyên khung, Tần giao, Sinh địa, Uy linh tiên, Quế chi, Cam thảo.
3	Cốt vị vương Nam Hà	Cao lỏng	Công Ty Cổ Phần Dược Phẩm Nam Hà	Tần giao, Hồng hoa, Đương quy, Ngưu tất, Khương hoạt, Bạch thược, Đan sâm, Hương phụ, Xuyên khung, Thục địa, Một dược.
4	Độc hoạt tang ký sinh Bidiphar	Viên nang mềm	Công ty cổ phần Dược - TTBYT Bình Định	Độc hoạt, Phòng phong, Tang ký sinh, Tần giao, Bạch thược, Ngưu tất, Sinh địa, Cam thảo, Đổ trọng, Tế tân, Quế nhục, Đảng sâm, Đương quy, Xuyên khung, Phục linh.
5	Hoàn phong thấp	Hoàn mềm	Viện YHCT Bộ Công An	Hy thiêm, Ngưu tất, Quế chi, Cẩu tích, Sinh địa, Ngũ gia bì.

*Mẫu giả lập: Mẫu placebo thêm dung dịch chuẩn có nồng độ xác định. Chất chuẩn: Thông tin 14 chất chuẩn sử dụng được trình bày trong Bảng 2.*

**Bảng 2.** Các chất chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

Chất chuẩn	Ký hiệu viết tắt	Xuất xứ	Số kiểm soát/số lô	Hàm lượng
Paracetamol	PAR	Viện KNT Thành phố Hồ chí Minh (TP.HCM)	QT009 0322	99.5%
Triamcinolon	TAC	Toronto Research Chemicals	2023-JPO-094	99.61%
Prednison	PNS	Viện KNT Trung ương	C0423235	98.1%
Methylprednisolon	MPL	Viện KNT TP.HCM	QT159 080222	99.0%
Betamethason	BET	Viện KNT TP.HCM	QT107 1122	99.1%
Dexamethason	DEX.B	Viện KNT TP.HCM	QT286 1022	99.5%
Piroxicam	PIR	Viện KNT Trung ương	C0222132	99.6%
Meloxicam	MEL	Viện KNT TP.HCM	QT089 0423	99.7%
Ketoprofen	KET	Viện KNT Trung ương	0105178	99.8%
Dexamethason acetat	DEX.A	Viện KNT Trung ương	C0322014	98.8%
Aceclofenac	ACE	Viện KNT TP.HCM	QT220 030421	99.8%
Diclofenac natri	DIC	Viện KNT Trung ương	C0619047.05	100.0%
Ibuprofen	IBU	Viện KNT TP.HCM	QT026 130520	99.5%
Acid mefenamic	AMF	Viện KNT TP.HCM	QT055 1022	100.0%

Hóa chất - Dung môi: Dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisher; 99.99%), triethylamin (TFA, Fisher; 99.89%), acid phosphoric ( $H_3PO_4$ , Fisher, 84.97%), ethyl acetate (EtOAc, Merck, 99.5%), chloroform ( $CHCl_3$ , Chemsol, 99.0%), *n*-butanol (*n*-But, Fisher; 99.4%) đạt tiêu chuẩn phân tích; Silicagel 60 (0.040 - 0.063

mm) (Merck), SPE C18 Copure 500 mg/6 mL (Biocomma); acetonitril (ACN, J.T.Bake; 99.9%), methanol (MeOH, Fissner; 99.9%), Nước cất siêu lọc (TTKN thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm TP.HCM) đạt tiêu chuẩn sắc ký lỏng.

Trang thiết bị: Cân phân tích Shimadzu độ nhạy 0.1

mg, Cân kỹ thuật Shimadzu độ nhạy 0.01 g, Máy đo pH Horiba PH2000, Bể siêu âm Elma S300H, Hệ thống HPLC-UV/Vis Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Xây dựng quy trình phân tích

