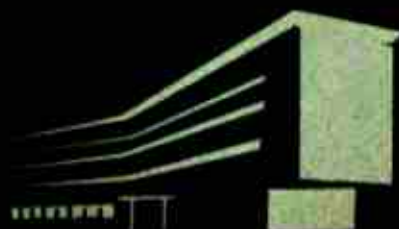


TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC HUẾ  
HUE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

Số đặc biệt, 11/2019  
November - 2019

TẠP CHÍ  
Y DƯỢC HỌC  
JOURNAL OF MEDICINE AND PHARMACY

CHÀO MỪNG KỶ NIỆM 20 NĂM THÀNH LẬP  
KHOA DƯỢC - TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC, ĐẠI HỌC HUẾ



ISSN 1859-3836

## MỤC LỤC

1.	Tổng quan về các chất ức chế poly (ADP-ribose) polymerases (PARP): Tiềm năng mới trong điều trị ung thư <i>The overview of poly (ADP-ribose) polymerases (PARP): A novel approach to cancer therapy</i>	13-18
	<i>Cao Thị Cẩm Nhung</i>	
2.	Thiết kế các dẫn chất có khả năng ức chế đồng thời phosphodiesterase-9 và beta-secretase - Hướng điều trị bệnh alzheimer <i>Design of chemical compounds with phosphodiesterase-9 and beta-secretase inhibitory activities using in silico approaches</i>	19-29
	<i>Trần Thái Sơn, Đặng Thị Thu Hiếu</i>	
3.	Nghiên cứu bào chế và bước đầu đánh giá độ ổn định của bột đông khô pha tiêm chứa tiểu phân nano artesunat <i>Formulation and stability study of injectable freeze-dried powder containing artesunate-loaded nanoparticles</i>	30-37
	<i>Hồ Hoàng Nhân, Nguyễn Ngọc Chiến</i>	
4.	Nghiên cứu ảnh hưởng của tinh bột lúa mì acetat đối với glucose máu sau ăn trên chuột béo phì đái tháo đường typ 2 <i>Study on effect of acetylated wheat starch to postprandial glycemic response in diet-induced obese type 2 diabetic mice</i>	38-43
	<i>Trương Bửu Hân, Nguyễn Ngọc Cát Anh, Chu Thị Thu Hiền, Tôn Thất Hy, Nguyễn Như Hiền, Nguyễn Hải Thủy, Trần Hữu Dũng</i>	
5.	Khảo sát ảnh hưởng của pha tĩnh và nhiệt độ cột đến sắc ký đồ dấu vân tay hoá học khi định tính đương quy ( <i>Angelica gigas</i> ) bằng phương pháp sắc ký lỏng <i>Effect of stationary phase and column temperature on fingerprinting chromatogram for qualitative analysis of marker compounds in Angelica gigas</i>	44-50
	<i>Hà Minh Hiến, Phan Lê Hiền</i>	
6.	Xây dựng quy trình sắc ký pha đảo tạo cặp ion để xác định độ tinh khiết tạp E của carvedilol <i>Purity determination of carvedilol related to compound E by ion-pair reversed-phase HPLC</i>	51-56
	<i>Nguyễn Thị Quỳnh Như, Nguyễn Hữu Tiến</i>	
7.	Nghiên cứu quy trình tổng hợp các dẫn xuất của (S)-diphenyl-4,5-dihydrooxazole từ (S)-(+)-2-phenylglycinol <i>Study on the synthesis of (S)-diphenyl-4,5-dihydrooxazole derivatives from (S)-(+)-2-phenylglycinol</i>	57-62
	<i>Lê Thị Loan Chi</i>	
8.	Đánh giá thực trạng sử dụng thuốc trên bệnh nhân cao tuổi theo tiêu chuẩn STOPP/START tại Bệnh viện Đại học Y Dược Huế <i>Evaluation of potentially inappropriate prescribing among hospitalized geriatric patients using the STOPP/START criteria at Hue University Hospital</i>	63-72
	<i>Phan Động Thục Anh, Nguyễn Thị Thảo Uyên</i>	
9.	Khảo sát việc sử dụng kháng sinh theo giá trị procalcitonin trên bệnh nhân nhiễm khuẩn hô hấp dưới tại Trung tâm Điều trị theo yêu cầu và Quốc tế - Bệnh viện Trung ương Huế <i>Survey of procalcitonin-guided antibiotic use in patients with lower respiratory tract infections at The International Medical Center of Hue Center Hospital</i>	73-78
	<i>Trần Phạm Thức, Trần Đình Bình, Võ Thị Hà</i>	

