

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thị Oanh

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ CHẤT CẤM
TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE
HỖ TRỢ GIẢM CÂN, CHỨC NĂNG SINH LÝ VÀ
TIÊU ĐƯỜNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

HÀ NỘI - 2024

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thị Oanh

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ CHẤT CẤM
TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE
HỖ TRỢ GIẢM CÂN, CHỨC NĂNG SINH LÝ VÀ
TIÊU ĐƯỜNG

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9440112.03

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS.TS. Lê Thị Hồng Hảo
- PGS.TS. Nguyễn Thị Ánh Hương

Hà Nội - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Lê Thị Hồng Hào và PGS.TS. Nguyễn Thị Ánh Hương. Các số liệu và kết quả thu được trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2024
Tác giả luận án

Nguyễn Thị Oanh

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành với sự hỗ trợ, giúp đỡ, động viên của các Thầy Cô, gia đình và bạn bè, đồng nghiệp.

Với tình cảm chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PSG.TS. Lê Thị Hồng Hảo và PGS.TS. Nguyễn Thị Ánh Hương đã nhiệt tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các Thầy cô trong Bộ môn Hóa Phân tích, Khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã tâm huyết truyền dạy kiến thức và động viên tôi trong thời gian học tập, nghiên cứu tại đây.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ một phần kinh phí thực hiện từ đề tài mã số 104.04-2021.38 của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED). Tôi xin cảm ơn các bạn trong nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia đã phối hợp và hỗ trợ tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè cùng các đồng nghiệp trong Cục An toàn thực phẩm, Cục Dân số - Bộ Y tế đã ủng hộ, giúp đỡ, động viên tôi trong cả quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Oanh

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC BẢNG	6
DANH MỤC HÌNH.....	8
MỞ ĐẦU	10
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	14
1.1. Giới thiệu chung về chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.....	14
1.2. Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý.....	16
1.2.1. Các chất ức chế phosphodiesterase type 5.....	17
1.2.2. Các chất tương tự thuốc ức chế phosphodiesterase type 5	19
1.2.3. Cơ chế tác dụng và chỉ định của các chất PDE-5i.....	21
1.2.4. Tình trạng sử dụng nhóm chất cấm PDE-5i trong TPBVSK.....	22
1.3. Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân	24
1.3.1. Nhóm hoạt chất nhuận tràng (laxatives)	25
1.3.2. Nhóm chất ức chế sự thèm ăn.....	26
1.3.3. Phenylpiperidine và dẫn xuất.....	27
1.3.4. Sibutramin và dẫn xuất.....	27
1.3.5. Tình trạng sử dụng chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân	30
1.4. Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường	32
1.4.1. Nhóm hoạt chất biguanid	33
1.4.2. Nhóm hoạt chất sulfonylureas	34
1.4.3. Tình trạng sử dụng các chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường	37
1.5. Các phương pháp xác định chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.....	38
1.5.1. Phương pháp điện hóa.....	38
1.5.2. Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử.....	39
1.5.3. Phương pháp điện di mao quản.....	41
1.5.4. Phương pháp sắc ký.....	46

1.6. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ.....	53
1.6.1. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HR/MS).....	53
1.6.2. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS)	58
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM.....	62
2.1. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất, chất chuẩn	62
2.1.1. Thiết bị và dụng cụ	62
2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn.....	63
2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	68
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	68
2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu.....	68
2.2.3. Phương pháp phân tích	72
2.2.4. Thẩm định phương pháp.....	76
2.2.5. Phân tích mẫu thực.....	79
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu.....	80
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	81
3.1. Xây dựng quy trình LC-HR/MS sàng lọc một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường	81
3.1.1. Khảo sát điều kiện HR/MS phân tích chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.....	81
3.1.2. Điều kiện sắc ký lỏng phân tích chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường	97
3.1.3. Thẩm định phương pháp LC-HR/MS sàng lọc một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.....	103
3.1.4. Sàng lọc các chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường trong mẫu TPBVSK.....	105
3.2. Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý	109
3.2.1. Điều kiện LC-MS/MS.....	109
3.2.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu phân tích các chất nhóm hỗ trợ sinh lý.....	111

3.2.3.	<i>Thẩm định phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý bằng LC-MS/MS</i>	114
3.2.4.	<i>Phân tích các chất nhóm hỗ trợ sinh lý trong mẫu TPBVSK</i>	119
3.3.	Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân	121
3.3.1.	<i>Khảo sát điều kiện LC-MS/MS</i>	121
3.3.2.	<i>Khảo sát quy trình xử lý mẫu phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ giảm cân</i>	126
3.3.3.	<i>Thẩm định phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ giảm cân bằng LC-MS/MS</i>	129
3.3.4.	<i>Phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK</i>	133
3.4.	Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường	134
3.4.1.	<i>Khảo sát các điều kiện LC-MS/MS</i>	134
3.4.2.	<i>Khảo sát quy trình xử lý mẫu phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường</i>	136
3.4.3.	<i>Thẩm định phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường bằng LC-MS/MS</i>	139
3.4.4.	<i>Phân tích các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trong mẫu TPBVSK</i>	141
KẾT LUẬN	143
TÀI LIỆU THAM KHẢO	146
PHỤ LỤC	162

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Thuật ngữ tiếng Anh	Thuật ngữ tiếng Việt
AOAC	Association Of Official Analytical Collaboration International	Hiệp hội hợp tác phân tích chính thức
CE	Capillary Electrophoresis	Phương pháp điện di mao quản
CZE	Capillary zone electrophoresis	Phương pháp điện di mao quản vùng
DAD	Diode-Array Detector	Detector mảng diot
EMS	Electrospray mass spectrometry	Khối phổ phun điện tử
ESI	Electrospray ionization	Ion hoá phun điện tử
EU	European Union	Liên minh Châu Âu
FID	Flame ionization detector	Detector ion hoá ngọn lửa
FDA	Food and Drug Administration	Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ
FLD	Fluorescence detector	Detector huỳnh quang
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance	Cộng hưởng ion cyclotron biến đổi kiểu Fourier
GC	Gas chromatography	Sắc ký khí
HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HPTLC	High-performance thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao
HR/MS	High resolution mass spectrometry	Khối phổ phân giải cao
ID	Internal diameter	Đường kính trong
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Liên minh Quốc tế về Hóa học cơ bản và Hóa học ứng dụng
MDL	Method Detection Limit	Giới hạn phát hiện của phương pháp
MS	Mass spectrometer	Khối phổ

MQL	Method Quantification Limit	Giới hạn định lượng của phương pháp
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	Sắc ký lỏng khối phổ hai lần
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantification	Giới hạn định lượng
LTQ Orbitrap	Linear Trap Quadropole (LTQ) Orbitrap	Bẫy tuyến tính tứ cực
PDA	Photodiode array detector	Detector mảng diod quang
PDE-5i	Phosphodiesterase type-5 inhibitor	Chất ức chế Phosphodiesterase type 5
R	Recovery	Độ thu hồi
R _P	Reversed phase	Pha đảo
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
RT	Retention Time	Thời gian lưu
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SPE	Solid phase extraction	Phương pháp chiết pha rắn
TCVN	Vietnamese Standards	Tiêu chuẩn Việt Nam
TMP	Turbo molecular pump	Máy bơm turbo phân tử
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TOF	Time of flight	Thời gian bay
TOF-MS	Time of flight mass spectrometry	Khối phổ thời gian bay
TPBVSK	Health Supplement, Dietary Supplement	Thực phẩm bảo vệ sức khỏe
UV-Vis	Ultraviolet - visible	Tử ngoại - khả kiến

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các chất phân tích thuộc nhóm chất cấm trong thông tư 10/2021/TT-BYT ...	15
Bảng 1.2. Một số thông tin chung của các thuốc PDE-5i	17
Bảng 1.3. Các chất tương tự thuốc PDE-5i đã được phát hiện	19
Bảng 1.4. Cấu tạo, tính chất lý hoá của một số chất nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân ..	28
Bảng 1.5. Cấu tạo, tính chất lý hoá của một số chất nhóm chất cấm hỗ trợ tiêu đường	35
Bảng 1.6. Tóm tắt một số nghiên cứu xác định các chất cấm bằng phương pháp quang phổ ..	40
Bảng 1.7. Tóm tắt một số nghiên cứu xác định các chất cấm bằng phương pháp điện di mao quản	41
Bảng 1.8. Tóm tắt một số nghiên cứu xác định các chất cấm bằng phương pháp sắc ký...	47
Bảng 2.1. Các chất phân tích nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý được sử dụng trong nghiên cứu	63
Bảng 2.2. Quy trình làm sạch mẫu TPBVSK với nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân .	71
Bảng 2.3. Thông tin nền mẫu trắng của các nhóm chất cấm trong nghiên cứu	76
Bảng 2.4. Đánh giá tính chọn lọc của phương pháp định tính.....	77
Bảng 3.1. Kết quả khảo sát mảnh phổ ion mẹ và ion con của các chất cấm.....	82
Bảng 3.2. Các mảnh phổ lý thuyết của ion mẹ và ion con của chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý còn lại	92
Bảng 3.3. Chương trình gradient tối ưu phân tích các chất cấm.....	100
Bảng 3.4. Thời gian lưu của các chất cấm	100
Bảng 3.5. Giới hạn phát hiện của các chất cấm	103
Bảng 3.6. Đánh giá tính chọn lọc của phương pháp	105
Bảng 3.7. Một số chất cấm được phát hiện trong mẫu TPBVSK	106
Bảng 3.8. Độ lặp lại và độ thu hồi của vardenafil.....	117
Bảng 3.9. Độ lặp lại và độ thu hồi của các chất PDE-5i.....	118
Bảng 3.10. Kết quả phân tích định lượng các chất PDE-5i trên mẫu TPBVSK dương tính...	120
Bảng 3.11. Các điều kiện khối phổ phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân	122
Bảng 3.12. Các thông số tối ưu của khối phổ để phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân....	123
Bảng 3.13. Chương trình gradient phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân	124

Bảng 3.14. Chương trình gradient 3 phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân	125
Bảng 3.15. Độ thu hồi của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại khối lượng than hoạt tính khác nhau	128
Bảng 3.16. Độ lặp lại và độ thu hồi của sibutramin.....	132
Bảng 3.17. Kết quả phân tích hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong một số mẫu TPBVSK	133
Bảng 3.18. Các điều kiện khối phổ phân tích các chất hỗ trợ tiêu đường	134
Bảng 3.19. Các thông số tối ưu của khối phổ để phân tích các chất nhóm tiêu đường.....	135
Bảng 3.20. Kết quả khảo sát ảnh hưởng pha động đối với các chất nhóm tiêu đường	135
Bảng 3.21. Chương trình gradient phân tích các chất nhóm tiêu đường	136
Bảng 3.22. Độ thu hồi của các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường tại khối lượng than hoạt tính khác nhau	138
Bảng 3.23. Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện của một số chất nhóm hỗ trợ tiêu đường..	140
Bảng 3.24. Độ lặp lại và độ thu hồi của burfomin	141
Bảng 3.25. Kết quả phân tích hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường trong một số mẫu TPBVSK.....	142

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cơ chế tác dụng của các chất nhóm PDE-5i	21
Hình 1.2. Cấu trúc phân tử biguanid	33
Hình 1.3. Cấu trúc chung của sulfonylureas	34
Hình 1.4. Ví dụ minh họa về độ lệch khối giữa khối lượng danh nghĩa, khối lượng đơn đồng vị và khối lượng trung bình.....	54
Hình 1.5. Ví dụ minh họa cho sơ đồ bố trí của thiết bị Orbitrap	57
Hình 1.6. Ví dụ minh họa cho sơ đồ bố trí của ion hóa phun điện tử.....	60
Hình 1.7. Ví dụ minh họa cho sơ đồ bố trí của ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển	60
Hình 2.1. Quy trình chiết mẫu TPBVSK đối với sàng lọc các chất cấm.....	69
Hình 2.2. Khảo sát quy trình chiết mẫu TPBVSK đối với nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý	70
Hình 2.3. Sơ đồ quy trình chiết mẫu TPBVSK với nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân	71
Hình 2.4. Sơ đồ quy trình chiết mẫu TPBVSK với nhóm chất cấm hỗ trợ tiểu đường....	72
Hình 2.5. Quy trình sàng lọc chất cấm bằng phần mềm Compound Discoverer.....	73
Hình 2.6. Minh họa tìm kiếm hợp chất chưa biết trong mẫu bằng phần mềm Compound discoverer	74
Hình 3.1. Hình ảnh minh họa xây dựng thư viện phổ của aminotadalafil	96
Hình 3.2. Sắc ký đồ TIC của các chất nhóm hỗ trợ sinh lý tại các cột sắc ký khác nhau ...	97
Hình 3.3. Sắc ký đồ một số chất cấm tại điều kiện sắc ký lỏng tối ưu	102
Hình 3.4. Sắc ký đồ của một số chất cấm tại mức MDL	104
Hình 3.5. Minh họa việc tìm kiếm các hợp chất chưa biết nhóm chất cấm trong mẫu TPBVSK bằng phần mềm Compound discoverer	106
Hình 3.6. Phổ khối của hợp chất mới N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil.....	108
Hình 3.7. Độ thu hồi một số chất PDE-5i tại dung môi chiết khác nhau.....	111
Hình 3.8. Biểu đồ kết quả khảo sát dung môi loại béo	112
Hình 3.9. Đường chuẩn acetildenafil trên nền dung môi (a) và trên nền viên nang cứng (b)	113

Hình 3.10. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn của sildenafil tại nồng độ 30 ng/mL	114
Hình 3.11. Phổ đồ của N-Desethylvardenafil của mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 200 ng/mL	115
Hình 3.12. Sắc ký đồ của một số chất PDE-5i tại mức MDL 1,0 µg/kg trên nền TPBVSK dạng nang mềm.....	116
Hình 3.13. Đường chuẩn chất phân tích 2- Hydroxypropylnortadalafil	117
Hình 3.14. Tín hiệu pic của một số chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại chương trình gradient 1	124
Hình 3.15. Tín hiệu pic của một số chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại chương trình gradient 2.....	124
Hình 3.16. Tín hiệu pic của một số chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại chương trình gradient 3.....	125
Hình 3.17. Độ thu hồi sibutramin tại dung môi chiết khác nhau	126
Hình 3.18. Độ thu hồi của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại quy trình làm sạch khác nhau	127
Hình 3.19. Quy trình tối ưu xác định các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK	129
Hình 3.20. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn sibutramin trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và viên nang mềm (E).....	130
Hình 3.21. Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn tại mức nồng độ 0,3 µg/kg đối với nền mẫu viên nang cứng	130
Hình 3.22. Đường chuẩn phân tích sibutramin	131
Hình 3.23. Độ thu hồi các chất nhóm tiểu đường tại dung môi chiết khác nhau....	137
Hình 3.24. Quy trình tối ưu xác định các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trong mẫu TPBVSK	138
Hình 3.25. Sắc ký đồ của một số chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trên các nền TPBVSK ở mức thêm chuẩn 0,1 mg/kg.....	139
Hình 3.26. Đường chuẩn phân tích burfomin	140

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Trong những năm gần đây, việc sử dụng các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) để bổ sung thêm vào chế độ ăn uống hàng ngày đang ngày càng phổ biến. TPBVSK được sử dụng ở mọi lứa tuổi, với nhiều mục đích khác nhau như: duy trì, tăng cường, cải thiện các chức năng của cơ thể con người, giảm nguy cơ mắc bệnh, phòng ngừa các bệnh mãn tính, cải thiện ngoại hình, cải thiện các chức năng sinh lý, nâng cao hiệu quả thể thao [3],... Qua khảo sát về chế độ dinh dưỡng và sức khỏe từ năm 2003 đến 2006 cho thấy khoảng 49% dân số Mỹ sử dụng TPBVSK, trong đó, 14% sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc thảo dược. Tại Châu Âu (EU), một khảo sát liên quan đến việc tiêu thụ thực phẩm bảo vệ sức khỏe tại 6 quốc gia (Phân Lan, Đức, Ý, Romani, Tây Ban Nha và Anh) cho thấy trung bình gần 19% có sử dụng ít nhất một sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe, tỉ lệ cao ở Ý (22,7%) và tỉ lệ thấp ở Phần Lan (9,6%) [100].