Dựa trên nghiên cứu trước đây [4], điều chỉnh chương trình dung môi phù hợp, tiến hành khảo sát các thông số của quy trình chiết xuất trên nền mẫu giả lập bao gồm: phương pháp chiết xuất (chiết phân bố, khuấy từ, siêu âm), loại dung môi chiết xuất (EtOAc, *n*-BuOH, CHCl<sub>3</sub>), số lần chiết (2, 3, 4 lần) và thể tích dung môi chiết (15, 20, 25 mL), dựa trên tỷ số diện tích pic lớn nhất để chọn điều kiện phù hợp và khảo sát lần lượt các thông số tiếp theo. Hiệu suất chiết H% trên mẫu chuẩn đã được xử lý mẫu có yêu cầu > 70% được tính như sau:  $H\% = SC_0/SC_1 \times 100$ . Trong đó: SC<sub>0</sub> là diện tích pic của chất phân tích trong 1 mL C<sub>0</sub> đã được xử lý mẫu như mẫu giả lập; SC<sub>1</sub>: Diện tích pic của chất phân tích tương ứng trong mẫu hỗn hợp chuẩn C<sub>1</sub> không qua xử lý.

### 2.2.2. 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 (C<sub>0</sub>): Lấy 0.5 mL của từng dung dịch chuẩn gốc (M) cho vào bình định mức 10 mL, điền đầy đến vạch bằng DM.

Dung dịch chuẩn (C<sub>1</sub>): Lấy 1 mL C<sub>0</sub> cho vào ống nghiệm, sau đó cô đến cạn. Thêm 15 mL nước, chiết phân bố với EtOAc (3 lần, mỗi lần 20 mL). Dịch EtOAc thu được cô trên cách thủy đến cạn. Thêm khoảng 0.5 g Silicagel (0.040 - 0.063 mm), trộn đều, nạp mẫu khô vào SPE C18. Tiến hành rửa giải bằng 5 mL DM, thêm MeOH vừa đủ 20 mL thu được dung dịch thử.

Dung dịch thử: Lấy 15 mL dung dịch chế phẩm tương ứng với 1 liều dùng (hoặc 1 lượng dịch nang mềm hoặc 1 lượng hoàn mềm tương ứng với 1 liều dùng phân tán trong 15 mL nước), tiến hành xử lý mẫu như dung dịch chuẩn từ giai đoạn chiết phân bố với EtOAc.

Dung dịch thử thêm chuẩn (mẫu spike/mẫu giả lập): Lấy 1 mL dung dịch C<sub>0</sub> cho vào ống nghiệm, sau đó cô đến cạn. Lấy 15 mL dung dịch chế phẩm tương ứng với 1 liều dùng (hoặc 1 lượng dịch nang mềm hoặc 1 lượng hoàn mềm tương ứng với 1 liều dùng phân tán trong 15 mL nước), tiến hành xử lý

mẫu như dung dịch chuẩn từ giai đoạn chiết phân bố với EtOAc.

Nếu phát hiện mẫu chứa dược 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 GL Sciences InertSustain C18 (250 mm x 4.6 mm; 5 μm), pha động là chương trình dung môi với A là acetonitril và B là dung dịch đệm triethylamin 10 mM điều chỉnh pH 3.5 bằng H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0 - 12 phút: 7.0%A; 12.1 phút: 17.5%A; 24 - 45 phút: 30%A; 46 phút: 40.0%A; 60 phút: 45.0%A; 75 phút: 50.0%A; 85 phút: 75.0%A); tốc độ dòng là 1.0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μL, bước sóng phát hiện là 224 nm và 280 nm.

Hàm lượng X mg của dược chất ngụy tạo trong 1 liều dùng mẫu thử được tính như sau:

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

Trong đó: S<sub>thử</sub>: Diện tích đỉnh của chất phân tích trong dung dịch thử; S<sub>spike</sub>: Diện tích đỉnh của chất phân tích trong dung dịch thử thêm chuẩn; C<sub>chuẩn</sub>: 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.

### 2.2.3. Thẩm định quy trình phân tích

Quy trình định lượng được tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của AOAC (2023) [8] với các chỉ tiêu: Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng.

### 2.2.4. Ứng dụng quy trình phân tích

Ứng dụng quy trình để kiểm tra 14 dược chất tổng hợp trộn trái phép trong một số chế phẩm từ dược liệu có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị cơ xương khớp trên thị trường.