10.	Nghiên cứu sự hài lòng của khách hàng về chất lượng dịch vụ dược tại một số nhà thuốc trên địa bàn thành phố Huế <i>Study on customer satisfaction with quality of pharmacy services at some pharmacies in Hue city</i>	79-87
	Ngô Thị Thu Hằng, Tăng Thị Trâm	
11.	Quan điểm của người dân về lựa chọn cơ sở chăm sóc sức khỏe và vai trò của nhà thuốc cộng đồng tại thành phố Huế <i>Resident perspectives on choice in healthcare and the role of community pharmacies in Hue city</i>	88-97
	Hoàng Thảo Nghi, Nguyễn Phước Bích Ngọc, Lê Văn Quang	
12.	Đánh giá thực trạng sử dụng thuốc cho phụ nữ có thai tại Bệnh viện Đại học Y Dược Huế <i>Evaluation of drug utilisation in outpatient prescriptions in Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital</i>	98-106
	Võ Thị Hồng Phượng, Nguyễn Thị Thủy Linh	
13.	Tìm hiểu một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động cung ứng thuốc tại các trạm y tế xã thuộc huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế năm 2017 <i>Study on factors influencing medicines supply in commune health stations in Quang Dien district in 2017</i>	107-113
	Lưu Nguyễn Nguyệt Trâm, Trương Thị Thanh Thương, Phạm Công Quang, Lê Hoà	
14.	Thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài húng quế ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) trồng tại Huế <i>Chemical constituents and biological activities of Ocimum basilicum collected in Hue city</i>	114-120
	Nguyễn Khánh Thủy Linh, Lê Thị Thu Hà	
15.	Hàm lượng phenolic tổng, flavonoid tổng và tinh dầu trong các bộ phận cây Ngũ trảo ( <i>Vitex negundo</i> L., họ Verbenaceae) thu hái tại Thừa Thiên Huế <i>Total phenolic content, total flavonoid content and essential oil content of plant parts of Vitex negundo L., (Verbenaceae) collected in Thua Thien Hue</i>	121-126
	Đoàn Thị Ái Nghĩa, Hồ Xuân Lâm	
16.	Hoạt tính kháng viêm và thành phần hóa học của cao n-hexane từ cây cúc áo hoa vàng ( <i>Spilanthes acmella</i> Murr.) <i>Anti-inflammatory activity and chemical constituents of n-hexane extract from Spilanthes acmella Murr.</i>	127-134
	Nguyễn Đức Nhân, Đặng Ngọc Huệ, Nguyễn Thành Quốc, Nguyễn Thị Tú Nhi, Huỳnh Liên Hương, Nguyễn Kim Minh Tâm, Lê Xuân Tiến	
17.	Bào chế trà hòa tan rau má ( <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb. - Apiaceae) trồng tại xã Quảng Thọ, Quảng Điền, Thừa Thiên Huế bằng phương pháp tạo hạt tầng sôi ở quy mô pilot <i>Preparation of soluble tea from Centella asiatica (L.) Urb. - Apiaceae planted in Quang Tho commune, Quang Dien district, Thua Thien Hue province by using fluid bed granulation method in pilot scale</i>	135-140
	Đặng Thị Phương Linh, Lương Văn Dũng	
18.	Nghiên cứu bào chế gel chứa acid Azelaic <i>Research on preparation of gel containing Azelaic acid</i>	141-147
	Lê Thị Thanh Ngọc, Nguyễn Thị Thúy Vân	
19.	Nghiên cứu bào chế kem chứa dịch chiết lá cây Ngũ trảo ( <i>Vitex negundo</i> L. - Verbenaceae) trồng tại Thừa Thiên Huế <i>Preparation and characterization of cream containing Vitex negundo L. leaf extract in Thua Thien Hue province</i>	148-156
	Lê Thị Minh Nguyệt, Lê Thị Xanh	