Các sản phẩm TPBVSK, đặc biệt các sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược thường được ưa chuộng hơn cả, các sản phẩm này thường phải sử dụng trong thời gian dài mới có thể đạt hiệu quả. Tuy nhiên, người sử dụng TPBVSK có xu hướng thay đổi sản phẩm khi nhận thấy hiệu quả chậm, hoặc có nhưng không rõ rệt. Nắm bắt được tâm lý này, một số nhà sản xuất đã trộn các chất có tác dụng giúp tăng nhanh hiệu quả và công dụng của sản phẩm, nhưng gây hại cho sức khỏe con người nên bị cấm sử dụng trong sản phẩm TPBVSK. Điển hình trong đó là các chất thuộc nhóm ức chế phosphodiesterase type 5 (PDE5) trong TPBVSK cải thiện chức năng sinh lý; các chất gây biếng ăn, lợi tiểu và nhuận tràng trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân; các chất giảm glucose máu trong TPBVSK hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường [86, 100, 112].

Các chất này nằm trong danh mục thuốc kê đơn, khi được sử dụng không có kiểm soát, sẽ gây ra các tác dụng phụ ảnh hưởng nguy hại đến sức khỏe người sử dụng. Trong đó, các hoạt chất ức chế PDE5 có thể gây ra các tác dụng không mong muốn trên cơ thể như: chóng mặt, tức ngực, nổi mề đay, phát ban, khó thở, rối loạn tiêu hóa,... Sibutramin làm tăng áp lực máu, nhịp tim và thường tăng nguy cơ đau tim

cũng như đột quy. Các chất điều hòa đường huyết như phenformin, buformin, metformin,... đều có tương tác mạnh với nhau khi dùng cùng, đặc biệt gây nguy hiểm đến tính mạng cho người sử dụng đang có bệnh lý nền và đang dùng nhiều loại thuốc khác nhau. Do vậy, nhu cầu phân tích để kiểm soát các chất cấm trong TPBVSK là vấn đề cấp bách nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm và bảo vệ người tiêu dùng.

Đã có một số nghiên cứu được tiến hành với các nhóm chất khác nhau, nhưng hầu hết các quy trình phân tích riêng từng nhóm chất hoặc các quy trình phân tích đồng thời nhưng hạn chế với các nhóm chất [17]. Các phương pháp phân tích như quang phổ, điện hóa, sắc ký chi xác định được một số giới hạn các chất với quy trình riêng rẽ. Do vậy, ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HR/MS) để phân tích, sàng lọc đồng thời các nhóm chất là lựa chọn tối ưu nhằm phân tích và phát hiện các chất cấm mới trong TPBVSK, đặc biệt khi nguồn chất chuẩn không sẵn có.

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, đề tài: **“Nghiên cứu xác định một số chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cân, chức năng sinh lý và tiểu đường”** đã được thực hiện nhằm đóng góp phần nhỏ bé vào xây dựng các phương pháp phân tích các chất cấm trong TPBVSK, bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Đề tài được thực hiện với hai mục tiêu:

2.1. Nghiên cứu phát triển phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS và sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS để sàng lọc và định lượng một số chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cân, chức năng sinh lý và tiểu đường.

2.2. Áp dụng các phương pháp để xác định một số chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường. Để đạt được mục tiêu đề ra, các nội dung của đề tài bao gồm:

- Xây dựng quy trình LC-HR/MS phân tích sàng lọc các chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường: Khảo sát điều kiện HR/MS, điều kiện sắc ký lỏng và phân tích mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường.

- Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý: Khảo sát điều kiện LC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý.

- Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân: Khảo sát điều kiện LC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân.

- Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường: Khảo sát điều kiện LC-MS/MS, xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và phân tích trong mẫu TPBVSK hỗ trợ tiểu đường.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài nghiên cứu

4.1. Ý nghĩa khoa học

- Nghiên cứu sử dụng các phương pháp phân tích hiện đại, có độ nhạy và độ chính xác cao như: sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HR/MS) để sàng lọc đồng thời và phát hiện các chất mới; phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) để định lượng các chất trộn trái phép trong TPBVSK. Đây là hướng nghiên cứu không chỉ có tính mới, ý nghĩa trong khoa học, mà còn mang tính toàn diện, góp phần nâng cao chất lượng công tác kiểm nghiệm an toàn thực phẩm, bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

- Nghiên cứu đã phát hiện 01 chất mới nhóm PDE-5i chưa có trong thư viện phổ của hệ thống và cũng chưa được công bố trên thế giới, đã phối hợp với phòng thí nghiệm tại Singapore phân lập, xác định cấu trúc hợp chất mới là N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil góp phần bổ sung thêm vào ngân hàng dữ liệu toàn cầu nhóm PDE-5i.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Số lượng các chất cấm trộn trái phép trong TPBVSK ngày càng đa dạng và phức tạp. Quá trình tổng hợp các chất này dẫn tới xuất hiện nhiều chất với dẫn xuất khác nhau ở một hay vài nhóm thế. Các chất mới sinh ra này có hoạt độ, tác dụng tương tự với các chất gốc nên có thể được phân lập và sử dụng trong sản phẩm gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm nếu chỉ sử dụng các phương pháp truyền thống. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS phân tích chính xác cấu trúc của chất phân tích cũng như tìm kiếm các chất mới dựa trên cấu trúc khung của nhóm chất đã giải quyết được vấn đề trên. Quy trình này có thể áp dụng tại các phòng kiểm nghiệm an toàn thực phẩm tuyến trung ương, những nơi có đầy đủ trang thiết bị hiện đại để tiến hành phân tích đảm bảo kết quả chính xác cao.

- Kết quả phân tích các mẫu TPBVSK trên thực tế đưa ra các bằng chứng và khuyến nghị cho các nhà quản lý trong quá trình cập nhật và xây dựng văn bản quản lý chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu chung về chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe

TPBVSK là những sản phẩm được dùng để bổ sung thêm vào chế độ ăn uống hàng ngày nhằm duy trì, tăng cường, cải thiện các chức năng của cơ thể con người, giảm nguy cơ mắc bệnh. TPBVSK chứa một hoặc nhiều chất hoặc hỗn hợp các chất sau: Vitamin, khoáng chất, axit amin, axit béo, enzyme, probiotic và chất có hoạt tính sinh học khác; chất có nguồn gốc tự nhiên, bao gồm động vật, khoáng vật và thực vật dưới dạng chiết xuất, phân lập, cô đặc và chuyển hóa; các nguồn tổng hợp của những thành phần trên [23].

TPBVSK được trình bày ở dạng chế biến như viên nang, viên hoàn, viên nén, chế phẩm dạng cốm, bột, lỏng và các dạng bào chế khác và được phân liều (để sử dụng) thành các đơn vị liều nhỏ [23].

Trên thế giới, phần lớn các quốc gia không quy định cụ thể danh mục chất cấm sử dụng trong thực phẩm cũng như trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) ban hành danh mục các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe cảnh báo gian lận có chứa các chất có khả năng gây nguy hiểm [113]. FDA không cho phép trộn các hợp chất PDE-5i vào TPBVSK và dược điển Mỹ đưa ra các phương pháp xác định 64 chất PDE-5i trộn trái phép trong thực phẩm bổ sung bằng các phương pháp: HPLC-UV, HPLC-MS, HPTLC –UV/MS, khối phổ ion hóa nhiệt độ phòng, NMR Spectroscopy, phương pháp sinh học [20]. Hiệp hội các Quốc gia Đông Nam Á ASEAN quy định danh mục các chất không được phép là thành phần trong sản phẩm TPBVSK, trừ phụ gia thực phẩm, phụ liệu, vitamin, khoáng chất, độc tố tự nhiên, các chất cấm theo luật bảo vệ động vật hoang dã. Danh mục chất cấm bao gồm nhiều loại thực phẩm cấm sử dụng trong sản phẩm TPBVSK [23].

Tại Việt Nam, cơ quan chức năng đã phát hiện các sản phẩm TPBVSK chứa chất cấm gây nguy hiểm đến sức khỏe người tiêu dùng, đặc biệt trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ chức năng sinh lý, hỗ trợ giảm cân và hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường [4], [8]. Đây là các chất nằm trong danh mục thuốc kê đơn,

khi được sử dụng không có kiểm soát, sẽ gây ra các tác dụng phụ ảnh hưởng nguy hại đến sức khỏe người sử dụng. Trong đó, các hoạt chất ức chế PDE-5i có thể gây ra các tác dụng không mong muốn trên cơ thể như: Chóng mặt, tức ngực, nổi mề đay, phát ban, khó thở, rối loạn tiêu hóa, ... Sibutramin làm tăng áp lực máu, nhịp tim và thường tăng nguy cơ đau tim cũng như đột quy. Các chất điều hòa đường huyết đều có tương tác mạnh với nhau khi dùng cùng, đặc biệt gây nguy hiểm đến tính mạng cho người sử dụng đang có bệnh lý nền và đang sử dụng nhiều loại thuốc khác nhau. Ngày 30/6/2021, Bộ Y tế đã ban hành Thông tư số 10/2021/TT-BYT quy định danh mục chất cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe, trong đó các chất cấm thuộc nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, hỗ trợ giảm cân và hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường được thể hiện trong bảng 1.1 [1].

Bảng 1.1. Các chất phân tích thuộc nhóm chất cấm trong thông tư 10/2021/TT-BYT

Tên nhóm	Chất phân tích
Nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý	Aildenafil, Aminotadalafil, Benzamidenafil, Desmethyl carbodenafil, Desmethyilsildenafil, Dimethylacetildenafil, Dithiodesmethyl carbodenafil, Flibanserin, Hydroxyhomosildenafil, Hydroxyacetildenafil, N-Desmethyl tadalafil, N-Desmethyl-N-benzyl sildenafil, N-Desmethylyardenafil, Piperadino vardenafil, Sildenafil, Sulfoaildenafil, Sulfohydroxyhomosildenafil, Tadalafil, Thioaildenafil, Thiosildenafil, Vardenafil
Nhóm hỗ trợ giảm cân	Benzyl sibutramine, Desisobutyl-benzylsibutramine, Desmethyilsibutramine, Didesmethyilsibutramine, Fenfluramine, Orlistat, Phenytoin, 1-3-dimethylamylamine, Cetilistat, Dapoxetine, Fluoxetine, Furosemide, Hydrochlorothiazide, Lorcaserin, Doxepin
Nhóm hỗ trợ tiểu đường	Buformin, Metformin, Phenformin

1.2. Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý

TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý đang được sử dụng rộng rãi để hỗ trợ tăng cường sinh lực và sức bền thể lực, làm tăng hưng phấn, hỗ trợ điều trị rối loạn cương dương, liệt dương và tăng cường ham muốn cho nam giới. Các sản phẩm này thường có nguồn gốc tự nhiên, thành phần gồm các sản phẩm từ động vật hoặc thực vật, đã được sử dụng trong đông y nhằm cải thiện chức năng sinh lý. Tuy nhiên, để làm tăng và làm nhanh tác dụng của các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe này, một số nhà sản xuất đã trộn trái phép các chất cấm, trong đó điển hình là các chất thuộc nhóm ức chế enzyme phosphodiesterase-5 (PDE-5i), giúp sản phẩm TPBVSK nhanh đạt tác dụng. Các chất nhóm PDE-5i bao gồm sildenafil, tadalafil, vardenafil và các hợp chất được tổng hợp tương tự được tìm thấy trộn trái phép trong các sản phẩm TPBVSK hay thuốc tăng cường sinh lực bán trên thị trường. Cho đến nay, hơn 60 chất tương tự chất PDE-5i trộn trái phép đã được công bố.

Trên phương diện lâm sàng các chất nhóm PDE-5i gây tác dụng phụ đáng kể, như nhức đầu, đỏ bừng mặt, mũi tắc nghẽn, rối loạn thị giác và đau lưng. Bên cạnh đó, nhóm PDE-5i cũng có thể gây ra tương tác thuốc - thuốc khi sử dụng đồng thời với các thuốc có chứa nitrat có thể dẫn đến hạ huyết áp nghiêm trọng gây ngất hoặc thậm chí là tử vong. Do vậy, những bệnh nhân không biết có vấn đề về tim mạch khi dùng cả thuốc có nitrat và TPBVSK chứa chất PDE-5i có thể gây nguy hiểm đến sức khỏe, thậm chí ảnh hưởng đến tính mạng [114]. Trên thị trường, bên cạnh một số sản phẩm phát hiện trộn trái phép các chất PDE-5i đã được phê duyệt làm thuốc (sildenafil, tadalafil, vardenafil, ...) thì các chất được tổng hợp tương tự cũng được tìm thấy. Tuy nhiên, các chất này đều chưa được cơ quan chức năng kiểm duyệt và cấp phép nên mức độ an toàn và độc tính của chúng chưa được biết đến và do đó, người tiêu dùng các sản phẩm đó tiềm ẩn rất nhiều nguy cơ.

Hơn nữa, để tránh sự kiểm tra của các cơ quan chức năng dẫn đến ngày càng nhiều chất PDE-5i và chất tương tự chúng được tổng hợp. Các chất thay thế chỉ khác các chất nhóm PDE-5i nguyên bản ở một hoặc vài nhóm thế. Các dẫn chất này có

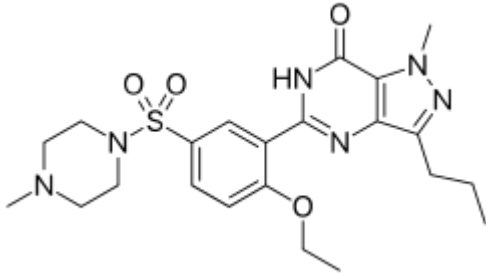
hoạt độ, tác dụng tương tự với các chất gốc nên có thể được phân lập và sử dụng trái phép trong TPBVSK.