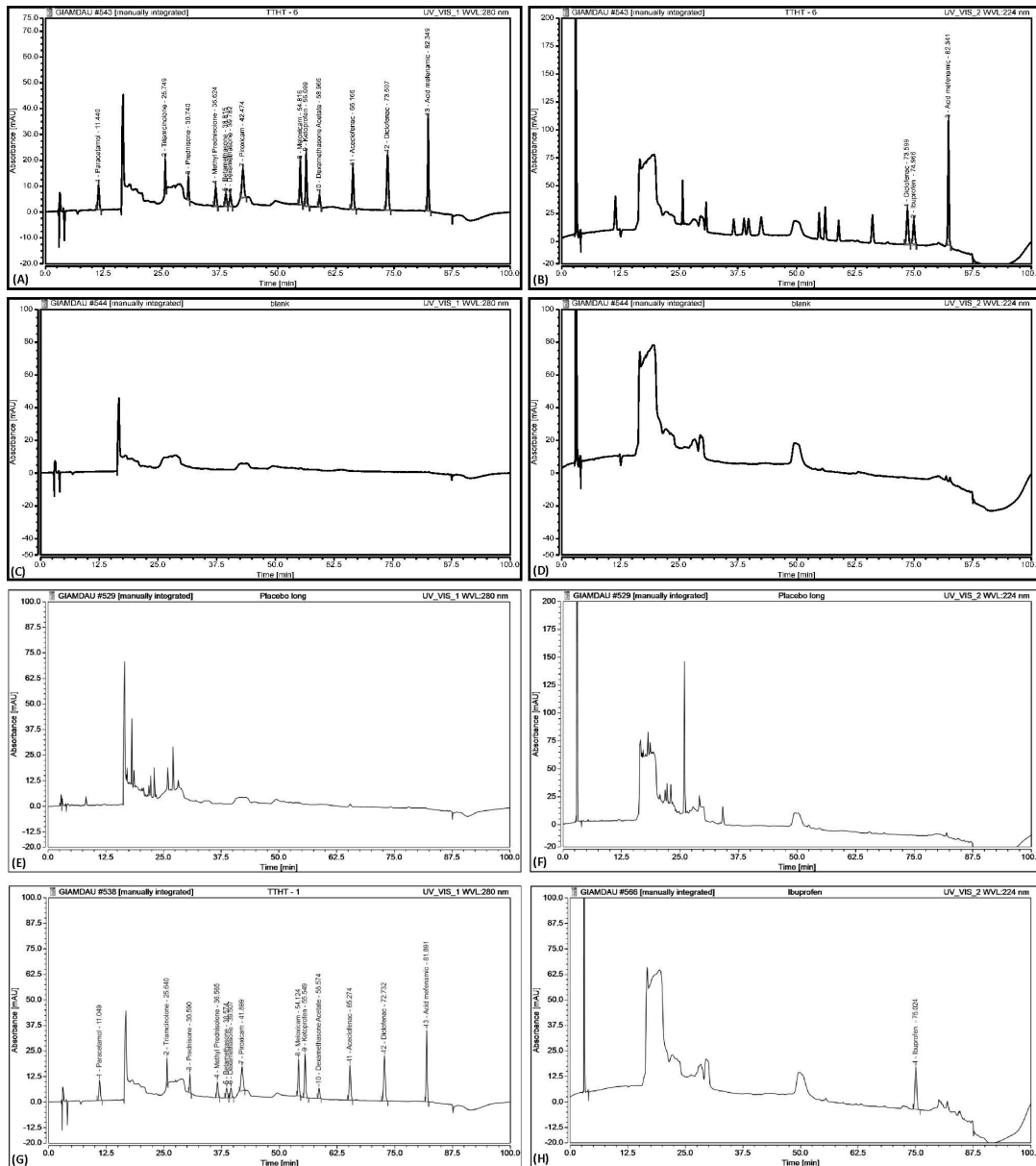
### 2.2.5. Phương pháp xử lý kết quả

Sử dụng phần mềm MS Excel 365 để xử lý thống kê các kết quả thu được.