20.	Xây dựng quy trình định lượng một số chất ức chế phosphodiesterase 5 trên lần trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao <i>Determination of phosphodiesterase 5 inhibitors in herbal products by high performance liquid chromatography</i>	157-162
	<i>Đào Thị Cẩm Minh, Hà Thủy Tiên, Thái Khoa Bảo Châu</i>	
21.	Bán tổng hợp và đánh giá tác động ức chế enzym acetylcholinesterase của một số dẫn chất diosmetin <i>Semi-synthesis and evaluation of anti-acetylcholinesterase activity of some diosmetin derivatives</i>	163-168
	<i>Lê Duy Phúc, Trần Thế Thuận</i>	
22.	Nghiên cứu tình hình sử dụng kháng sinh, đề kháng kháng sinh và các yếu tố liên quan tại Khoa Hồi sức tích cực - Bệnh viện Trung ương Huế năm 2018 <i>The situation of antibiotic use, antibiotic resistance and factors that related to antibiotic resistance in patients of Intensive Care Unit in Hue Central Hospital in 2018</i>	169-176
	<i>Hồ Thị Họa Mi, Trần Đình Bình</i>	
23.	Đông trùng hạ thảo <i>Cordyceps</i> SP: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và một số kết quả nghiên cứu về chiết xuất hoạt chất <i>Cordyceps</i> SP: <i>Biological characteristics, medicinal value and compound extraction process</i>	177-187
	<i>Phạm Thị Hải Hà, Nguyễn Văn Thủy, Nguyễn Ngọc Quý, Thân Thị Minh Phương, Chu Đình Liệu, Lê Văn Thanh, Nguyễn Tường Vân, Bạch Long Giang, Mai Huỳnh Cang</i>	
24.	Đảng sâm <i>Condonopsis javanica</i> (Blume) Hook. f. & Thomson: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và một số kết quả nghiên cứu về quy trình chiết xuất hoạt chất <i>Condonopsis javanica</i> (Blume) Hook. f. & Thomson: <i>Biological characteristics, medicinal value and compound extraction process</i>	188-194
	<i>Phạm Thị Hải Hà, Nguyễn Văn Thủy, Nguyễn Ngọc Quý, Mai Huỳnh Cang, Thân Thị Minh Phương, Chu Đình Liệu, Lê Văn Thanh, Bạch Long Giang</i>	

# XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ CHẤT ỨNG CHẾ PHOSPHODIESTERASE-5 TRỘN LẤN TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Đào Thị Cẩm Minh, Hồ Thủy Tiên, Thái Khoa Bảo Châu  
Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Hiện nay, một số chất ức chế men Phosphodiesterase-5 (PDE-5) thường trộn lẫn trong chế phẩm đông dược hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương. Do đó, mục tiêu của đề tài là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng vardenafil, sildenafil và tadalafil trộn lẫn trong các chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 3 chất chuẩn vardenafil, sildenafil, tadalafil với nền mẫu dựa trên bài thuốc "Hoàn sâm nhung bổ thận" có tác dụng bổ thận tráng dương. Khảo sát các điều kiện sắc ký và thẩm định phương pháp theo AOAC và ICH. **Kết quả:** Quy trình định lượng được thực hiện trên hệ thống HPLC Shimadzu LC-20A series 2000-DAD detector, cột C18 (4,6 x150 mm, 5 µm) với pha động là hỗn hợp acetonitrile (A) và H<sub>2</sub>O (acid formic 0,1%) (B) (v/v) theo chương trình gradient; tốc độ dòng 0,8 ml/phút; nhiệt độ cột 40 °C. Phương pháp đạt yêu cầu phân tích với độ đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện của vardenafil, sildenafil và tadalafil lần lượt là 0,024, 0,054 và 0,135 µg/ml. **Kết luận:** Đề tài đã phát hiện được 5 mẫu dương tính trong số 40 mẫu thu thập được trên thị trường.

**Từ khóa:** Chất ức chế PDE-5; high performance liquid chromatography (HPLC); chế phẩm đông dược.

## Abstract

### DETERMINATION OF PHOSPHODIESTERASE-5 INHIBITORS IN HERBAL PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Dao Thi Cam Minh, Ho Thuy Tien, Thai Khoa Bao Chau  
Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

**Background:** There have been a number of reports of herbal products and dietary supplements for treating erectile dysfunction (ED) containing illegal adulteration of phosphodiesterase-5 inhibitors. In this research, our main aim was to develop and validate a simultaneous quantification process for vardenafil, sildenafil and tadalafil in herbal products using the high performance liquid chromatography (HPLC) method.