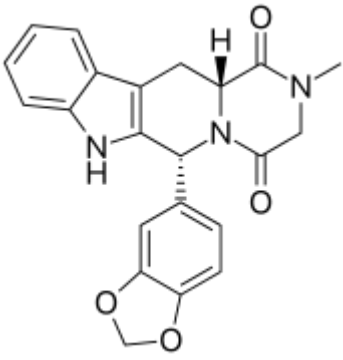
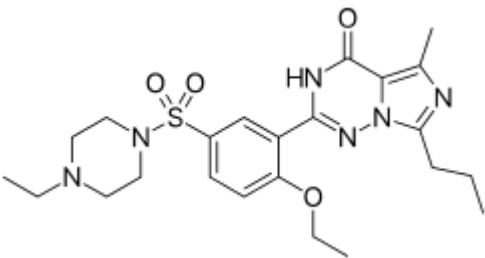
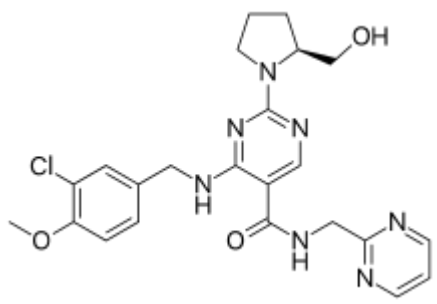
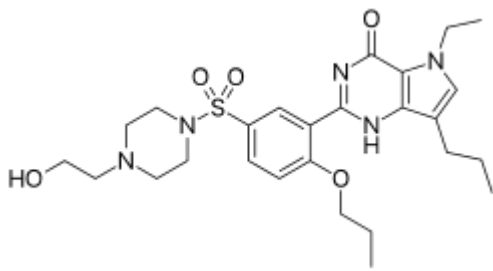
1.2.1. Các chất ức chế phosphodiesterase type 5

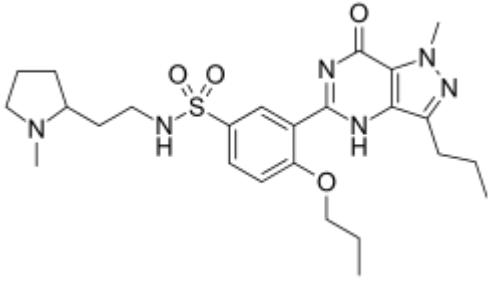
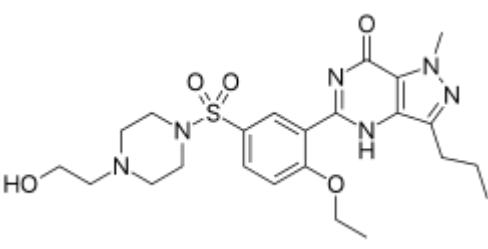
Các chất ức chế phosphodiesterase type 5 (PDE-5i) là một enzyme có trong thành của các mạch máu. Nó ảnh hưởng đến sự lưu thông máu và cách các tế bào truyền tín hiệu trong cơ thể. Chất ức chế PDE-5i hoạt động bằng cách ngăn chặn enzyme PDE-5i, tạo ra hiệu ứng giãn mạch máu và thúc đẩy lưu thông máu. Lợi dụng cơ chế này, người ta có thể sử dụng các chất ức chế PDE-5i để điều trị rối loạn cương dương hoặc tăng áp phổi. Ở những người mắc rối loạn cương dương, chất ức chế PDE-5i giúp tăng lưu thông máu đến dương vật, cải thiện chức năng cương dương.

Sildenafil là chất đầu tiên được cấp phép sử dụng làm thuốc (năm 1998), tiếp theo là tadalafil vào năm 2020 và vardenafil vào năm 2005. Ba chất này đến nay vẫn được phép sử dụng làm thuốc và được coi là thế hệ PDE-5i đầu tiên. Thế hệ thứ 2 bắt đầu khoảng từ năm 2013 gồm các chất avanafil, mirodenafil, udenafil và MDLenafil ra đời từ năm 2012 cho đến nay [69, 82].

Bảng 1.2. Một số thông tin chung của các thuốc PDE-5i

PDE-5i	Biệt dược	Hãng	Công thức phân tử	Công thức cấu tạo
Sildenafil	Viagra®	Pfizer	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	

PDE-5i	Biệt dược	Hãng	Công thức phân tử	Công thức cấu tạo
Tadalafil	Cialis [®]	Eli Lilly	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	
Vardenafil	Levitra [®]	Bayer	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	
Avanafil	Stendra [®] và Spedra [®]	Vevus	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃	
Mirodenafil	Mvix [®]	SK Group	C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₅ S	

PDE-5i	Biệt dược	Hãng	Công thức phân tử	Công thức cấu tạo
Udenafil	Zydena®	Dong-A	C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S	
Lodenafil	Helleva®	Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S	

Có thể nhận thấy, mặc dù có cùng tác dụng, cấu trúc của các chất nhóm PDE-5i có sự khác biệt nhất định. Tadalafil và Avanafil có cấu trúc khác biệt hẳn so với các chất còn lại. Dựa trên sự liên quan giữa cấu trúc và tác dụng, nhiều chất tương tự các thuốc PDE-5i đã được tổng hợp làm thuốc, tuy nhiên cho đến nay, vẫn chưa có thêm thuốc PDE-5i nào được cấp phép sử dụng trên thế giới.

1.2.2. Các chất tương tự thuốc ức chế phosphodiesterase type 5

Các chất tương tự thuốc PDE-5i được xếp vào 3 nhóm chính là dẫn xuất của sildenafil, tadalafil và vardenafil. Bảng 1.3 giới thiệu các chất tương tự đã được phát hiện cho đến nay.

Bảng 1.3. Các chất tương tự thuốc PDE-5i đã được phát hiện

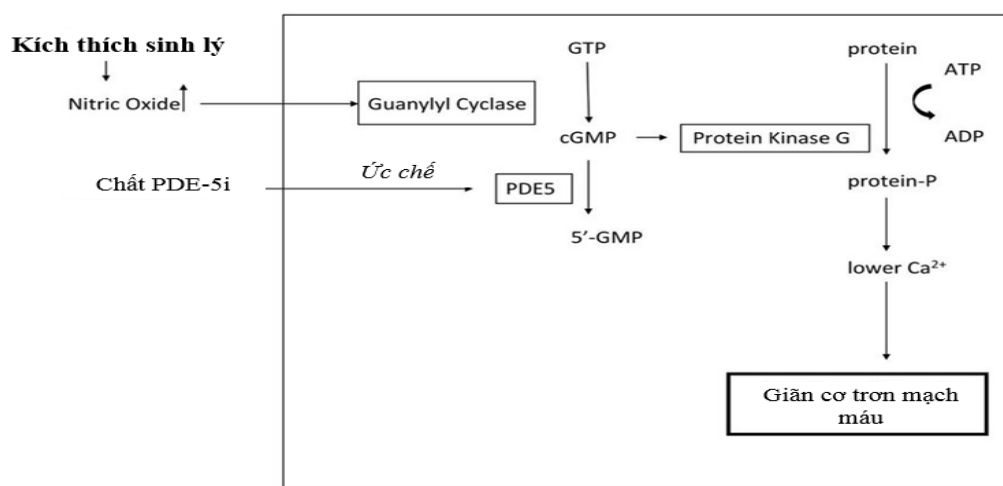
Thuốc PDE-5i	Số lượng	Tên hợp chất
Dẫn xuất Sildenafil	46	Acetildenafil, Acetil acid, Benzylsildenafil, Carbodenafil, Chlorodenafil, Cyclopentylafil, Depiperazinothiosildenafil, Descarbonsildenafil, Desmethyl fondenafil, Desmethylthiosildenafil, Dimethylacetildenafil, Dimethylsildenafil, Dinitrodenafil,

Thuốc PDE-5i	Số lượng	Tên hợp chất
		Dithiodesmethylcarbodenafil, Gendenafil, Gisadenafil besylate, Homosildenafil, Hydroxyacetildenafil, Hydroxychlorodenafil, Hydroxythiohomosildenafil, Hydroxyhomosildenafil, Imidazosagatriazinone, Isosildenafil, MDLenafil carbonate, Methisosildenafil, Mutaprodenafil, N-demethylsildenafil, Nitrodenafil, Noracetildenafil, Norneosildenafil, O-desethyl-o-propyl sildenafil, Piperiacetildenafil, Piperazonifil, Propoxyphenyl aildenafil, Propoxyphenyl thioaildenafil, Propoxyphenylhomohydroxysildenafil, Propoxyphenylsildenafil, Propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafil, Propoxyphenylthiosildenafil, Pyrazole N-demethylsildenafil, Sildenafil, Sildenafil N-oxide, Thioaildenafil, Thiohomosildenafil, Thiosildenafil, Zaprinast
Dẫn xuất Tadalafil	11	2-Hydroxypropylnortadalafil, Acetaminotadalafil, Aminotadalafil, Chloropretadalafil, Desmethylenetadalafil, N-Butyltadalafil, N-desmethyl tadalafil, N-Ethyltadalafil, N-Octylnortadalafil, Nortadalafil, Tadalafil
Dẫn xuất Vardenafil	11	Acetylvardenafil, Benzamidenafil, Hydroxythiovardenafil, Hydroxyvardenafil, N-Desethylvardenafil, Norneovardenafil, Pseudovardenafil, Vardenafil, Vardenafil N-oxide, Vardenafil oxopiperazine, Rac-Xanthoanthrafil
Các nhóm khác	3	Avanafil, Mirodenafil, Udenafil

Trong danh mục chất cấm quy định tại Thông tư số 10/2021/TT-BYT, có tổng số 23 chất thuộc nhóm PDE-5i. Các chất được phát triển từ cấu trúc của sildenafil chiếm tỷ lệ cao nhất. Hiện nay, số lượng các chất tương tự PDE-5i liên tục được phát hiện do nhiều nhà sản xuất thay thế các nhóm thế để tránh sự phát hiện của các cơ quan chức năng.

1.2.3. Cơ chế tác dụng và chỉ định của các chất PDE-5i

- **Cơ chế:** Các guanin triphosphat chuyển hóa thành guanin monophosphate vòng (cGMP) tác dụng theo hai hướng. Hướng tác động lên protein kinase G làm tăng chuyển hóa protein thành protein P, làm giảm nồng độ Ca^{2+} từ đó làm tăng hoạt tính giãn cơ, từ đó làm tăng khả năng sinh lý của cơ thể. Con đường thứ 2 của cGMP chuyển hóa thành 5'-GMP nhờ enzym phosphodiesterase-5. Việc sử dụng các PDE-5i sẽ ức chế con đường chuyển hóa thứ 2 của cGMP, từ đó làm tăng cGMP chuyển hóa theo con đường 1 và làm tăng chức năng sinh lý của cơ thể [44, 111] (Hình 1.1).



Hình 1.1. Cơ chế tác dụng của các chất nhóm PDE-5i

Các hoạt chất nhóm PDE-5i được sử dụng trong các thuốc chỉ định rối loạn cương dương (ED) được khuyến cáo là phương pháp điều trị ED đầu tiên do nguyên nhân tâm thần, mạch máu và bệnh lý thần kinh khi kết hợp với liệu pháp đặc hiệu căn nguyên [92].

- Xuất tinh sớm (PE) liên quan đến rối loạn cương dương.
- Tăng huyết áp vô căn - Thuốc PDE-5i dùng để kiểm soát tăng huyết áp phổi được dùng cho bệnh nhân mắc suy tim (NYHA) loại 2 hoặc 3 có đáp ứng thuốc giãn mạch cấp tính âm tính và không được chỉ định ở những bệnh nhân mắc NYHA loại 4.
- Bệnh độ cao - Điều trị bằng sildenafil đã cho thấy làm giảm tỷ lệ tăng huyết áp phổi ở những người bị áp lực động mạch phổi cao do độ cao gây ra, nhưng

không cải thiện tình trạng bão hòa oxy động mạch, nhịp tim và bệnh núi cấp tính.

- Phục hồi chức năng dương vật sau phẫu thuật cắt bỏ tuyến tiền liệt.
- Điều trị các biến cố về tim mạch.
- Điều trị các triệu chứng đường tiết niệu dưới (LUTS).
- **Tác dụng phụ:** Việc sử dụng các hoạt chất nhóm PDE-5i có thể dẫn tới tác

dụng không mong muốn trên cơ thể như sau [114]:

- Giảm đột ngột hoặc mất thính lực, ù tai.
- Cương cứng kéo dài hơn 4 giờ.
- Chóng mặt, tức ngực, nổi mề đay, phát ban.
- Khó thở hoặc nuốt, sưng mắt, cổ họng, lưỡi, môi, mắt, tay, chân, mắt cá chân, hoặc cẳng chân; phù nề hoặc bong tróc da.
- Gây chóng mặt, đau đầu, rối loạn tiêu hóa, thay đổi thị giác.
- Bệnh nhân uống thuốc giãn mạch vành tim do mạch máu tim bị hẹp (bệnh tăng huyết áp) dùng thuốc này có thể dẫn đến huyết áp hạ quá nhanh, làm bệnh nhân mất tỉnh táo, ngất, có thể dẫn đến nhồi máu cơ tim cấp, tai biến mạch máu nặng, hạ huyết áp đột ngột và tử vong.

1.2.4. Tình trạng sử dụng nhóm chất cấm PDE-5i trong TPBVSK

- *Tình trạng sử dụng nhóm chất cấm PDE-5i trong TPBVSK trên thế giới*

Trên thế giới, việc trộn lẫn các chất nhóm PDE-5i vào các chế phẩm đông được, đặc biệt là thực phẩm bảo vệ sức khỏe diễn ra khá phổ biến. Có đến 80 hợp chất thuộc nhóm PDE-5i đã được phát hiện trên thế giới, trong đó các hợp chất thuộc dẫn xuất của sildenafil chiếm tỷ lệ lớn nhất (62%), tiếp theo là dẫn xuất của tadalafil (26%) và vardenafil (9%). Trong các khu vực trên thế giới, Châu Á có tỷ lệ phát hiện các hợp chất nhóm PDE-5i cao nhất (67%), tiếp theo đó là Châu Âu (22%) và Bắc Mỹ (11%) [56].

Ở Thụy Sĩ, Do và các cộng sự [32] đã sử dụng HPTLC và HPTLC-ESI/MS để phát hiện 3 chất nhóm PDE-5i (sildenafil, vardenafil, and tadalafil) và 8 chất tương tự chúng (hydroxyacetildenafil, homosildenafil, thiohomosildenafil, acetaminotadalafil, propoxyphenyl hydroxyhomosildenafil, acetildenafil, hydroxyhomosildenafil,

hydroxythiohomosildenafil) trong viên nén, viên nang, cafe, kẹo chewing. Kết quả thu được cho thấy trong 45 mẫu được kiểm tra, có 31 mẫu có chứa ít nhất 1 trong các chất sildenafil, tadalafil, propoxyphenyl, dimethylsildenafil hydroxyhomosildenafil.