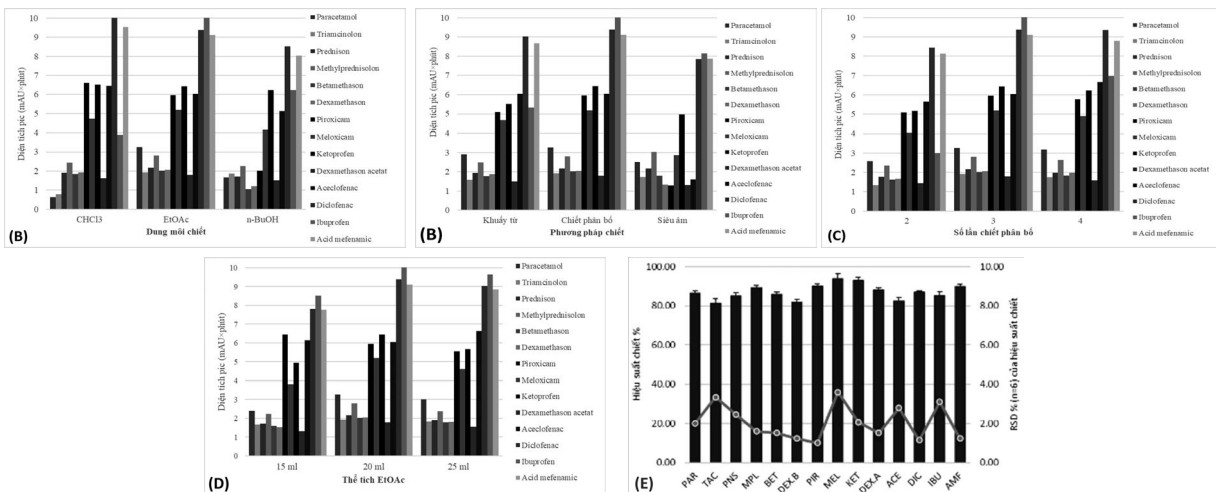
## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Xây dựng quy trình phân tích

Sau quá trình thử nghiệm mẫu C1 và mẫu giả lập với các hệ dung môi khác nhau và các chương trình gradient khác nhau, dựa trên nguyên tắc giảm độ phân cực của pha động để tách pic chất phân tích khỏi tạp và tăng độ phân cực của pha động để rút ngắn thời gian phân tích, kết quả thu được như Hình 1.



Hình 1. SKĐ của mẫu giả lập ở bước sóng 280 nm (A) và 224 nm (B); mẫu blank ở bước sóng 280 nm (C) và 224 nm (D); mẫu placebo ở bước sóng 280 nm (E) và 224 nm (F); mẫu chuẩn ở bước sóng 280 nm (G) và 224 nm (H)



Hình 2. Kết quả khảo sát điều kiện chiết: (A) phương pháp chiết, (B) dung môi chiết, (C) số lần chiết, (D) thể tích chiết, (E) Hiệu suất chiết của quy trình được lựa chọn đối với dung dịch chuẩn

**Bảng 3.** Kết quả khảo sát điều kiện chiết

STT	Phương pháp		Dung môi	Số lần chiết	Thể tích dung môi (mL)	S (mAU × phút)	
						Min	Max
1	Phương pháp	Khuấy từ	EtOAc	3	20	1.494	9.033
2		Chiết phân bố				1.798	10.216
3		Siêu âm				1.279	8.142
4	Dung môi	Phân bố	CHCl <sub>3</sub>	3	20	0.624	10.180
5			EtOAc			1.798	10.216
6			n-BuOH			1.040	8.514
7	Số lần chiết	Phân bố	EtOAc	2	20	1.345	8.440
8				3		1.798	10.216
9				4		1.580	9.362
10	Thể tích dung môi	Phân bố	EtOAc	3	15	1.322	8.511
11					20	1.798	10.216
12					25	1.549	9.645

Từ các kết quả khảo sát (Hình 2, Bảng 3), quy trình phân tích đã lựa chọn (chiết phân bố bằng 20 mL ethyl acetat với 3 lần) có tín hiệu các pic cao nhất (diện tích pic của 14 dược chất trong mẫu giả lập từ 1.798 - 10.216 mAU×phút) và có hiệu suất chiết H% (n = 6) của tất cả các chất phân tích từ 81.42% - 93.73% có RSD% (n = 6) từ 1.20 - 3.71%. Để loại trừ sai số đến từ hiệu suất chiết và nhiễu được nền cao (Hình 1), phương pháp định lượng được thực hiện bằng phương pháp thêm.

**3.2. Thẩm định quy trình phân tích**

Tiến hành thẩm định tính đặc hiệu thu được kết quả như Bảng 4 và Hình 1. Sắc ký đồ mẫu dung môi pha mẫu Hình 1C và 1D) và mẫu placebo (Hình 1E và 1F) không cho tín hiệu tương ứng với 14 chất phân tích, trong khi mẫu placebo thêm chuẩn (Hình 1A và 1B)) cho tín hiệu chất phân tích tại khoảng thời gian lưu trùng với thời gian lưu trên mẫu chuẩn (Hình 1G và 1H), các pic của chất phân tích tách nhau hoàn toàn và tách khỏi các pic tạp nếu có.