**Materials and method:** Standards of vardenafil, sildenafil, tadalafil and matrix based on an oriental medicine named "Hoan sam nhung bo than" for treating ED. Developing and validating a method according to AOAC and ICH guidelines. **Results:** The process was developed using HPLC SHIMADZU LC-20A series 2000-PAD detector system on a C18 HyPURITY (4.6 x150 mm, 5 µm) column, thermostated at 40°C. The mobile phase consisted of acetonitril (A) and water with 0.1% formic acid (B) (v/v) with the gradient elution. This method achieved good selectivity and the limit of detection of vardenafil, sildenafil and tadalafil were 0.024, 0.054 and 0.135 µg/ml, respectively. **Conclusion:** The process has detected 5 positive samples out of 40 samples being sold on the market.

**Key words:** Phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors; high performance liquid chromatography (HPLC); herbal products.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Thời gian gần đây, nhiều trường hợp trộn trái phép các tân dược ức chế PDE-5 như vardenafil, sildenafil và tadalafil trong các chế phẩm có nguồn gốc thảo dược có tác dụng hỗ trợ, điều trị các bệnh

lý về rối loạn cương dương được phát hiện. Hiện nay, đã có một số công bố sử dụng các phương pháp phân tích hiện đại để phát hiện các chất ức chế PDE-5 trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược như HPLC, sắc ký lớp mỏng, sắc ký

lồng-khối phổi, cộng hưởng từ hạt nhân... [3], [5], [6], [7]. Tuy nhiên, các công bố tại Việt Nam còn khá ít với một số phát hiện đơn lẻ trên sildenafil, mà còn thiếu các phát hiện đối với vardenafil và tadalafil trong đồng dược.

Vì vậy, đề tài được tiến hành với mục tiêu xây dựng và thẩm định quy trình định lượng vardenafil, sildenafil và tadalafil trộn trái phép trong các chế phẩm đồng dược bằng phương pháp HPLC nhằm phát hiện các tân dược trên trộn trái phép trong các chế phẩm đang lưu hành tại Việt Nam.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chất chuẩn: Vardenafil hydroclorid (CAS Number: 330808-88-3) theo tiêu chuẩn chất lượng Châu Âu, sildenafil citrat (số lô WS.0316265.03) và tadalafil hydroclorid (số lô WS. 0215264.02) của viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương. Thiết bị: Máy HPLC SHIMADZU LC-20A series 2000- detector DAD. Cột pha tĩnh: HyPURITY C18 (4,6 x150mm, 5  $\mu$ m).

Nền mẫu: Xây dựng nền mẫu có thành phần dựa trên bài thuốc *Hoàn sâm nhung bổ thận trong Dược điển Việt Nam V* gồm 23 vị dược liệu: Ba kích, hà thủ ô chế, bách hợp, nhân sâm, bạch linh, nhục thung dung, bạch truật, nhung hươu, cam thảo, hạt sen, cao ban long, đương quy, thỏ ty tử, câu kỷ tử, thực địa, cấu tích, trạch tả, củ mài, tục đoạn, đảng sâm, xuyên khung, đỗ trọng, viễn chí [1].

Các chế phẩm đồng dược: Thuốc đồng y, thực phẩm chức năng dạng viên hoàn, viên nén, viên nang có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, bổ thận, tăng cường sinh lực lưu hành trên thị trường.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình định lượng: Khảo sát quy trình xử lý mẫu gồm 3 dung môi chiết: Methanol 100%, methanol-nước (70:30) (v/v), acetonitril-nước (acid formic 0,1%) (50:50) (v/v) [3], [5], [6], [7]; thời gian siêu âm: 10 phút, 20 phút, 30 phút nhằm đạt hiệu suất chiết 3 dược chất nghiên cứu là cao nhất. Khảo sát điều kiện sắc ký gồm khảo sát pha động, tốc độ dòng, bước sóng phát hiện.

thể hiện ở bảng 1.

Thẩm định quy trình định lượng theo ICH [4] và AOAC [2]. Áp dụng phương pháp định lượng trên một số chế phẩm đồng dược thu thập được trên thị trường.

## 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu: Cân 0,5 g nền mẫu, chiết với 25 ml dung môi chiết, lắc xoáy rồi siêu âm, dung dịch thu được ly tâm trong 5 phút (6000 vòng/phút) lọc qua màng 0,45  $\mu$ m, dịch thu được pha loãng rồi đem chạy sắc ký.

Khảo sát 3 dung môi chiết: methanol 100%, methanol-nước (70:30), acetonitril-nước (acid formic 0,1%) (50:50), kết quả methanol cho hiệu suất chiết cao hơn 2 dung môi còn lại.

Khảo sát 3 khoảng thời gian siêu âm: 10 phút, 20 phút và 30 phút, kết quả siêu âm trong 20 phút cho hiệu suất cao hơn và ít tạp lẫn hơn 2 khoảng thời gian còn lại.