Một nghiên cứu tại Pháp tiến hành nghiên cứu định tính chất cấm trong 150 mẫu thực phẩm chức năng có nguồn gốc từ thiên nhiên giúp tăng cường khả năng sinh lý bằng phương pháp $^1\text{H-NMR}$. Kết quả có 61% mẫu đã pha trộn với các chất ức chế phosphodiesterase-5 (PDE-5i) (27% với thuốc nhóm PDE-5i gồm sildenafil, tadalafil và vardenafil, và 34% với các dẫn chất của chúng). Trong số mẫu pha trộn đó, 64% chỉ chứa 1 thuốc nhóm PDE-5i và 36% mẫu có chứa hai, ba và thậm chí bốn thuốc hoặc dẫn chất nhóm PDE-5i. Hàm lượng PDE-5i cao hơn liều khuyến cáo tới đa ở 25% mẫu khảo sát bị nhiễm các loại thuốc này [39].

Ở Hàn Quốc, một nghiên cứu tiến hành trong 4 năm (2009-2012) trên 164 mẫu thực phẩm chức năng được quảng cáo tăng cường sinh lý nam giới cho thấy 77 mẫu phát hiện có chứa chất PDE-5i gồm có 55 mẫu phát hiện tadalafil với hàm lượng trong khoảng 0,37 -139 mg/g, 36 mẫu phát hiện sildenafil với hàm lượng trong khoảng 0,03- 370 mg/g, 17 mẫu phát hiện đồng phân của tadalafil (aminotadalafil, chloropretadalafil, octylnortadalafil), 17 mẫu phát hiện đồng phân sildenafil (dimethylsildenafil, dimethylthiosildenafil, hydroxyhomosildenafil,...) với hàm lượng trong khoảng 0,01- 67,1 mg/g, một số mẫu phát hiện vardenafil cùng đồng phân (hydroxyvardenafil) và Icariin (thành phần của sâm dương hoắc) với hàm lượng trong khoảng 0,09- 36,9 mg/g. Phương pháp LC-MS/MS đã được sử dụng để sàng lọc các chất nhóm PDE-5i trong các dạng sản phẩm của TPBVSK khác nhau (Dạng bột, viên nén, viên nang, ...) [68]. Các hợp chất sildenafil, tadalafil, vardenafil và các chất tương tự của chúng cũng được tìm thấy trong các chế phẩm thực phẩm chức năng, thuốc không có số đăng ký và dược liệu dùng để điều trị rối loạn cương dương bất hợp pháp bằng phương pháp LC-ESI-MS/MS [67]. Kết quả thu được cho thấy 87% số mẫu thực phẩm chức năng kiểm tra có chứa thành phần chất nghiên cứu trong đó có 34% số mẫu có chứa sildenafil trong khoảng 0,01 - 77,5 mg/liều và 81% có chứa tadalafil với nồng độ khoảng 0,30 - 52,7 mg/liều. Đối với các sản phẩm thuốc

không có số đăng ký, sildenafil được phát hiện trong 73% số mẫu với nồng độ trong khoảng 63,8 – 317 mg/liều.

- *Tình trạng sử dụng nhóm chất cấm PDE-5i trong TPBVSK tại Việt Nam*

Tại Việt Nam, khá nhiều nghiên cứu đã công bố phát hiện các chất nhóm PDE-5i trong các sản phẩm TPBVSK. Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã phân tích, kiểm tra các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe trên thị trường và phát hiện các chất trộn trái phép chất chống rối loạn cương dương nhóm ức chế phosphodiesterase-5 [8]. Năm 2014, Cục An toàn thực phẩm cũng có quyết định thu hồi và tiêu hủy toàn bộ sản phẩm thực phẩm chức năng Kim thận bảo 1 New của Công ty TNHH Thương mại dược phẩm Nam Á do có chứa chất tadalafil (36,0 mg/viên) và sildenafil (123 mg/viên) [4].

1.3. Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân

Theo Tổ chức Y tế thế giới, thừa cân béo phì nghĩa là tình trạng tích lũy mỡ quá mức và không bình thường tại một vùng cơ thể hay toàn thân gây ra nhiều nguy hại tới sức khỏe. Nhìn chung, bệnh thừa cân béo phì thể hiện trọng lượng cơ thể cao hơn trọng lượng chuẩn ở một người khỏe mạnh. Bệnh thừa cân, béo phì được phân loại bằng chỉ số khối cơ thể (BMI). Chỉ số khối cơ thể được tính dựa trên chiều cao và trọng lượng cơ thể. Theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới, một người trưởng thành, trừ người có thai nếu có chỉ số BMI trong khoảng 25 – 30 kg/m² được xem là thừa cân, và một người trưởng thành có chỉ số BMI \geq 30 kg/m² được xem là béo phì. Dấu hiệu dễ nhận thấy nhất của thừa cân béo phì gia tăng trọng lượng cơ thể và khối lượng mỡ tích tụ tại một số phần đặc biệt của cơ thể như: bụng, đùi, eo, và ngực [80].

Béo phì là nguyên nhân chính gây ra các bệnh và các tình trạng sức khỏe khác nhau, đặc biệt là các bệnh tim mạch, tiểu đường type 2, một số loại ung thư và viêm xương khớp [26, 41]. Cũng đã có những nghiên cứu cho thấy mối liên hệ qua lại giữa béo phì và trầm cảm, béo phì làm tăng nguy cơ trầm cảm lâm sàng và trầm cảm cũng dẫn đến nguy cơ phát triển béo phì cao hơn [73]. Béo phì là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu có thể phòng ngừa được trên toàn thế giới, với tỷ lệ ngày càng tăng ở người lớn và trẻ em [37]. Năm 2015, 600 triệu người lớn (12%) và 100 triệu trẻ em

bị béo phì ở 195 quốc gia. Các nhà chức trách coi đây là một trong những vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng nhất của thế kỷ 21. Năm 2013, một số hiệp hội y tế bao gồm Hiệp hội Y khoa Hoa Kỳ và Hiệp hội Tim mạch Hoa Kỳ, đã phân loại béo phì là một căn bệnh [51].

Điều trị béo phì bao gồm các biện pháp can thiệp ở cấp cộng đồng, gia đình và cá nhân [26, 41, 80]. Thay đổi chế độ ăn uống và tập thể dục là phương pháp điều trị chính được các chuyên gia y tế khuyến nghị. Chất lượng chế độ ăn có thể được cải thiện bằng cách giảm tiêu thụ thực phẩm giàu năng lượng, chẳng hạn như những thực phẩm giàu chất béo hoặc đường, và bằng cách tăng lượng chất xơ. Người tiêu dùng cũng có thể sử dụng các loại thuốc và TPBVSK, cùng với một chế độ ăn uống phù hợp, để giảm cảm giác thèm ăn hoặc giảm hấp thu chất béo.

Các hoạt chất thường được sử dụng trộn trái phép trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ giảm cân có thể phân loại theo tác dụng dược lý.

1.3.1. Nhóm hoạt chất nhuận tràng (laxatives)

Các chất có tác dụng nhuận tràng là một nhóm chất làm tăng tốc độ di chuyển của phân hoặc làm giảm độ đặc của phân, được sử dụng chủ yếu để điều trị táo bón. Cơ chế hoạt động chính bao gồm tăng cường giữ nước bằng cơ chế ưa nước hoặc thẩm thấu, giảm sự hấp thu rỗng của chất lỏng thông qua các tác động lên sự vận chuyển chất lỏng và chất điện giải ở ruột non hoặc ruột già, và cuối cùng là thay đổi khả năng vận động bằng cách ức chế các cơn co thắt không đẩy hoặc kích thích các cơn co thắt đẩy. Các hoạt chất có tác dụng nhuận tràng thường được xếp vào một trong bốn loại bao gồm: chất nhuận tràng tạo khối, chất nhuận tràng thẩm thấu, thuốc nhuận tràng kích thích và chất làm mềm phân hoặc chất nhuận tràng chất hoạt động bề mặt.

Việc sử dụng các hoạt chất có tính nhuận tràng, nhằm giảm cân đã được ghi nhận trong các tài liệu từ thế kỷ II sau công nguyên ở Hy Lạp [27]. Tuy nhiên, việc lạm dụng các chất nhuận tràng dẫn tới tiêu chảy mãn tính, rối loạn kali máu, rối loạn chức năng ruột, suy giảm chức năng thận, ... [101]. Các hoạt chất nhuận tràng

phổ biến được bổ sung trái phép vào các sản phẩm TPBVSK là phenolphtalein, bisacodyl, ...

Trong số các thuốc nhuận tràng kích thích đại tràng, phenolphtalein bị lạm dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, phenolphtalein bị Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) cấm lưu hành từ năm 1999 do chất có thể gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ tiêu hóa, tim mạch, gan của người dùng và có thể gây độc gen hoặc đột biến DNA, gây ung thư ở động vật khi được cho ăn liều cao. Một số loại thuốc nhuận tràng dẫn đầu thị trường trước đây có chứa phenolphtalein đã được điều chế lại bằng sennosides, dẫn tới việc lạm dụng sennoside hoặc bisacodyl có thể tăng lên [20].

1.3.2. Nhóm chất ức chế sự thèm ăn

Amphetamin là một hoạt chất kích thích hệ thần kinh trung ương, đồng thời là một chất kích thích hệ thống thần kinh giao cảm ở người. Do đó, sử dụng amphetamin gây tăng nhịp tim, tăng huyết áp, tăng mức chuyển hóa cơ bản [43, 87]. Sử dụng amphetamin để giảm cân dựa trên 2 tác dụng: tăng mức tiêu thụ năng lượng cơ bản, và giảm cảm giác thèm ăn của con người.

Để hạn chế tác dụng gây nghiện của amphetamin, các dẫn chất tương tự amphetamin được tổng hợp và nghiên cứu như phentermin, phenylpropanolamin, fenfluramin, ... Các hoạt chất này nhìn chung đều ức chế sự thèm ăn, giảm ngon miệng ở người sử dụng bằng cách kích hoạt hệ thống thần kinh giao cảm adrenergic [22]. Hiện nay, có những khuyến cáo về việc cân nhắc lợi ích nguy cơ, cũng như giới hạn thời gian sử dụng cho phép của các hoạt chất này từ các cơ quan quản lý sức khỏe của Châu Âu và Hoa Kỳ.

Phenylpropanolamin là một benzenancol, khi được tiêm vào tĩnh mạch hay sử dụng thuốc ở liều lượng lớn, có thể làm tăng huyết áp trên cơ thể động vật cũng như con người. Ở liều lượng thấp, phenylpropanolamin được sử dụng để điều chỉnh huyết áp trong cơ thể và ảnh hưởng đến cơ trơn và các mô tim trực tiếp bằng cách tác động lên các thụ thể adrenergic. Đồng thời, chất cũng gián tiếp bằng cách khơi gợi sự giải phóng năng lượng hoặc ngăn chặn sự tái hấp thu của nó [122].

Fenfluramin tạo ra cảm giác no, giảm sự thèm ăn nhờ vào việc tăng giải phóng serotonin ở các synap thần kinh [88]. Nồng độ serotonin tăng dẫn đến kích hoạt thụ thể serotonin lớn hơn, từ đó dẫn đến tăng cường truyền serotonergic ở trung tâm của hành vi ăn ở vùng dưới đồi, điều này ngăn chặn sự thèm ăn carbohydrate. Đã có những nghiên cứu xác nhận khả năng giảm cân của phác đồ kết hợp fenfluramin và phentermin và năm 1992 [119]. Tuy nhiên, 2 hoạt chất này đã bị rút khỏi thị trường vì tác dụng tăng huyết áp động mạch phổi nghiêm trọng được ghi nhận vào năm 1997 [61].

1.3.3. Phenylpiperidine và dẫn xuất

Phenylpiperidine là một hợp chất hóa học có một vòng benzen liên kết với một vòng piperidin có tác dụng giảm đau và giảm cảm giác thèm ăn của con người. Phenylpiperidine là cấu trúc cơ bản cho nhiều loại opioid, chẳng hạn như meperidine, ketobemidone, alvimopan, loperamide và diphenoxylate.

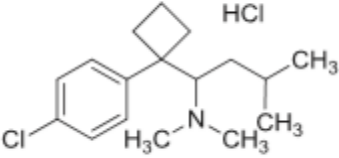
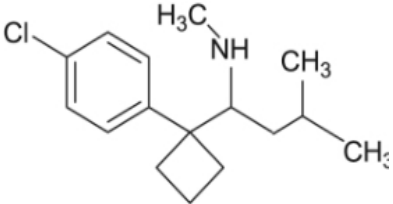
Loperamide là một dẫn xuất phenylpiperidine có cấu trúc hoá học tương tự như opiate, diphenoxylate và haloperidol. Loperamide liên kết với thụ thể opiate ở thành ruột, ức chế sự giải phóng acetylcholine và prostaglandin, do đó có thể kiểm soát được tình trạng tiêu chảy liên quan đến bệnh viêm ruột [15].

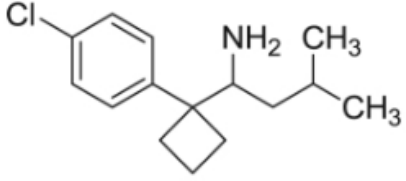
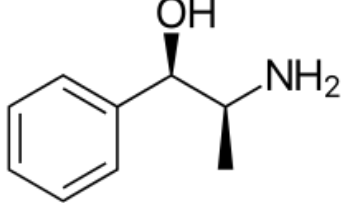
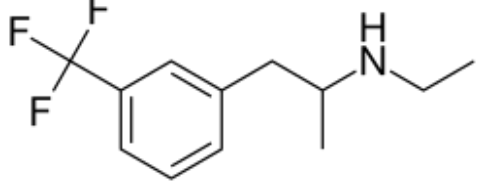
1.3.4. Sibutramin và dẫn xuất

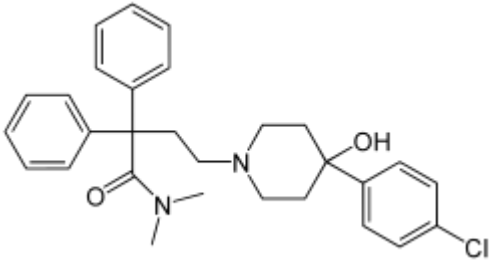
Sibutramin và dẫn xuất sibutramin là những chất ức chế tái hấp thu serotonin và norepinephrin, hỗ trợ điều trị béo phì được FDA phê duyệt năm 1997. Một số thử nghiệm lâm sàng đã chứng minh sibutramin còn có tác dụng cải thiện chuyển hóa lipid và chuyển hóa glucose ở người [91]. Tuy nhiên, năm 2010, hoạt chất này đã được công ty phát triển tự nguyện rút khỏi thị trường vì những báo cáo ghi nhận sibutramin làm tăng tỉ lệ xuất hiện các biến chứng tim mạch ở bệnh nhân tiểu đường [49].