**Bảng 4.** Kết quả thẩm định chỉ tiêu tính đặc hiệu

	Thời gian lưu (phút)				
	Chuẩn	Chuẩn hỗn hợp	Giả lập	Mẫu trắng	Dung môi
PAR	11.690	11.440	11.765	-	-
TAC	25.607	25.749	25.757	-	-
PNS	30.707	30.740	30.707	-	-
MPL	36.449	36.624	36.440	-	-
BET	38.774	38.815	38.757	-	-
DEX.B	39.774	39.782	39.724	-	-
PIR	42.682	42.474	42.649	-	-
MEL	54.965	54.816	54.890	-	-
KET	56.315	56.099	56.257	-	-
DEX.A	59.032	58.966	59.049	-	-
ACE	65.840	66.166	65.965	-	-
DIC	73.665	73.607	73.799	-	-
IBU	75.024	74.966	75.099	-	-
AMF	82.066	82.349	82.082	-	-

Quy trình định lượng đạt tính phù hợp hệ thống khi RSD% (n = 6) của thời gian lưu và diện tích pic từ đều < 2.0%, hệ số bất đối từ 0.8 - 1.5, độ phân giải ≥ 1.5, số đĩa lý thuyết > 2000 (Bảng 5).

**Bảng 5.** Kết quả thẩm định quy trình phân tích

Chỉ tiêu		Kết quả đối với 14 chất	
Tính tương thích hệ thống	Thời gian lưu	RSD (n=6)%	0.07 - 1.57%
	Diện tích pic	RSD (n=6)%	0.07 - 1.70%
	Hệ số bất đối		0.95 - 1.11

Chỉ tiêu		Kết quả đối với 14 chất		
Tính tương thích hệ thống	Độ phân giải		1.5 - 38.3	
	Số đĩa lý thuyết		6.919 - 665.254	
Tính đặc hiệu	Mẫu blank, placebo không cho tín hiệu tương ứng với 14 chất phân tích. Mẫu giả lập có tín hiệu chất phân tích tại khoảng thời gian lưu tương ứng mẫu chuẩn, tách khỏi các pic tạp, độ phân giải > 1.5	Đạt (Hình 1, Bảng 3)		
Độ đúng - Độ chính xác - Tính tuyến tính	Các mức nồng độ so với LOQ (80 - 100 - 200 - 500 - 750 - 1000%)	Tỷ lệ phục hồi TB (n = 6)%	80.68 - 111.17 %	
		Tỷ lệ phục hồi RSD (n = 6)%	0.66 - 5.45%	
		Hệ số tương quan	0.9938 - 0.9986	
		LOD (ppm)	5.13 - 10.98	
		LOQ (ppm)	15.57 - 33.29	
	Các mức nồng độ so với liều dùng thấp (TAC, PNS, MPL, BET, DEX.B, MEL, DEX.A)	Tỷ lệ phục hồi TB (n = 6)%	94.37 - 105.23	
		Tỷ lệ phục hồi RSD (n = 6)%	0.67 - 3.61	
		Các mức nồng độ so với liều dùng cao (PAR, PIR, KET, ACE, DIC, IBU, AMF)	Tỷ lệ phục hồi TB (n = 6)%	90.07 - 101.14
			Tỷ lệ phục hồi RSD (n = 6)%	0.9 - 3.73
		Mức LOQ (V nền mẫu khác nhau: 15 - 30 - 60 - 90 mL)	Tỷ lệ phục hồi TB (n = 3)%	65.42 - 105.75

Độ đúng và độ chính xác được thẩm định kết hợp bằng cách thực hiện 6 mẫu ở mỗi mức nồng độ theo LOQ (80 - 100 - 200 - 500 - 750 - 1,000%, tương ứng lượng chuẩn thêm vào có nồng độ trong mẫu là 8 - 10 - 20 - 50 - 75 - 100 ppm), đồng thời đánh giá sự tương quan tuyến tính giữa tín hiệu của mẫu giả lập với nồng độ chất chuẩn thêm vào, LOD và LOQ được tính toán dựa trên phương trình hồi quy thu được, cao hơn nhiều so với LOD và LOQ được tính dựa trên giai mẫu chuẩn. Tuy nhiên do đã được thẩm định độ đúng và độ chính xác đạt yêu cầu, nên LOQ của phương pháp sẽ được xác định là 10 ppm. Bảng 3 cũng 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 80 - 115% và RSD (n = 6) < 6%.