Từ đó, lựa chọn quy trình xử lý mẫu như sau: Cân 0,5 g nền mẫu, chiết với 25 ml dung dịch methanol, lắc xoáy rồi siêu âm, dung dịch thu được ly tâm trong 20 phút (6000 vòng/phút) lọc qua màng 0,45  $\mu$ m, dịch thu được pha loãng rồi đem chạy sắc ký.

### 3.2. Xây dựng quy trình định lượng

Qua quá trình khảo sát, xây dựng quy trình định lượng đồng thời vardenafil, sildenafil và tadalafil trong nền mẫu với các điều kiện tiến hành như sau:

Cột pha tĩnh: HyPURITY C18 (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m).

Pha động: Acetonitril: nước (acid formic 0,1%) (v/v) theo chương trình gradient như sau: 0-8 phút, 20 - 90% A; 8-10 phút, 90% A; 10-13 phút, 90 - 20%; 13 - 17 phút, 20% A.

Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút. Nhiệt độ cột: 40  $^{\circ}$ C.

Bước sóng phát hiện: vardenafil: 225 nm, sildenafil: 293 nm, tadalafil: 284 nm.

### 3.3. Thẩm định phương pháp:

#### 3.3.1. Tính thích hợp hệ thống

Tiến hành tiêm sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn chứa hỗn hợp vardenafil 20  $\mu$ g/ml, sildenafil 100  $\mu$ g/ml và tadalafil 20  $\mu$ g/ml vào hệ thống HPLC với các điều kiện đã tối ưu hóa ở trên. Kết quả được

**Bảng 1.** Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

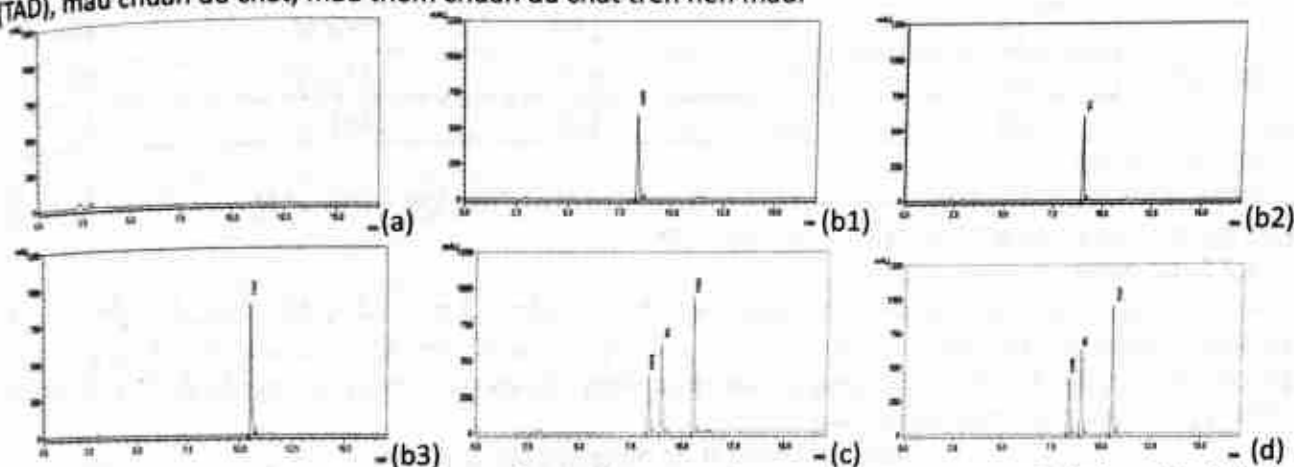
Lần tiêm mẫu	Vardenafil			Sildenafil			Tadalafil		
	R <sub>t</sub> (phút)	Speak (mAU. phút)	N	R <sub>t</sub> (phút)	Speak (mAU. phút)	N	R <sub>t</sub> (phút)	Speak (mAU. phút)	N
1	8,507	1885351	59304	9,035	4094260	35535	10,592	1008020	79037

2	8,426	1916449	58264	8,974	4153121	36498	10,541	1024475	80306
3	8,429	1893009	58935	8,977	4107062	35586	10,547	1012057	78718
4	8,433	1897733	58432	8,979	4119011	36197	10,549	1014362	79899
5	8,441	1900897	59213	8,987	4112244	35413	10,555	1009876	79018
6	8,431	1876422	58933	8,978	4108097	35661	10,546	1011603	78882
TB	8,445	1894977	58847	8,988	4115633	35815	10,555	1013399	79310
RSD %	0,368	0,725	0,709	0,259	0,488	1,203	0,177	0,575	0,804