Thông tin chung của một số chất cảm nhóm hỗ trợ giảm cân phổ biến sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện trong bảng 1.4.

Bảng 1.4. Cấu tạo, tính chất lý hoá của một số chất nhóm chất cảm hỗ trợ giảm cân

Tên chất	Công thức hóa học	Tính chất
Sibutramin	 <p>- CTPT: C₁₇H₂₆NCl - M: 279,8 g/mol - Tên IUPAC: (+/-)-1-(p-chlorophenyl)-α-isobutyl-N,N-dimethylcyclobutan-methylamin.</p>	<p><i>Tính tan:</i> Tan nhiều trong methanol, độ tan trong nước là 5,2 mg/mL <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 191-192 °C <i>Liều dùng:</i> 10- 20 mg/ngày. <i>Tác dụng dược lý:</i> Sibutramin là một chất ức chế tái thu hồi serotonin – noradrenalin, thúc đẩy giảm cân ở người béo phì. Đồng thời, làm giảm cảm giác thèm ăn, cho cảm giác no và gây ra sự sinh nhiệt. Trong cơ thể, sibutramin chuyển hóa nhanh chóng thành các chất chuyển hóa desmethyl: M1 (mono-desmethyl sibutramin) và M2 (di-desmethyl sibutramin) và sibutramin tác động dược lý chủ yếu thông qua 2 chất chuyển hóa này để gây ra tác dụng giảm cân [109].</p>
N- desmethyl sibutramin	 <p>- CTPT: C₁₆H₂₄NCl - M: 265,8 g/mol</p>	<p><i>Tính tan:</i> Tan nhiều trong methanol, DMSO; tan ít trong nước <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 242 °C <i>Tác dụng dược lý:</i> Desmethyl sibutramin làm giảm cảm giác thèm ăn, cho cảm giác no và gây ra sự sinh nhiệt. Chất gây ra tác dụng phụ là gây loạn thần.</p>

Tên chất	Công thức hóa học	Tính chất
	- Tên IUPAC: 1-[1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]-N,3-dimethylbutan-1-amin	Đồng thời, chất gây tăng nguy cơ tim mạch như tăng áp lực máu, nhịp tim và thương tăng nguy cơ đau tim cũng như đột quỵ.
Didesmethyl sibutramin	 - CTPT: C ₁₅ H ₂₂ NCl - M: 251,8 g/mol - Tên IUPAC: 1-[1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]-3-methylbutan-1-amine	<i>Tính tan:</i> Tan nhiều trong methanol, DMSO; tan ít trong nước <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 160-166°C <i>Tác dụng dược lý:</i> Didesmethyl sibutramin làm giảm cảm giác thèm ăn, cho cảm giác no và gây ra sự sinh nhiệt. Chất gây ra tác dụng phụ là gây loạn thần.
Phenylpropanolamin	 - CTPT: C ₉ H ₁₃ NO - M: 151,21 g/mol - Tên IUPAC: (1S,2R)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol	<i>Tính tan:</i> Tan nhiều trong ethanol và nước <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 194 °C <i>Tác dụng dược lý:</i> Phenylpropanolamin là chất được sử dụng như một chất ức chế thông mũi và giảm cảm giác thèm ăn [84].
Fenfluramin	 - CTPT: C ₁₂ H ₁₆ NF ₃ - M: 231,26 g/mol	<i>Tính tan:</i> Tan nhiều trong ethanol, ít tan trong nước <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 160-170 °C <i>Tác dụng dược lý:</i> Fenfluramin được chỉ định điều trị các cơn co giật liên quan đến hội chứng

Tên chất	Công thức hóa học	Tính chất
	- Tên IUPAC: (1S,2R)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol	Dravet và là chất ức chế sự thèm ăn trong điều trị bệnh béo phì nhưng đã bị thu hồi do gây ra độc tính tim mạch.
Loperamid	 <p>- CTPT: C₂₉H₃₃N₂ClO₂ - M: 477,0 g/mol - Tên IUPAC: 4-[4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl]-N,N-dimethyl-2,2-diphenylbutanamide</p>	<p><i>Tính tan:</i> Tan nhiều trong ethanol, methanol, nước <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 220- 228 °C <i>Tác dụng dược lý:</i> Loperamid được sử dụng để kiểm soát và giảm triệu chứng tiêu chảy cấp tính và mãn tính. Chất cũng có tác dụng chống tăng huyết áp, giảm đau và không gây ra tác dụng phụ [48].</p>

1.3.5. Tình trạng sử dụng chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân

- *Tình trạng sử dụng chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân trên thế giới*

Trên thế giới, việc trộn lẫn sibutramin và dẫn xuất vào mẫu TPBVSK có tác dụng giảm cân diễn ra khá phổ biến. Tại Bulgaria, một nghiên cứu phân tích sibutramin trong 10 mẫu thực phẩm chức năng thảo dược dùng để giảm cân bằng phương pháp UPHLC- MS/MS và UHPLC- HR/MS. Kết quả thu được cho thấy 2/10 mẫu thu thập được có chứa hàm lượng sibutramin lần lượt là 5 µg/viên và 20 µg/viên [34]. Việc bổ sung sibutramin gây ra tác dụng phụ nghiêm trọng và ảnh hưởng tới sức khỏe lâu dài.

Tại Indonesia, Wisnu và cộng sự [115] đã phát hiện sibutramin trong 10/10 mẫu thực phẩm chức năng thảo dược có hàm lượng trong khoảng 3,50 – 19,5 µg/mL được mua tại thành phố Manado bằng phương pháp quang phổ UV-Vis. Đồng thời, Hayun cùng cộng sự đã ứng dụng phương pháp TLC phát hiện sibutramine tại bước

sóng 277 nm bằng thuốc thử Dragendorff. Kết quả nghiên cứu đã phát hiện sibutramine trong 6 mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe với hàm lượng dao động từ 3,43 đến 26,2 mg/viên [42].

Tại Trung Quốc, Khazan và các cộng sự đã phát hiện sibutramine bằng phương pháp GC-MS trong 6/8 mẫu TPBVSK có tác dụng giảm cân bị nghi ngờ tại nhà thuốc và chợ. Nghiên cứu phát hiện phenolphthalein trong 3/8 mẫu với hàm lượng 233-1170 mg/viên, bumetanide trong 5/8 mẫu với hàm lượng 1,60- 3,80 mg/viên [60].

- *Tình trạng sử dụng chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân tại Việt Nam*

Tại Việt Nam, tính đến hiện nay số nghiên cứu đã công bố phát hiện các chất nhóm hỗ trợ giảm cân TPBVSK rất ít. Năm 2020, Mai Hoa cùng cộng sự đã phát hiện 4 mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân chứa sibutramin với hàm lượng 2,20- 11,9 mg/g và 1 mẫu chứa desmethyl sibutramine với hàm lượng 2,06 mg/g bằng phương pháp LC-MS/MS [5].

Việt Nam đã có nhiều ca ngộ độc, cấp cứu đã xảy ra do sử dụng sản phẩm giảm cân. Hầu hết nguyên nhân đều do sử dụng các sản phẩm chứa chất cấm như sibutramin và để lại hậu quả, ảnh hưởng đến sức khỏe của người sử dụng. Năm 2022, Trung tâm Chống độc (Bệnh viện Bạch Mai) đã tiếp nhận một bệnh nhân nữ vào cấp cứu trong tình trạng hôn mê, co giật sau 4 ngày uống cà phê giảm cân. Bệnh nhân được người nhà đưa vào bệnh viện huyện, sau đó chuyển thẳng đến Bệnh viện Bạch Mai trong tình trạng khó thở, hôn mê và co giật. Kết quả chụp cắt lớp còn cho thấy não bị tổn thương. Theo kết quả giám định của Viện Pháp Y cho thấy trong loại cà phê giảm cân mà bệnh nhân sử dụng có chứa sibutramin, một chất bị Bộ Y tế cấm sử dụng trong tân dược, TPBVSK vì những tác dụng nguy hiểm tới sức khỏe người dùng. Sibutramin có nhiều độc tính và tác dụng phụ, nguy cơ biến chứng về tim mạch, đặc biệt là đột quỵ và nhồi máu cơ tim cho nên cả Mỹ và châu Âu đã ngừng sử dụng từ năm 2010 [38].

Năm 2024, Bệnh viện Bạch Mai đã tiếp nhận các trường hợp bệnh nhân bị ngộ độc do sử dụng sản phẩm giảm cân có chứa chất cấm sibutramin. Sau 10 ngày sử dụng sản phẩm, bệnh nhân có hiện tượng bị đau dây chằng, sau 2 tuần sử dụng,

mắt đột ngột không nhìn thấy gì. Bệnh nhân mới sử dụng sản phẩm giảm cân khoảng 10 ngày đã có các biểu hiện về thần kinh, mất, tổn thương não rất rõ ràng, nếu dùng kéo dài có thể gây ảnh hưởng đến tính mạng. Khai thác tiền sử bệnh nhân, các bác sĩ được biết bệnh nhân có uống “thuốc” giảm cân có tên Detox Táo. Xét nghiệm loại “thuốc” này phát hiện có chứa chất cấm sibutramin [13].

Việc bổ sung sibutramin trái phép gần đây đã được phát hiện trong nhiều loại TPBVSK ảnh hưởng nghiêm trọng sức khỏe người tiêu dùng. Vào năm 2010, sibutramin đã bị rút khỏi thị trường Châu Âu (Cơ quan Dược phẩm Châu Âu 2010) và Hoa Kỳ (FDA 2010) vì tỷ lệ rủi ro cao và khả năng gây ra các biến chứng tim mạch hoặc đột quy.

1.4. Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường

Bệnh đái tháo đường (tiểu đường) là một bệnh liên quan rối loạn chuyển hóa đường, xảy ra khi cơ thể mất khả năng điều hòa nồng độ glucose trong máu do không thể sản xuất đủ insulin hoặc không thể sử dụng insulin một cách hiệu quả. Tính đến năm 2019, ước tính có khoảng 463 triệu người mắc bệnh tiểu đường trên toàn thế giới (8,8% dân số trưởng thành), trong đó đái tháo đường type 2 chiếm khoảng 90% các trường hợp, và xu hướng cho thấy tỷ lệ mắc đái tháo đường sẽ tiếp tục tăng [110]. Năm 2019, bệnh tiểu đường dẫn đến khoảng 4,2 triệu ca tử vong. Đây là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ 7 trên toàn cầu.

Hiện nay, trên thế giới tỷ lệ người mắc bệnh đái tháo đường đang tăng lên nhanh chóng. Tỷ lệ hiện mắc bệnh đái tháo đường chuẩn hóa trên toàn cầu tăng từ 4,3% vào năm 1980 lên 9,0% (7,2 - 11,1) vào năm 2014 ở nam giới và từ 5,0% lên 7,9% ở phụ nữ. Số người lớn mắc đái tháo đường trên thế giới tăng từ 108 triệu người năm 1980 lên 422 triệu người năm 2014. Tỷ lệ mắc đái tháo đường trên thế giới năm 2000 là 171 triệu người, năm 2003 tăng lên 194 triệu người và năm 2006 đã tăng lên tới 246 người và theo dự báo đến năm 2025 sẽ tăng lên 380 - 399 triệu người [7].

Theo nghiên cứu của Vũ Thị Thanh Huyền và cộng sự (2015) điều tra dịch tễ học trên 2402 đối tượng tại Hà Nội cho thấy tỷ lệ đái tháo đường là 7,9%; tuổi mắc đái tháo đường chủ yếu trên 45 tuổi (85%). Tỷ lệ mắc đái tháo đường ở nam và nữ là

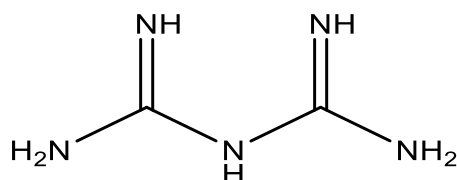
tương đương nhau (91,4% và 92,5%); người lao động chân tay có tỷ lệ mắc bệnh đái tháo đường thấp hơn hẳn so với người không lao động chân tay, có công việc tĩnh tại (7,4% so với 9,2%). Người trên 45 tuổi có tăng huyết áp, tiền sử rối loạn lipid máu thì nguy cơ mắc đái tháo đường cao hơn những người không có tiền sử tăng huyết áp và rối loạn lipid máu, tương ứng là 4,42 lần và 3,45 lần ($p < 0,01$). Người có chỉ số khối lượng cơ thể ≥ 23 có nguy cơ mắc đái tháo đường cao gấp 1,81 lần so với người có chỉ số khối lượng cơ thể < 23 ($p < 0,01$) [6].

Phác đồ điều trị đái tháo đường được xây dựng dựa trên việc kết hợp chế độ vận động, chế độ ăn uống và sử dụng thuốc. Tuy nhiên, bên cạnh việc sử dụng thuốc trong điều trị tiểu đường, trên thị trường hiện nay có nhiều sản phẩm được quảng cáo có nguồn gốc tự nhiên giúp hỗ trợ điều hòa lượng đường huyết. Một số sản phẩm trong đó có bổ sung các hoạt chất trong thành phần một cách trái phép, không đúng với quy định của cơ quan quản lý. Điều này gây ra những khó khăn trong việc kiểm soát điều trị ở bệnh nhân cũng như các vấn đề khác về sức khỏe.

Nhóm chất cấm hỗ trợ tiểu đường được phân loại thành 7 nhóm hoạt chất khác nhau theo tác dụng dược lý được sử dụng trong điều trị tiểu đường. Trong các nhóm này, nhóm hoạt chất được sử dụng phổ biến nhất phải kể tới nhóm hoạt chất họ biguanid (metformin) và nhóm hoạt chất họ sulfonylureas (glibenclamide, gliclazide). Việc sử dụng những thuốc này trong điều trị tiểu đường cần phải có sự hướng dẫn của người có chuyên môn, đồng thời cũng cần có sự kiểm soát và theo dõi chặt chẽ.

1.4.1. Nhóm hoạt chất biguanid

Biguanid là hợp chất do sự ngưng tụ của hai phân tử guanidin với việc loại bỏ amoniac (Hình 1.2). Các hoạt chất nhóm biguanid là các dẫn chất thế nito từ phân tử biguanid.



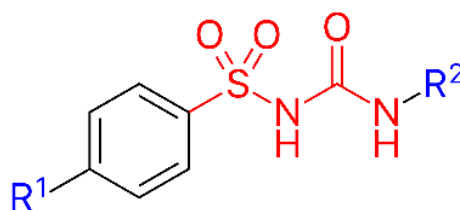
Hình 1.2. Cấu trúc phân tử biguanid

Cơ chế tác dụng của nhóm biguanide làm giảm tân tạo glucose ở gan và ức chế hấp thu glucose ở đường tiêu hóa, làm tăng bắt giữ glucose ở cơ vân. Nhóm Biguanide được chỉ định cho đái tháo đường type 2, nhất là bệnh nhân có thừa cân hoặc béo phì. Tuy nhiên, nhóm biguanide có tác dụng phụ trên đường tiêu hóa như chán ăn, buồn nôn, nôn, đầy bụng, ỉa chảy, ... với tỷ lệ xảy ra ở 20% bệnh nhân. Đồng thời, gây ra thiếu vitamin B12 khi điều trị kéo dài. Đặc biệt, nhóm biguanide có tác dụng gây nhiễm toan acid lactic máu.