Đánh giá ảnh hưởng của liều dùng nền mẫu đến chất phân tích bằng cách sử dụng thể tích dung dịch placebo gấp 2, 4, 6 lần liều dùng và thêm chuẩn tại nồng độ LOQ. Kết quả Bảng 3 cho thấy tỷ lệ thu hồi đạt từ 81.12 - 105.75% đối với liều dùng từ 15 - 60 mL và các thông số sắc ký về độ phân giải, hệ số bất đối, số đĩa lý thuyết biểu kiến đều đạt yêu cầu. Ở liều dùng 90 mL, tỷ lệ thu hồi của BET và PIR lần lượt là 73.20% và 65.42%, đồng thời tín hiệu của các pic tạp rất cao, dẫn đến khó phát hiện các pic dược chất. Như vậy nếu xét giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện theo nồng độ hoạt chất trong nền mẫu, thì quy trình có giới hạn định lượng của BET và PIR là 0.16 mg/kg nền mẫu, 12 dược chất còn lại là 0.11 mg/kg nền mẫu. Ngưỡng giới hạn này đảm bảo đủ nhạy để phát hiện những trường hợp tân dược bị pha trộn lượng rất nhỏ.

### 3.3. Ứng dụng quy trình phân tích

Kết quả phân tích 6 mẫu là thực phẩm chức năng có tác dụng hỗ trợ điều trị cơ xương khớp đang lưu hành trên thị trường, phát hiện được 2 mẫu có nơi sản xuất là TP.HCM và Đà Loan đều có dạng bào chế là cao lỏng với liều dùng 15 mL có nguy cơ tạo paracetamol hàm lượng 151.78 mg/liều dùng (sản xuất tại TP.HCM và thu nhận tại quận 5, TP.HCM) và dexamethason hàm lượng 4.55 mg/liều dùng (sản xuất tại Đà Loan và thu nhận tại quận Bình Thạnh, TP.HCM). Với hàm lượng nguy cơ gấp 10 lần so với liều dùng khuyến cáo, dexamethason có thể gây ra những tác dụng phụ nguy hiểm khi sử dụng như hội chứng cushing, suy thận. Bên cạnh đó việc không công bố thành phần nguy cơ trên nhãn cũng có thể dẫn tới quá liều khi bệnh nhân vẫn đang trong quá trình điều trị với tây y.

### 4. BÀN LUẬN

Mẫu placebo được tạo ra từ hỗn hợp một số chế phẩm từ dược liệu trên thị trường điều trị hoặc hỗ trợ điều trị bệnh cơ xương khớp không có chất phân tích sao cho có đủ các thành phần dược liệu mà tần suất xuất hiện trong ít nhất 25% số sản phẩm đang lưu hành trên thị trường. Việc lựa chọn các chế phẩm này sẽ mang tính đại diện cho thành phần phức tạp của mẫu chế phẩm dược liệu, đồng thời cũng đảm bảo được nguồn gốc của các dược liệu được sử dụng, do các thuốc đã lựa chọn được sản xuất bởi các công ty đạt chứng nhận GMP, được bào chế bằng các phương pháp hiện đại, có sử dụng các tá dược phổ biến. Để đảm bảo mẫu placebo không có chất phân tích, tất cả các mẫu này đều được phân tích LC-MS/MS để xác nhận sự không hiện diện 14

hợp chất phân tích.