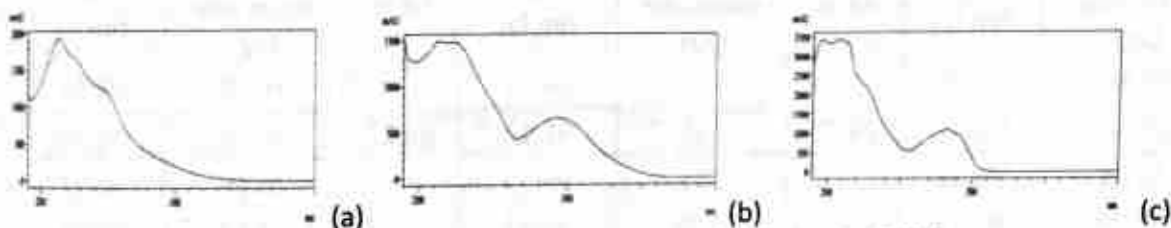
**Nhận xét:** RSD% (< 2%), số đĩa lý thuyết (N > 2000) cho thấy hệ thống và các điều kiện sắc ký đã chọn là tương thích cho việc phân tích định lượng đồng thời vardenafil, sildenafil và tadalafil trộn lẫn trong các chế phẩm đông dược.

### 3.3.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc kí các mẫu: nền mẫu, mẫu chuẩn đơn chất của vardenafil (VAR), sildenafil (SIL) và tadalafil (TAD), mẫu chuẩn đa chất, mẫu thêm chuẩn đa chất trên nền mẫu.



Hình 1: Sắc kí đồ các mẫu: Nền mẫu (a); mẫu chuẩn đơn chất vardenafil (b1), sildenafil (b2), tadalafil (b3); mẫu chuẩn đa chất (c); mẫu chuẩn đa chất trên nền mẫu (d).



Hình 2: Phổ UV của vardenafil (a), sildenafil (b) và tadalafil (c)

**Nhận xét:** Trong mỗi mẫu chuẩn đơn chất xuất hiện các peak của vardenafil, sildenafil và tadalafil tại các khoảng thời gian lưu lần lượt là 8,378 phút, 8,981 phút và 10,55 phút. Trong mẫu trắng, sắc ký đồ không có sự xuất hiện peak tại các khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của vardenafil, sildenafil và tadalafil. Trong mẫu chuẩn đa chất, sắc ký đồ xuất hiện 3 peak tại các khoảng thời gian tương ứng với thời gian lưu của vardenafil, sildenafil và tadalafil ở các mẫu chuẩn đơn chất. Trong mẫu chuẩn đa chất trên nền mẫu có các peak rõ nét của vardenafil, sildenafil và tadalafil trùng với thời gian lưu tương ứng của các chất này trong mẫu chuẩn đơn chất. Do đó, độ đặc hiệu của phương pháp cao.

### 3.3.3. Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính với từng chất lần lượt là: Vardenafil: 5-35 µg/ml, sildenafil: 25-175 µg/ml, tadalafil: 5-35 µg/ml. Xây dựng đường biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak tương ứng được phương trình hồi quy của vardenafil:  $y = 95568x - 256005$  ( $R^2 = 0,997$ ), sildenafil:  $y = 42150x - 199507$  ( $R^2 = 0,997$ ), tadalafil:  $y = 52345x - 52314$  ( $R^2 = 0,998$ ). Các hệ số tương quan  $R^2$  đều > 0,99, cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ hoạt chất và diện tích peak đáp ứng [2].

### 3.3.4. Độ chính xác

Độ chính xác trong ngày được xác định bằng cách sắc ký 3 mẫu thử độc lập của cùng một nồng độ:

Nồng độ thấp, nồng độ trung bình, nồng độ cao. Phân tích lặp lại các kết quả trên vào ngày khác để xác định độ chính xác khác ngày. Yêu cầu: RSD ≤ 5,3%, riêng đối với mức nồng độ cao của sildenafil yêu cầu RSD ≤ 3,7%, với mức nồng độ thấp của vardenafil và tadalafil yêu cầu RSD ≤ 7,3% [2]. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2.** Khảo sát độ chính xác của phương pháp