Có 3 hoạt chất nhóm biguanide đã từng được sử dụng là 1,1dimethylbiguanide (metformin), 1-(2-phenylethyl)biguanide (phenformin) và 1-butylobiguanide (buformin). Trong đó, metformin hiện nay vẫn là một trong những thuốc được sử dụng rất phổ biến nhất trong điều trị tiểu đường. Hai hoạt chất còn lại: phenformin và buformin đều đã bị cấm sử dụng do các vấn đề độc tính liên quan tới rối loạn chuyển hóa acid lactic.

1.4.2. Nhóm hoạt chất sulfonylureas

Từ quan điểm hóa học, các hoạt chất hạ đường huyết sulfonylureas là các chất được gắn nhóm thế ở vị trí p của vòng benzen (R^1), nhóm thế ở N' của phần khung Ure (R^2) trong vòng arylsulfonylureas. Tính chất hạ đường huyết của những chất có khung cấu trúc sulfonylurea được phát hiện năm 1942, và được nghiên cứu ứng dụng để sử dụng làm thuốc mạnh mẽ trong giai đoạn 1950-1960.

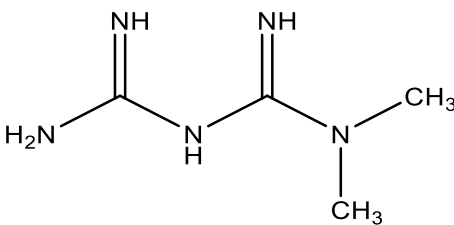
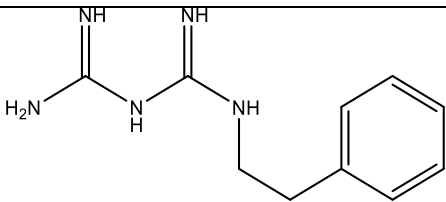


Hình 1.3. Cấu trúc chung của sulfonylureas

Các hoạt chất sulfonylureas thế hệ đầu tiên bao gồm: tolbutamide, carbutamide, chlorpropamide, tolazamide, acetohexamide. Quá trình phát triển các hoạt chất tiếp theo đó đã hình thành nhóm sulfonylureas thế hệ thứ 2: glibenclamide, glipzide, gliclazide,...

Cơ chế tác dụng của các hoạt chất sulfonylureas là làm tăng tiết insulin từ các tế bào β tụy [2]. Các hoạt chất được chỉ định cho đái tháo đường type 2 béo phì hoặc khi bệnh nhân có chế độ ăn, luyện tập không có hiệu quả. Nhóm gây ra tác dụng phụ như hạ glucose huyết, rối loạn tiêu hóa, dị ứng và tăng men gan.

Bảng 1.5. Cấu tạo, tính chất lý hoá của một số chất nhóm chất cảm hỗ trợ tiểu đường

Tên chất	Công thức hóa học	Tính chất
Metformin	 <p>- CTPT: $C_4H_{11}N_5$ - M: 129,16 g/mol - Tên IUPAC: 3-(diaminomethylidene)-1,1-dimethylguanidine.</p>	<p><i>Tính tan:</i> Hòa tan trong methanol, nước và không tan trong acetone, chloroform và ether. <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 223- 226 °C <i>Liều dùng:</i> 500- 2500 mg/ngày <i>Tác dụng dược lý:</i> Metformin cơ chế làm tăng sử dụng glucose ở tế bào; cải thiện liên kết của insulin với thụ thể; ức chế tổng hợp glucose ở gan và làm giảm hấp thụ ở ruột. Metformin làm giảm sự tăng đường huyết nhưng không gây tai biến hạ đường huyết. Đặc biệt làm giảm nồng độ glucose cả khi đói và sau bữa ăn của người bệnh đái tháo đường loại II.</p>
Phenformin	 <p>- CTPT: $C_{10}H_{15}N_5$ - M: 205,26 g/mol - Tên IUPAC: 1-(diaminomethylidene)-2-(2-phenylethyl)guanidine</p>	<p><i>Tính tan:</i> Hòa tan trong nước và methanol; ít tan trong chloroform và ether <i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 176,5 °C <i>Tác dụng dược lý:</i> Phenformin chủ yếu ức chế quá trình tân tạo glucose và quá trình chuyển glycogen thành glucose, tăng tổng hợp glycogen nội bào, tăng độ nhạy cảm với tác động của insulin tại gan. Tuy nhiên,</p>

Tên chất	Công thức hóa học	Tính chất
<p data-bbox="228 757 421 790">Glibenclamid</p>	<div data-bbox="443 510 922 745" style="text-align: center;"> </div> <p data-bbox="459 808 914 1099"> - CTPT: $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ - M: 494,0 g/mol - Tên IUPAC: 5-chloro-N- [2-[4-(cyclohexylcarbamoylsulfamoyl) phenyl] ethyl]-2-methoxybenzamide </p>	<p data-bbox="946 342 1473 432">phenformin không còn được sử dụng vì gây nhiễm toàn acid lactic máu.</p> <p data-bbox="946 450 1473 533"><i>Tính tan:</i> Hòa tan trong methanol, ethanol; ít tan trong nước.</p> <p data-bbox="946 551 1473 584"><i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 169- 170 °C</p> <p data-bbox="946 602 1473 790"><i>Tác dụng dược lý:</i> Glibenclamid là hoạt chất sulfonyleureas có tác dụng làm giảm nồng độ glucose trong máu, tăng giải phóng insulin.</p>
<p data-bbox="252 1417 397 1451">Gliclazide</p>	<div data-bbox="451 1193 898 1406" style="text-align: center;"> </div> <p data-bbox="459 1440 914 1731"> - CTPT: $C_{15}H_{21}N_3O_3S_3$ - M: 323,4 g/mol - Tên IUPAC: N-(hexahydrocyclopenta [c]pyrrol-2(1H)-ylcarbamoyl)-4-methylbenzenesulfonamide </p>	<p data-bbox="946 1137 1473 1272"><i>Tính tan:</i> Hòa tan trong dichloromethane; ít tan trong ethanol và nước.</p> <p data-bbox="946 1290 1473 1323"><i>Nhiệt độ nóng chảy:</i> 163- 172 °C</p> <p data-bbox="946 1341 1473 1485"><i>Tác dụng dược lý:</i> Gliclazid làm giảm đường huyết bằng cách kích thích tiết insulin từ các tế bào β của đảo tụy.</p>

Hiện nay, 2 hoạt chất glibenclamide và gliclazide cũng là một trong những thuốc được sử dụng phổ biến nhất trong điều trị đái tháo đường, cũng như bị trộn lẫn trái phép trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Thông tin chung của một số chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường phổ biến sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện trong bảng 1.5.

1.4.3. Tình trạng sử dụng các chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường

- *Tình trạng sử dụng chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường trên thế giới*

Trên thế giới, phenformin bắt đầu được lưu hành để điều trị đái tháo đường vào năm 1957. Những báo cáo ADR đầu tiên của thuốc này được ghi nhận lần đầu vào năm 1963. Kể từ năm 1970, do liên quan đến việc gây nhiễm toan chuyển hóa (đã ghi nhận các ca tử vong), thuốc đã bị thu hồi ở nhiều quốc gia như Hoa Kỳ, Canada, New Zealand, Brazil, Ethiopia, 15 nước ở Châu Âu và 6 nước ở Châu Á [93]. Mặc dù tất cả các thuốc nhóm biguanid đều có thể gây ra nhiễm toan lactic, phenformin được cho là thuốc có nguy cơ gây phản ứng cao nhất. Tần suất xảy ra phản ứng khi sử dụng metformin từng được ghi nhận tại Thụy Sĩ và Thụy Điển lần lượt là 0,067 và 0,084 ca/1000 bệnh nhân mỗi năm, trong khi đó, tần suất với phenformin cao hơn khoảng 8 - 10 lần [25]. Bên cạnh đó, nhiễm toan lactic thường bị chẩn đoán nhầm và do vậy không được xử trí kịp thời, đặc biệt trên đối tượng bệnh nhân cao tuổi do bị nhiều bởi nhiều bệnh lý khác nhau.

- *Tình trạng sử dụng chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường tại Việt Nam*

Những năm gần đây, Việt Nam xuất hiện các trường hợp bệnh nhân nhập viện do sử dụng thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa chất cấm. Năm 2018, một bệnh viện đã ghi nhận 3 bệnh nhân nhập viện trong tình trạng nặng như nhiễm toan máu và suy đa tạng. Các bệnh nhân này sau đó đều được chẩn đoán toan chuyển hóa do ngộ độc phenformin/ Đái tháo đường tuýp 2. Cục Quản lý Y Dược Cổ truyền - Bộ Y tế cũng đã có công văn số 554/YDCT-QLD về việc thu hồi với chế phẩm “Viên thuốc màu xám” dựa trên kết quả kiểm nghiệm cho thấy mẫu thử dương tính với phenformin. Bên cạnh đó, Cục An toàn thực phẩm đã xử lý và thu hồi các sản phẩm hỗ trợ ổn định đường huyết chứa chất cấm trên thị trường.

Trong danh mục chất cấm quy định tại Thông tư số 10/2021/TT-BYT, hiện nay có tổng số 03 chất thuộc nhóm Biguanid hỗ trợ bệnh tiểu đường là Metformin, Phenformin và Bufomin.

1.5. Các phương pháp xác định chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

1.5.1. Phương pháp điện hóa

Các cảm biến điện hóa được nghiên cứu và ứng dụng từ lâu và vẫn luôn thu hút được sự quan tâm của các phòng thí nghiệm cũng như các hãng sản xuất. Các cảm biến điện hóa có ưu điểm là phân tích nhanh, có độ chọn lọc, độ nhạy cao và thường có kích thước nhỏ gọn, có thể phân tích tại hiện trường. Tuy nhiên, cảm biến điện hóa không phân tích được đồng thời nhiều chất phân tích.

Phương pháp điện hóa đã được nghiên cứu sử dụng để xác định nhóm PDE-5i (sibutramine, sildenafil, vardenafil) trong các sản phẩm TPBVSK, các mẫu được phẩm hỗ trợ giảm cân. Điện cực sử dụng có thể bằng điện cực nano cacbon kết hợp với natri và photpho (Na/P-CNTs) [19], điện cực than thủy tinh biến tính bằng graphen mực [104], điện cực carbon thủy tinh biến tính bằng nano sắt từ [89], điện cực vàng và điện cực vàng biến tính bằng cysteine [72] hay điện cực bạch kim biến tính bằng nano polypyrrol với kỹ thuật đo điện hóa xung vi sai [55]. Giới hạn phát hiện của phương pháp dao động tùy vào các điện cực, từ 1,01 mg/L đến 0,005 µg/mL, độ thu hồi trong khoảng từ 93% đến 104% [19], [72], [89], [104].

Phương pháp này cũng được sử dụng để phân tích Metformin trong mẫu nước tiểu và dược phẩm với điện cực dán cacbon sử dụng kỹ thuật đo von kế. Tín hiệu thu được khi điện thế quét từ 0,2 V đến 1,0 V với phép đo điện thế xung vi sai, đỉnh Metformin thu được ở + 0,8 V và giới hạn phát hiện của Metformin là 14 nM. Độ tuyến tính được xác định từ 0,1 đến 80 µM với hệ số tương quan $R^2 = 0,995$, độ lệch chuẩn RSD < 3,9% và độ thu hồi nằm trong khoảng 92,4 đến 104,6% [83].

Phương pháp điện hóa với một điện cực mới được biến đổi so với điện cực dán carbon đã xác định Gliclazide và Glibenclamide trong chế phẩm thuốc. Hai hợp chất được xác định đồng thời bằng việc ghi lại hiệu điện thế xung vi phân với điện thế từ 0,5V đến 1,1 V. Giới hạn phát hiện Gliclazide và Glibenclamide lần lượt là $1,2 \cdot 10^{-7}$ M và $8,0 \cdot 10^{-7}$ M. Độ tuyến tính từ $7,5 \cdot 10^{-7}$ - $5,0 \cdot 10^{-4}$ M (Gliclazide) và $1,0 \cdot 10^{-6}$ -

$8,0 \cdot 10^{-4}$ M (Glibenclamide) với hệ số tuyến tính $R^2 = 0,998$, độ lệch chuẩn RSD < 3,3% [97].

1.5.2. Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử

Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử là phương pháp phân tích dựa trên cơ sở mật độ quang của dung dịch tỷ lệ với nồng độ của chất phân tích (chất phân tích có tính chất quang học như tính hấp thụ quang, tính phát quang...). Các phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử khá đơn giản, dễ tiến hành, được ứng dụng nhiều trong phân tích dược phẩm và mẫu sinh học đối với các chất phân tích hấp thụ ánh sáng UV-Vis. Một số công trình nghiên cứu sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử để xác định các chất cấm trong TPBVSK, đối tượng phân tích là các mẫu dược phẩm được tóm tắt trong bảng 1.6.