Theo quy định, các chế phẩm không được phép có thành phần không công bố trên nhãn. Theo Dược điển Việt Nam V và theo thống kê thực tế, hầu như không có chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu được cho phép trộn dược chất tổng hợp tại Việt Nam, do vậy quy trình phát hiện các dược chất trộn trái phép chỉ cần định tính. Tuy nhiên, theo yêu cầu của nhiều bác sĩ, nhiều bệnh nhân sử dụng các chế phẩm bị nguy tạo trong thời gian dài, dẫn đến các tác dụng phụ không mong muốn, cần tính toán liều lượng để chẩn đoán nguyên nhân và lên kế hoạch điều trị tiếp theo, do vậy vẫn cần một quy trình định lượng các hợp chất này. Bên cạnh đó, việc định lượng cũng hỗ trợ việc khảo sát và thống kê tình hình nguy tạo dược chất tổng hợp trong các sản phẩm từ dược liệu đang lưu hành chính thức hoặc không chính thức trên thị trường, góp phần xây dựng chính sách quản lý các chế phẩm từ dược liệu. So với phương pháp HPLC-UV/Vis, thì việc áp dụng LC-MS/TOF [9] có hạn chế chính là chi phí do thiết bị đắt tiền, mặc dù phương pháp đặc hiệu đối với các mẫu có nền mẫu phức tạp, độ nhạy cao đối với trường hợp hàm lượng chất nguy tạo không biết rõ. 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.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã được thực hiện nhằm phát hiện sự giả mạo các dược chất tổng hợp thông qua phương pháp HPLC-UV/Vis, chủ yếu tập trung vào nhóm corticoid [5, 10]. Số lượng dược chất mà các nghiên cứu này có thể xác định đồng thời tối đa chỉ là 8 [4], hoặc là một vài loại NSAID riêng lẻ [3]. Tuy nhiên, quy trình phân tích mới đã mở rộng khả năng xác định thêm 6 dược chất có nguy cơ giả mạo, từ đó giảm thiểu số lần xử lý mẫu hoặc số lần triển khai sắc ký cũng như chi phí liên quan một cách đáng kể. Quy trình xử lý mẫu tham khảo [4], với dung môi chiết là ethyl acetat, phương pháp chiết là siêu âm và loại tạp bằng SPE, trên thực tế không phù hợp với nền mẫu dạng lỏng, theo kết quả khảo sát của hình 2A, tín hiệu thu được của PIR, MEL, ACE cực kỳ thấp, do đó quy trình cần được xem xét lại. Đối với các mẫu thể chất lỏng (dạng lỏng,

nang mềm), siêu âm không làm 2 pha lỏng - lỏng phân tán tốt vào nhau, sự tiếp xúc kém dẫn đến hiệu suất giảm. Đối với mẫu dạng hoàn mềm, thường có hàm lượng đường cao, thể chất kết dính, dẻo, cần phải được phân tán trong nước trước, nên chiết phân bố lỏng - lỏng sẽ phù hợp hơn.

Nền mẫu phức tạp, quy trình xử lý mẫu qua nhiều giai đoạn và có hiệu suất chiết không tối ưu dẫn đến sai số, do vậy, quy trình phải áp dụng phương pháp thêm. Việc thẩm định quy trình kết hợp tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác cũng góp phần khẳng định việc áp dụng phương pháp thêm đã loại trừ ảnh hưởng của nền mẫu và quy trình xử lý mẫu được tốt hơn.

## 5. KẾT LUẬN

Một quy trình phù hợp hơn với các chế phẩm từ dược liệu dạng lỏng, nang mềm, hoàn mềm đã được xây dựng và thẩm định nhằm định lượng betamethason, dexamethason base, methylprednisolon, triamcinolon, prednison, aceclofenac, dexamethason acetat, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, meloxicam, acid mefenamic, piroxicam và paracetamol. Quy trình này đáp ứng yêu cầu phân tích theo hướng dẫn AOAC (2023), với giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) đạt mức 0.16 mg/L nền mẫu đối với betamethason và piroxicam, và 0.11 mg/L nền mẫu đối với 12 dược chất còn lại. Phương pháp được thiết kế phù hợp với điều kiện thực tế tại Việt Nam, góp phần tốt hơn trong việc nhận diện các sản phẩm nguy tạo trên thị trường. Ứng dụng thực tế cho thấy quy trình này đã phát hiện hai trong số sáu chế phẩm đang lưu hành bị làm giả, chứa paracetamol và dexamethason.

## LỜI CẢM ƠN

Đây là sản phẩm khoa học công nghệ do Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh tài trợ kinh phí theo hợp đồng Thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ số 28/2022/HĐ-QKHCN ngày 12/9/2022 cho nhiệm vụ: "Xây dựng quy trình sàng lọc các dược chất giảm đau, kháng viêm bằng HPLC- PDA và khảo sát tình hình pha trộn các dược chất trong các chế phẩm từ dược liệu hỗ trợ điều trị cơ xương khớp tại Thành phố Hồ Chí Minh".