	Nồng độ (µg/ml)	Trong ngày		Khác ngày	
		S <sub>mean</sub> (mAU.phút)	RSD %	S <sub>mean</sub> (mAU.phút)	RSD %
Vardenafil	10	903298	0,27	933740	0,58
	20	1913689	1,05	2083300	1,07
	30	2837704	2,32	2882481	2,76
Sildenafil	50	2187127	1,31	2285880	1,26
	100	4454511	1,66	4587388	2,23
	150	6346620	0,49	6435377	1,41
Tadalafil	10	503759	2,06	508681	2,28
	20	1026041	0,70	1121669	2,80
	30	1536671	1,70	1467163	2,46

m\*: hàm lượng

**Nhận xét:** Kết quả thể hiện độ chính xác trong ngày và khác ngày của 3 chất phân tích đều có RSD < 3%. Độ chính xác của phương pháp đạt yêu cầu của AOAC.

### 3.3.5. Độ đúng

Độ đúng (độ thu hồi) được xác định bằng cách thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ: Nồng độ thấp, nồng độ trung bình, nồng độ cao. Phân tích lặp lại 3 lần ở mỗi mức nồng độ trên nền mẫu viên *Sâm Nhung bổ thận*. Yêu cầu: Độ thu hồi đạt 90-107%, riêng đối với mức nồng độ cao của sildenafil, yêu cầu độ thu hồi đạt 95-105% [2]. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

**Bảng 3.** Khảo sát độ đúng của phương pháp

Vardenafil			Sildenafil			Tadalafil		
m* thêm vào (µg)	% tìm lại	TB %	m* thêm vào (µg)	% tìm lại	TB %	m* thêm vào (µg)	% tìm lại	TB
26,64	99,64	99,79	135	98,15	98,27	26,96	98,84	97,74
26,64	100,06		135	97,12		26,96	95,48	
26,64	99,66		135	99,55		26,96	98,91	
53,28	99,16	98,09	270	96,34	97,55	53,93	98,92	98,16
53,28	97,81		270	96,96		53,93	97,95	
53,28	97,32		270	99,34		53,93	97,62	
76,96	99,95	98,43	378	98,51	98,53	80,88	98,21	97,58
76,96	99,40		378	98,07		80,88	98,81	
76,96	95,93		378	99,02		80,88	95,71	

**Nhận xét:** Độ thu hồi của các chất phân tích dao động trong khoảng 97,55 - 99,79%. Độ đúng của phương pháp đạt yêu cầu của AOAC.

### 3.3.6. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Chuẩn bị và tiến hành phân tích các mẫu chứa vardenafil, sildenafil và tadalafil có nồng độ giảm dần. Giá trị LOD, LOQ được xác định bằng tỷ số tín hiệu/nhiều nền (S/N). LOD là nồng độ mà tại đó S/N

= 3, LOQ là nồng độ mà tại đó S/N = 10 [2], [4].

LOD của vardenafil, sildenafil và tadalafil lần lượt là 0,024; 0,054 và 0,135 µg/ml.

LOQ của vardenafil, sildenafil và tadalafil lần lượt là 0,079; 0,178 và 0,445 µg/ml.

### 3.4. Ứng dụng phương pháp định lượng trên một số chế phẩm đông dược

Tiến hành thu thập 40 mẫu chế phẩm đông dược với các dạng bào chế: viên hoàn (4 mẫu), viên nén (2



mẫu), viên nang (34 mẫu). Các chế phẩm này có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh lý liệt dương, kể như: tăng cường sinh lý đang lưu hành tại Việt Nam từ các nguồn khác nhau trên thị trường: nhà thuốc, qua internet, lương y... Áp dụng phương pháp đã xây dựng để phân tích 40 mẫu thu thập được, đã phát hiện 05 mẫu có sự pha trộn với vardenafil, sildenafil và tadalafil với các hàm lượng được thể hiện ở bảng 4.