Bảng 1.6. Tóm tắt một số nghiên cứu xác định các chất cấm bằng phương pháp quang phổ

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Thuốc thử	LOD	TL
Nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý	Sildenafil, vardenafil	Dược phẩm	- Hỗn hợp kali iodua, kali idat - Bước sóng 285 nm (vardenafil), 288 nm (sildenafil)	0,04- 0,07 $\mu\text{g/mL}$	[105]
	Vardenafil	Dược phẩm	- N-bromosuccinimid	-	[103]
Nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân	Phenylpropanolamin	Dược phẩm	- 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinon, acetaldehyd - Bước sóng 650 nm	0,244 $\mu\text{g/mL}$	[116]
	Sibutramin	Viên nang	- Bước sóng 223 nm	0,30 $\mu\text{g/mL}$	[79]
Nhóm chất cấm hỗ trợ tiêu đường	Metformin, Rosiglitazol	Dược phẩm	- Bước sóng: 227 nm	-	[94]
	Metformin, Glibenclamide	Dược phẩm	- 9,10-phenanthraquinone trong môi trường kiềm - Bước sóng 416 nm	0,003 -0,01 $\mu\text{g/mL}$	[15]
	Phenformin	Dược phẩm	- Natri nitroprusside trong môi trường kiềm	0,13 $\mu\text{g/mL}$	[118]
	Metformin, Rosiglitazol	Dược phẩm	- Bước sóng 236 nm	-	[75]

1.5.3. Phương pháp điện di mao quản

Bảng 1.7. Tóm tắt một số nghiên cứu xác định các chất cấm bằng phương pháp điện di mao quản

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Kỹ thuật điện di	Kết quả	TL
Nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý	Vardenafil	Dược phẩm	- CZE- UV - Dung dịch đệm phosphate 100 mM, pH 6 - Bước sóng 222 nm	- LOD: 0,042 µg/mL - Độ thu hồi: 98,4% - RSD: 3,4%	[46]
	Sildenafil, vardenafil	Dược phẩm	- CE- C ⁴ D - Dung dịch đệm acid acetic 500mM, pH 2,5	- LOD: 0,90 mg/L - R ² = 0,998	[98]
	Sildenafil, vardenafil, tadalafil	Dược phẩm	- MEKC-PDA - Dung dịch đệm phosphat 10 mM, natri dodecyl sulfat 25 mM, pH 12	- LOD: 0,19- 0,61 mg/L - Khoảng tuyến tính: 1- 20 mg/L - Độ thu hồi: 98- 107% - RSD < 2,9%	[36]
	Sildenafil	Dược phẩm	- CZE- UV - Dung dịch đệm NaH ₂ PO ₄ 60 mM, pH 5	- Khoảng tuyến tính: 0,070- 1,05 g/L - Độ thu hồi: 97,4% - R ² = 0,9985 - RSD < 4,7%	[70]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Kỹ thuật điện di	Kết quả	TL
	Tadalafil	Dược phẩm	- CZE- UV - Dung dịch đệm phosphat 50 mM, pH 3,0 - Bước sóng 254 nm	- LOD: 0,20 mg/mL - Khoảng tuyến tính: 0,2- 5,0 mg/mL - Độ thu hồi: 99,5% - $R^2 = 0,9998$	[18]
Nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân	Các chất đối quang của fenfluramin	Dược phẩm	- CZE - Dung dịch đệm Tris/phosphate 10 mM, pH 2,5	- Khoảng tuyến tính: 0,50- 12,5 $\mu\text{g/mL}$ - $R^2 > 0,999$ - RSD $< 0,77\%$	[96]
	Sibutramin, phenolphthalein	TPBVSK	- CE- UV - Dung dịch đệm phosphate 20 mM, natri dodecyl sulphat 20 mM, pH 11 - Bước sóng 223 nm	- LOD: 0,03- 0,18 $\mu\text{g/mL}$ - Khoảng tuyến tính: 0,1- 50 $\mu\text{g/mL}$ - Độ thu hồi: 95,3- 103,4%	[117]
	Fenfluramin, pseudoephedrin, norpseudoephedrin, amfepramon, sibutramin, sildenafil, strychnin	TPBVSK	- CE- UV - Dung dịch đệm natri tetraborate 20 mM, natri dodecyl sulfat 10 mM, acetonitril 5%, pH 9 - Bước sóng 195 nm	- LOD: 100 mg/L - $R^2 > 0,998$ - Độ thu hồi: 79,6- 112% - RSD $< 7,9\%$	[71]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Kỹ thuật điện di	Kết quả	TL
	Đồng phân đối quang của sibutramin	-	- CE – UV - Dung dịch đệm phosphate 50 mM, pH 4,5 - Bước sóng 220 nm	- LOD: 3,4- 3,7 µg/mL - RSD < 2%	[40]
	Sibutramin	Dược phẩm	- CZE-DAD - Dung dịch đệm phosphate 50 mM, pH 7,0 - Bước sóng 225 nm	- R ² > 0,998 - Độ thu hồi: 80- 120%	[108]
	Sibutramin và dẫn xuất, phentermin	TPBVSK	- CZE-MS - Dung dịch đệm HCOONH ₄ 20mM trong acetonitrile, pH 8	- LOD: 1,00- 750 µg/g - Khoảng tuyến tính: 0,025- 125 mg/g - RSD < 20%	[16]
Nhóm chất cấm hỗ trợ tiểu đường	Rosiglitazon, metformin	Dược phẩm	- CZE- UV - Dung dịch đệm acetat 25mM, pH 4,0 - Bước sóng 203 nm	- LOD: 0,5 µg/mL - Khoảng tuyến tính: 100- 1200 µg/mL - RSD = 0,78%	[123]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Kỹ thuật điện di	Kết quả	TL
Nhóm chất cấm hỗ trợ tiểu đường	Metformin và sản phẩm chuyển hóa	Thực phẩm	- CZE- MS - Dung dịch đệm amoniacetat, pH 7,0	- LOD: 12,2- 15 µg/L - Khoảng tuyến tính: 0,10- 40,0 µg/L - R ² = 0,998	[63]
	Gliclazide	Dược phẩm	- MEKC- PDA - Dung dịch đệm phosphat 10 mM, natri dodecyl sulfat 15 mM, pH 7,0 - Bước sóng 225 nm	- LOD: 40 µg/mL - Khoảng tuyến tính: 128- 192 µg/mL - R ² > 0,99 - RSD < 2,0%	[33]
	Metformin, phenformin, glyburid	Huyết tương	- CZE- UV - Dung dịch hỗn hợp đệm ACN, amoniacetat 5 mM, acid acetic 5% - Bước sóng 240 nm	- LOD: 0,1 µg/mL - Khoảng tuyến tính: 1,00- 15,0 g/mL - R ² > 0,96	[65]
	Acetohexamid, chlorpropamid, glibenclamid, tolbutamid	Dược phẩm	- CZE- UV - Dung dịch hỗn hợp đệm phosphate 100 mM; pH 7,5 - Bước sóng 200 nm	- LOD: 0,40 µg/mL - Khoảng tuyến tính: 40,0- 80,0 µg/mL - R ² > 0,999 - RSD < 1,6%	[64]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Kỹ thuật điện di	Kết quả	TL
	Metformin, phenformin	Huyết tương	<ul style="list-style-type: none"> - CZE- UV - Dung dịch hỗn hợp đệm phosphate 0,1 M; pH 2,5 - Bước sóng 195 nm 	<ul style="list-style-type: none"> - LOD: 0,25 µg/mL - Khoảng tuyến tính: 0,25- 3,50 µg/mL - $R^2 > 0,999$ 	[107]

Điện di mao quản (CE) là một kỹ thuật tách các chất dựa trên cơ sở sự di chuyển khác nhau của các phân tử chất (chủ yếu là các ion mang điện tích) trong dung dịch chất điện ly (thường là dung dịch đệm điện di), dưới tác dụng của điện trường E nhất định do nguồn thế cao một chiều (15- 40 kV) đặt vào hai đầu mao quản sinh ra. Kỹ thuật tách được nghiên cứu và phát triển đầu tiên bởi Tiselius (1937).

Phương pháp điện di mao quản (CE) gần đây được sử dụng rộng rãi để tách và xác định các chất cấm trong nhiều đối tượng mẫu khác nhau do có nhiều ưu điểm như hiệu quả tách cao, thời gian tách ngắn, lượng mẫu tiêu tốn ít. Tuy nhiên, phương pháp có độ nhạy thấp chưa phù hợp để phân tích một số chất cấm. Một số công trình nghiên cứu sử dụng phương pháp này được tóm tắt trong bảng 1.7.

1.5.4. Phương pháp sắc ký

Sắc ký là phương pháp dùng để tách các thành phần của một hỗn hợp dựa trên sự phân chia khác nhau của các chất vào hai pha luôn tiếp xúc nhưng không hòa tan vào nhau là pha tĩnh có bề mặt tiếp xúc lớn và pha động chạy qua pha tĩnh. Pha tĩnh có thể là một chất rắn (hạt xốp hay mịn) hay một chất lỏng (được giữ trên một chất mang). Khi pha động là chất lỏng, phương pháp được gọi là phương pháp sắc ký lỏng (LC), tương tự khi pha động là chất khí, phương pháp được gọi là phương pháp sắc ký khí (GC).

So với phương pháp GC, phương pháp LC được sử dụng phổ biến hơn trong phân tích các chất cấm trong mẫu TPBVSK. Trong phương pháp HPLC, tùy thuộc vào cấu trúc phân tử, tính chất hóa lý, nồng độ của các chất cấm mà lựa chọn các detector phù hợp để phát hiện như detector UV, DAD, MS, ... Một số nghiên cứu sử dụng phương pháp sắc ký xác định một số chất cấm trong mẫu dược phẩm và TPBVSK được tóm tắt trong bảng 1.8.

Bảng 1.8. Tóm tắt một số nghiên cứu xác định các chất cấm bằng phương pháp sắc ký

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Điều kiện phân tích	Kết quả	TLTK
Nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý	80 chất gồm sibutramin và dẫn xuất của sibutramin, nhóm PDE5i	TPBVSK	- LC-MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: ACN	- LOD: 0,01- 2 ng/mL - R ² > 0,999 - Độ thu hồi: 71,7- 119%	[52]
	Sildenafil	TPBVSK	TLC kết hợp tán xạ Raman tăng cường bề mặt	- LOD: 67 ng/vết	[10]
	38 chất	TPBVSK	- LC-ESI-MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOONH ₄ 2 mM Kênh B: ACN	- LOD: 0,004- 0,455 ng/mL - R ² > 0,999 - Độ thu hồi: 73,6- 111% - RSD < 10%	[67]
	7 chất	TPBVSK	- LC-DAD-Q-TOF - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: HCOOH 0,1%, ACN	- Độ thu hồi: 80,9- 108% - RSD < 11%	[24]
	18 chất	TPBVSK	- UPLC-MS/MS - Pha động: Kênh A: CH ₃ COOH 0,01%, HCOONH ₄ 2 mM Kênh B: ACN	- R ² > 0,996 - Độ thu hồi: 79,5- 114% - RSD < 18%	[99]

Nhóm chất cảm	Chất phân tích	Mẫu	Điều kiện phân tích	Kết quả	TLTK
Nhóm chất cảm hỗ trợ chức năng sinh lý	52 chất	TPBVSK	- HPLC-MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: HCOOH 0,1%, ACN	- LOD: 0,05- 3,33 ng/mL - R ² > 0,999 - Độ thu hồi: 83- 112% - RSD < 13%	[50]
	82 chất	TPBVSK	- HPLC-HR/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: HCOOH 0,1%, ACN	- Độ thu hồi: 92- 111%	[66]
	15 chất	TPBVSK	- UPLC-HR/MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1%, HCOONH ₄ 10 mM Kênh B: HCOOH 0,1%, HCOONH ₄ 10 mM trong MeOH: ACN (1:1, v/v)	-	[21]
	59 chất	TPBVSK	- UPLC- HR-MS/MS	- LOQ: 0,05- 0,25 mg/kg - Độ thu hồi: 71- 90% - RSD < 5,2%	[53]
	85 chất	TPBVSK	- UPLC-Orbitrap-MS	- LOQ: 0,24- 16,6 µg/kg - Độ thu hồi: 82- 118%	[69]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Điều kiện phân tích	Kết quả	TLTK
	Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil	TPBVSK	- LC-MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: HCOOH 0,1% trong MeOH	- LOD: 5,0- 20 µg/kg - Khoảng tuyến tính: 0,03- 20 µg/L	[9]
	Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil	Chế phẩm đông được	- LC-MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: ACN	- LOD: 0,5- 1,0 ng/mL - R ² > 0,996 - Độ thu hồi: 94- 99% - RSD < 4,7%	[11]
	Sildenafil, đồng phân của thiosildenafil	TPBVSK	- LTQ Orbitrap	-	[57]
Nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân	Sibutramin	TPBVSK	- TLC- UV - Pha động: Toluene- methanol - Bước sóng: 225 nm	-	[81]
	Sibutramin	TPBVSK	- TLC - Pha động: toluene-diethylamine (10:0,3, v/v)	- LOD: 217 ng/viên - Khoảng tuyến tính: 0,50- 5,00 µg/mL	[95]
	Sibutramin, phenolphthalein, bumetanid và phenytoin	TPBVSK	- GC-MS, LC-MS - Pha động của LC: MeOH/ H ₂ O, HCOONH ₄ 2mM (90:10, v/v)	-	[60]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Điều kiện phân tích	Kết quả	TLTK
Nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân	Fenfluramine, N-nitrosofenfluramin, sibutramin, mazindol, phenolphthalein	TPBVSK	- GC-MS/MS	- Độ thu hồi: 80,3- 111%	[121]
	Orlistat, cetilistat, sibutramin	TPBVSK	- HPLC-PDA - Pha động: ACN và H ₃ PO ₄ 0,02M	- LOD: 189 ng/g - Độ thu hồi: 96,1- 97,2% - R ² > 0,999	[124]
	Sibutramin, N-di-desmethylsibutramin	TPBVSK	- HPLC-UV-ESI-MS - Pha động: ACN và HCOOH 0,2%, CH ₃ COONH ₄ 20mM	- Khoảng tuyến tính: 0,025- 1,0 mg/mL - R ² > 0,999 - Độ thu hồi: 93- 106%	[45]
	Phentermin, fenfluramin, norfenfluramin	TPBVSK	- HPLC-FLD - Pha động: ACN, nước (65:35, v/v) - Bước sóng: 430 nm	- LOD < 23 fmol - Khoảng tuyến tính: 5- 2000 nM - R ² > 0,999	[54]
	Sibutramin, Orlistat, Phenolphthalein, Furosemid	TPBVSK	- LC-MS/MS - Pha động: Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: HCOOH 0,1% trong MeOH	- LOD: 5,00- 750 µg/kg - Khoảng tuyến tính: 0,05- 40 µg/L	[9]
	Sibutramin, N-desmethylsibutramin,	TPBVSK	- UPLC- Q-TOF/MS - Pha động:	- LOD: 0,4- 2,0 mg/kg - Độ thu hồi: 87,0- 113%	[102]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Điều kiện phân tích	Kết quả	TLTK
	sildenafil, vardenafil và tadalafil		Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: ACN, HCOOH 0,1%		
Nhóm chất hỗ trợ tiểu đường	Metformin, rosiglitazol	Dược phẩm	- HPTLC - Dung môi: MeOH: H ₂ O: NH ₄ Cl 1% (5:4:1, v/v/v)	- Khoảng tuyến tính: 20,0- 100 µg/vết	[75]
	14 chất hỗ trợ tiểu đường, 2 chất hỗ trợ giảm cân	TPBVSK	- LC-MS/MS - Pha động; Kênh A: HCOOH 0,1% Kênh B: HCOOH 0,1%, ACN	- Độ thu hồi: 88,0- 113% - RSD < 13%	[74]
	Metformin, vildagliptin, saxagliptin, alogliptin, sitagliptin, linagliptin	TPBVSK	- Rp-HPLC - Pha động: ACN: MeOH: HCOONH ₄ (25: 10: 65, v/v/v)	-	[106]
	Metformin, pioglitazon, glipizide và glimepirid	TPBVSK	- HPTLC- MS - Pha động: C ₆ H ₁₂ : CH ₂ Cl ₂ : C ₃ H ₇ OH: CH ₃ COONH ₄ bão hòa trong CH ₃ COOH	-	[30]
	26 chất trong nhóm chất hỗ trợ tiểu đường	TPBVSK	- UPLC - Pha động: Kênh A: H ₂ O Kênh B: ACN: H ₂ O (95: 5, v/v)	- LOD: 0,1- 1,7 µg/mL - R ² > 0,999 - Độ thu hồi: 83,0- 109% - RSD < 3,4%	[62]

Nhóm chất cấm	Chất phân tích	Mẫu	Điều kiện phân tích	Kết quả	TLTK
Nhóm chất hỗ trợ tiêu đường	Metformin, pioglitazon, sitagliptin, repaglinid, glibenclamid, gliclazid	Dược phẩm	- Rp-HPLC - Bước sóng 220 nm - Pha động: Kênh A: KH_2PO_4 0,05 M; natrioctansulphonate 0,01 (pH 3,55) Kênh B: ACN	- LOQ: 0,002- 0,024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - $R^2 > 0,999$	[35]
	Metformin hydroclorid, glibenclamid, gliclazid, glimepirid và glipizid	Chế phẩm dược liệu	- HPLC - Bước sóng 230 nm - Pha động: Kênh A: Đệm natri dihydrophosphat (pH 3) Kênh B: MeOH	- LOD: 0,025- 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - $R^2 > 0,997$ - Độ thu hồi: 97,0- 103% - RSD < 1,7%	[14]
	Glimepirid, glipizid, gliclazid, glibenclamid	Chế phẩm đông dược	- HPTLC - Bước sóng 235 nm - Pha động: HCOOH 0,5% trong n-butyl acetat	- LOD: 30- 180 ng/vết - $R^2 > 0,995$ - Độ thu hồi: 95,0 - 105% - RSD < 3,7%	[12]

Trên cơ sở kết quả tổng quan về phương pháp phân tích các nhóm chất cấm, có thể thấy đã có rất nhiều nghiên cứu được thực hiện để xác định hàm lượng các chất cấm trong TPBVSK. Các kỹ thuật phân tích được sử dụng là HPTLC, HPLC, GC,... Nhìn chung, phương pháp quang phổ và phương pháp điện hóa đơn giản, dễ tiến hành nhưng thường chỉ phát hiện được từng chất riêng rẽ hoặc bị ảnh hưởng nhiều bởi nền mẫu, độ nhạy của phương pháp và không phù hợp với phân tích đồng thời các chất cấm trong TPBVSK. Do vậy, phương pháp LC-MS/MS và LC-HR/MS được sử dụng phổ biến hơn cả, với tính ưu việt trong việc xác định đồng thời sự có mặt của nhiều chất cấm trong mẫu TPBVSK, kết quả phân tách tốt và độ chính xác, độ nhạy cao.