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. T. T. Tuyền, N. T. An, Đ. T. T. Hải, T. T. H., and N. T. K. Anh, "Nghiên cứu phát hiện các thuốc chống dị ứng trộn trái phép trong chế phẩm Đông dược bằng LC-MS/MS," *Tạp chí Dược học*, vol. 59, pp. 70-74, 2019.

[2] H. A. Xương and Đ. C. M. V. Thọ, "Nghiên cứu xây

dựng phương pháp định tính nhanh một số glucocorticoid nguy tạo trong thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị viêm, thấp khớp bằng kỹ thuật khối phổ," *Tạp chí Dược học*, vol. 60, pp. 74-79, 2020.

[3] B. T. Luyến, N. T. Quỳnh, and B. T. T. Châm, "Nghiên cứu xác định thuốc Diclofenac natri lẫn

trong chế phẩm đông 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", *Tạp chí khoa học và công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 187, pp. 31-37, 2018.

[4] P. V. H. Nam, L. T. Lư, and N. T. T. Linh, "Xây dựng quy trình định lượng 8 hoạt chất tân dược nguy tạo trong thuốc dược liệu điều trị giảm đau kháng viêm bằng phương pháp HPLC-PDA," *Tạp Chí Y Học Việt Nam*, vol. 527, pp. 379-384, 2023.

[5] T. T. D. Oanh, N. V. Tuyên, T. M. Hùng, and T. T. Nam, "Xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao phân tích đồng thời 6 corticoid trộn trong chế phẩm từ dược liệu," *Y học Quân sự*, 2018.

[6] Cục quản lý Dược - Bộ Y tế. *Tra cứu giấy đăng ký thuốc, nguyên liệu làm thuốc tại Việt Nam*. Available: <https://dichvucong.dav.gov.vn/congbothuoc/index>, 2020

[7] 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*. Available: <https://nghidinh15.vfa.gov.vn/>, 2024

[8] "Appendix K Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals," in *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, G. W. Latimer, Jr., Ed., 22nd ed: Oxford University Press, 2023, pp. AK- 1-AK-32.

[9] A. A. Savaliya, B. Prasad, D. K. Rajjada, and S. Singh, "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*, vol. 1, pp. 372-381, 2009/08/01 2009.

[10] N. T. Quỳnh, H. T. H. Thắm, B. T. Luyến, and H. L. N. Vinh, "Xây dựng phương pháp định tính, định lượng Dexamethason acetat trong một số chế phẩm đông dược có tác dụng hỗ trợ hoặc điều trị viêm khớp bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao," *Tạp chí khoa học và công nghệ Đại học Thái Nguyên*, vol. 188, pp. 75-81, 2018.

## Determination of 14 active pharmaceutical ingredients adulterated in liquid preparations, from medicinal herbs by HPLC-UV/VIS

Phan Van Ho Nam, Vuong Thanh Ngan, Dam To Uyen,  
Nguyen Thi Thuy Linh and Pham Van Son

### ABSTRACT

*Background: Currently in Vietnam, analytical procedures for synthetic pharmaceutical substances with a high risk of adulteration in herbal medicine products previously focused on solid preparations, which are not suitable for liquid, soft capsule, and soft pill formulations, which have a similar risk. Objectives: To develop and validate a process for quantifying betamethasone, dexamethasone base, methylprednisolone, triamcinolone, prednisone, aceclofenac, dexamethasone acetate, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, meloxicam, mefenamic acid, piroxicam and paracetamol counterfeited in herbal liquid preparations, soft capsules, and soft pills to support the treatment of musculoskeletal diseases using HPLC-UV/Vis method. Method: Chromatographic conditions included stationary phase: C18 column (250×4.6 mm; 5 μm); mobile phase: 10 mM triethylamine solution pH 3.5 - ACN (gradient); detection at 224 nm, 280 nm. The sample was extracted with ethyl acetate, and impurities were removed by SPE C18. The procedure was validated according to AOAC guidelines (2023) Results: The process meets the requirements of specific, system suitability, linear in the range of 8 - 100 ppm, accuracy, precision, the method detection limit for betamethasone and piroxicam is 0.16 mg/L sample matrix, the remaining 12 active ingredients are 0.11 mg/L sample matrix. Conclusions: A simultaneous quantitative process for 14 substances in liquid preparations, soft capsules, and soft pills from medicinal herbs has been developed, validated and applied.*

**Keywords:** adulteration, herbal, HPLC

Received: 01/3/2025

Revised: 14/3/2025

Accepted for publication: 14/3/2025