**Bảng 4.** Hàm lượng các mẫu thực dương tính

Mẫu thử	Vardenafil		Sildenafil		Tadalafil	
	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng (mg/liều)	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng (mg/liều)	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng (mg/liều)
VNP03	-	-	140,79	75,18	-	-
VNP04	16,67	7,60	-	-	5,11	2,33
VNP09	-	-	117,25	55,58	21,2	10,05
VNP15	-	-	110,43	54,33	23,42	11,52
VNP24	-	-	152,43	71,03	16,27	7,58

#### 4. BÀN LUẬN

Đối với nền mẫu chế phẩm đông dược phức tạp chứa nhiều thành phần dược liệu, việc phát hiện vardenafil, sildenafil và tadalafil trộn trái phép yêu cầu quy trình xử lý thích hợp và loại bỏ nhiều tạp chất. Đề tài này đã sử dụng ether dầu hỏa để loại bỏ nhiều tạp dược liệu liên quan, giảm nhiễu trong quá trình phân tích cũng như làm giảm tuổi thọ của cột, tạo thuận lợi cho quá trình phân tách, định lượng bằng phương pháp HPLC. Nghiên cứu đã tối ưu hóa được các điều kiện sắc ký, thẩm định được quy trình với tính đặc hiệu cao và có giới hạn phát hiện thấp hơn nghiên cứu của Nickum E.A [7] và các tiêu chí: tính thích hợp hệ thống, độ đúng, độ chính xác, khoảng tuyến tính đạt yêu cầu của AOAC [2].

Áp dụng phương pháp phát hiện được 5/40 chiếm 12,5% mẫu có trộn các chất ức chế PDE-5, 1/40 mẫu dương tính với vardenafil, 4/40 mẫu dương tính với sildenafil và 4/40 mẫu dương tính với tadalafil. Đặc biệt phát hiện được 4/40 chiếm 10% mẫu trộn đồng thời cả 2 hoạt chất. Theo Martidale 2009, liều điều trị rối loạn cương dương của sildenafil là 50 mg, của vardenafil và tadalafil là 10 mg, trong khi đó, có những mẫu dương tính có hàm lượng PDE-5 trộn lẫn có liều vượt quá liều điều trị của sildenafil: VNPO3, VNPO9, VNP15, VNP24; tadalafil: VNPO9 và VNP15, thậm chí có những mẫu trộn cả 2 hoạt chất

đều vượt quá liều điều trị: VNPO9 và VNP15. Việc sử dụng quá liều điều trị có thể sẽ gây nên những tác dụng không mong muốn, ảnh hưởng nghiêm trọng sức khỏe đến người sử dụng. Từ đó, có thể thấy rằng tình trạng trộn trái phép các chất ức chế PDE-5 trong các chế phẩm đông dược đang là một vấn đề đáng báo động. Do đó việc kiểm soát chất lượng các chế phẩm đông dược đang lưu hành trên thị trường một cách chặt chẽ là rất cần thiết nhằm đảm bảo sức khỏe cộng đồng cũng như bảo vệ uy tín của các cơ sở sản xuất thuốc đông dược.

#### 5. KẾT LUẬN

Xây dựng được quy trình định lượng đồng thời vardenafil, sildenafil và tadalafil trong chế phẩm đông dược bằng HPLC, pha động là hỗn hợp acetonitrile (A) và nước (acid formic 0,1%) (B) theo chương trình gradient. Phương pháp phân tích được đánh giá thẩm định có tính đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện của vardenafil, sildenafil và tadalafil lần lượt là 0,024; 0,054; và 0,135 µg/ml, đạt yêu cầu theo AOAC. Phương pháp đã phát hiện 05 trong 40 mẫu thực có dương tính với 3 chất, đặc biệt có 4 mẫu dương tính đồng thời 2 hoạt chất. Như vậy, phương pháp có ý nghĩa thực tiễn, đánh giá được sơ bộ tình trạng trộn lẫn, khuyến cáo nguy cơ sức khỏe đối với người tiêu dùng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, tr. 1424-1425.
2. AOAC Official Methods of Analysis (2016), *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F. pp. 1-18.
3. Cai Y., Cai T.-G., Shi Y., Cheng X.-L., Ma L.-Y., Ma S.-C., Lin R.-C., Feng W. (2010), "Simultaneous determination of eight PDES-IS potentially adulterated in herbal dietary supplements with TLC and HPLC-PDA-MS methods", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*,

33 (13), pp. 1287-1306.

4. International Conference on Harmonisation (2005). "Validation of analytical procedures: Text and methodology", ICH Secretariat, pp. 1-17.

5. Lee E.-S., Lee J.H., Han K.M., Kim J.W., Hwang I.S., Cho S., Han S.Y., Kim J. (2013). "Simultaneous determination of 38 phosphodiesterase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry", *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, pp. 171-178.

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-ionization mass spectrometry, infrared electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, pp. 491-496.

7. Nickum E.A., Flurer C.L. (2014). "Determination of phosphodiesterase-5 inhibitors and analogs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection", *Journal of chromatographic science*, 53 (1), pp. 38-46.