Với đặc điểm trộn trái phép nên hàm lượng các chất cấm có khoảng dao động khác nhau, thường có hàm lượng khá nhỏ. Do vậy, cần phát triển một phương pháp phân tích phù hợp với việc phân tích chất cấm có hàm lượng nhỏ và nền mẫu phức tạp. Nghiên cứu thực hiện đề tài dựa trên những ưu điểm nổi bật của phương pháp sắc ký lỏng, đã lựa chọn phương pháp sắc ký lỏng khối phổ và phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao để thực hiện phân tích mẫu.

1.6. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ

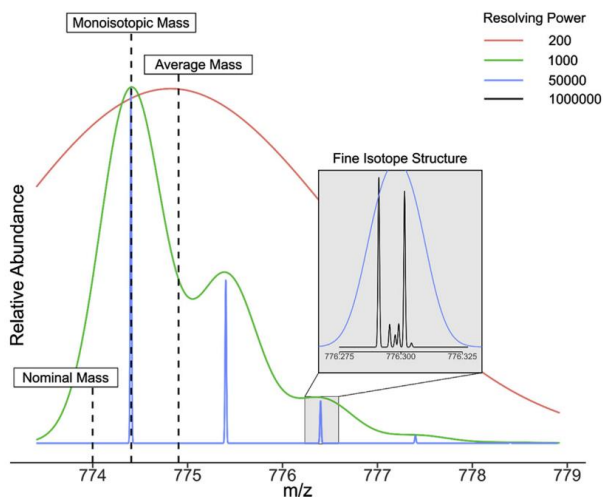
1.6.1. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC-HR/MS)

1.6.1.1. Khái niệm

a) Định nghĩa về khối lượng “mass”

Các thiết bị phân tích khối phổ hiện đại đều yêu cầu sự xác định chính xác về "khối lượng" của một phân tử cũng như khả năng đo đồng thời nhiều khối khác nhau. Phân biệt giữa khối lượng nguyên tử, khối lượng trung bình, khối lượng chính xác, khối lượng đơn đồng vị và khối lượng chính xác của một phân tử có thể gây hiểu nhầm trong việc thu thập dữ liệu, giải trình và báo cáo trong phân tích phổ khối lượng. Đơn vị SI của khối lượng là kilogram (kg), nhưng trong các phép đo ở quy mô nguyên tử/phân tử thường được sử dụng đơn vị khối lượng dalton (Da), được xác định là 1/12 khối lượng của một nguyên tử carbon 12 trung bình, với giá trị là $1,66 \times 10^{-27}$ kg. Hình 1.4 là ví dụ minh họa về các khối lượng, gồm có khối lượng danh nghĩa (nominal mass), đơn đồng vị (monoisotopic mass) và trung bình (average mass) trong phổ khối

lượng của một hợp chất chưa biết, trong đó, sự lệch nhau giữa các khối lượng có thể từ vài phần triệu đến một vài dalton [38].



Hình 1.4. Ví dụ minh họa về độ lệch khối giữa khối lượng danh nghĩa, khối lượng đơn đồng vị và khối lượng trung bình

b) Độ phân giải khối

Độ phân giải khối được IUPAC định nghĩa là tỷ lệ giữa khối lượng của một pic đo được và độ chênh lệch trong khối lượng giữa hai pic, hay được ký hiệu là $R = m/\Delta m$. Trong đó, m là khối lượng của pic và Δm là chiều rộng của pic hoặc khoảng cách giữa hai pic có độ cao tương đương mà đáy giữa chúng thấp hơn tối đa 10% [47].

Độ phân giải khối đo lường khả năng phân biệt hai pic có sự chênh lệch nhỏ về giá trị m/z . Độ phân giải này thường được thể hiện dưới dạng $m/\Delta m_{50\%}$, trong đó m là khối lượng của pic và $\Delta m_{50\%}$ là chiều rộng của pic ở nửa chiều cao tối đa tính theo đơn vị khối lượng.

Cho đến nay, hiệu năng của các công nghệ sản xuất thiết bị đạt độ phân giải khối cao ngày càng được cải thiện, với mục tiêu tăng cường khả năng phân biệt và tốc độ quét. Các thiết bị khối phổ hiện đại được phân chia thành các loại có độ phân giải khác nhau, từ thấp và trung bình (như bộ lọc tứ cực và bẫy ion) đến độ phân giải cao (như TOF), có khả năng phân giải từ hàng trăm đến hàng nghìn đơn vị. Công nghệ Orbitrap có khả năng phân giải khối lượng lên đến hàng trăm nghìn, trong khi FT-ICR có thể đạt được hàng triệu đơn vị [38, 47, 85].

1.6.1.2. Phân loại

Cơ chế phân tích khối lượng là điểm phân biệt của HR/MS, bao gồm tốc độ quét (chu kỳ làm việc), dải hoạt động, khả năng phân giải khối lượng (R), độ chính xác khối lượng và khả năng phân mảnh.

Hiện nay có ba kỹ thuật chính được sử dụng để tăng độ phân giải khối, gồm có:

- FT-ICR (Fourier-transform ion cyclotron resonance)
- TOF-MS (time-of-flight mass spectrometry)
- Orbitrap

Ba kỹ thuật này tuy có cơ chế khác nhau, nhưng mục tiêu chung vẫn là phân biệt được sự lệch khối đến vài phần triệu dalton.

a) FT-ICR (Fourier-transform ion cyclotron resonance)

FT-ICR là một loại phân tích phổ khối lượng được sử dụng để xác định tỷ lệ khối lượng-điện tích (m/z) của các ion dựa trên tần số xoay tròn của các ion trong một trường từ cố định, được phát minh bởi Melvin B. Comisarow và Alan G. Marshall tại Đại học British Columbia [28].

Phép đo phổ khối cộng hưởng cyclotron ion biến đổi Fourier (FT-ICR) dựa trên các phép đo của nó dựa trên dao động tuần hoàn của ion tích điện trong từ trường (tần số cyclotron). Dao động của các ion được phát hiện dưới dạng dòng điện nhất thời trong miền thời gian bao gồm tổng của tất cả các chuyển động của ion và được chuyển đổi thành các phép đo tần số bằng cách sử dụng biến đổi Fourier, tần số dao động có liên quan đến khối lượng ion tích điện và có mối quan hệ tỷ lệ giữa công suất phân giải và tốc độ quét [38].

b) TOF-MS (time-of-flight mass spectrometry)

TOF-MS là một phương pháp phân tích khối lượng dựa trên thời gian để bay từ nguồn ion đến bộ phát hiện. Trong đó, các ion được gia tốc bằng một trường điện đã biết, tạo ra năng lượng đồng đều cho chúng. Thời gian mà mỗi ion đến bộ phát hiện phụ thuộc vào tốc độ của nó, và do đó phản ánh tỷ lệ khối lượng-điện tích (m/z). Phương pháp này đã được phát minh từ những năm 1940 nhưng chỉ đến

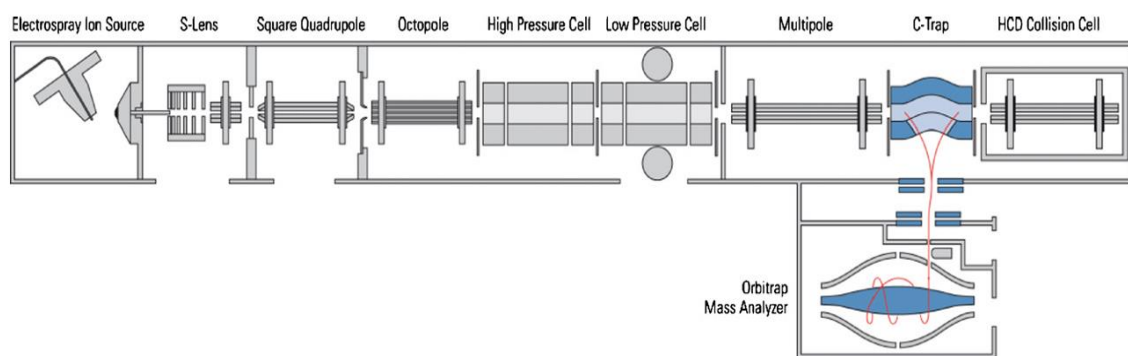
những năm 1990 mới trở nên phổ biến. Với những cải tiến gần đây về khoa học kỹ thuật như gia tốc vuông góc, gương ion và tốc độ cao của điện tử đã góp phần cải thiện đáng kể độ phân giải của TOF-MS [120].

c) Orbitrap

Orbitrap hoạt động dựa trên nguyên tắc của quỹ đạo ion, trong đó các ion được bắt giữ và quỹ đạo xung quanh một trục tạo thành bởi một điện trường, sử dụng cơ chế quỹ đạo để đo khối lượng của các ion. Các ion bị bắt giữ bởi một điện trường và quỹ đạo xung quanh trục. Sự dao động của các ion trong quỹ đạo tạo ra một tín hiệu điện tử, được ghi lại và chuyển thành phổ khối. Orbitrap có khả năng đo chính xác khối lượng của các ion với độ phân giải cao.

Máy phân tích khối lượng Orbitrap là kỹ thuật cải tiến của của hệ thống máy phân tích khối lượng bẫy. Orbitrap hoạt động vừa là máy phân tích khối lượng vừa là máy dò, dựa trên cấu hình của tế bào bẫy tĩnh điện của nó. Các ion được bơm thành từng gói vào máy phân tích và dao động dọc trục giữa tấm tích điện tĩnh điện bên ngoài và điện cực bên trong. Dòng điện tạo ra bởi các ion dao động được đo bằng thiết bị và phép biến đổi Fourier được áp dụng để xác định tần số ion riêng lẻ, tỷ lệ thuận với khối lượng ion chính xác. Khả năng phân giải khối lượng của thiết bị Orbitrap có liên quan đến số lượng “nhịp” dao động trong thời gian nhất thời, liên quan đến khối lượng của chất phân tích được đo. Kết quả là khả năng phân giải của các phân tử nhỏ cao hơn đáng kể, với khả năng phân giải hiệu quả giảm đi một nửa trong khoảng m/z 200 và m/z 1000. Máy phân tích quỹ đạo còn có khả năng phân giải khối động dựa trên thời gian quét, với khả năng phân giải cao nhất dựa trên mô hình. Công suất phân giải cao nhất được báo cáo cho các thiết bị Orbitrap là 1.000.000 (FWHM = m/z 200) ở tốc độ quét tương đối chậm, mặc dù chúng có thể đạt tốc độ quét 40 Hz khi công suất phân giải giảm. Điểm mạnh lớn nhất của máy phân tích khối lượng Orbitrap nằm ở khả năng đạt được khả năng phân giải khối lượng rất cao và độ chính xác khối lượng cao với kích thước để bàn. Khả năng phân giải tăng lên làm giảm khả năng xảy ra va chạm khối lượng trong phổ quét toàn bộ, cho phép phát hiện các khối lượng và cụm đồng vị khác biệt hơn, cũng như phân công phân tử chính

xác hơn. Hơn nữa, là thiết bị dựa trên bẫy, Orbitrap có thể đạt được độ nhạy rất cao bằng cách kéo dài thời gian thu thập ion để thu thập nhiều ion hơn và tạo ra phổ MS và MS/MS chất lượng cao hơn cho các tín hiệu ion rất yếu [58, 76-77].



Hình 1.5. Ví dụ minh họa cho sơ đồ bố trí của thiết bị Orbitrap

Thiết bị bao gồm thấu kính S, bộ lọc khối bốn cực, bẫy C, tế bào phân ly va chạm năng lượng cao (HCD) và máy phân tích khối Orbitrap là các thành phần chính (Hình 1.5) [78]. Thiết bị là một bẫy ion bao gồm một điện cực trung tâm hình trục chính và hai điện cực bên ngoài đối xứng bổ sung cho hình dạng của điện cực trung tâm và được sử dụng để phát hiện dòng điện hình ảnh và thiết lập trường bẫy ion. Cả hai điện cực phải được chế tạo với độ chính xác cao nhất để đạt được khả năng kiểm soát ion tốt nhất có thể. Hình dạng của bẫy liên quan chặt chẽ đến việc phát hiện dòng điện trong ảnh và sóng hài, do đó cần phải tối ưu hóa thêm. Thông thường, một khe được gia công phức tạp với bộ làm lệch hướng để cho phép truyền các ion bên ngoài và đồng thời giảm thất thoát ion trong quá trình phun. Thay vì sử dụng điện áp tần số vô tuyến hoặc từ trường để thu giữ các ion, người ta sử dụng trường tĩnh điện. Khi các ion đi vào máy phân tích và bắt đầu dao động xung quanh điện cực trung tâm, dòng điện hình ảnh sẽ được các tấm thu tiếp nhận và chịu sự biến đổi Fourier và hiệu chuẩn hai điểm để tạo ra phổ khối liên quan. Ngoài ra, một Bẫy C, như một thiết bị lưu trữ bên ngoài, đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát số lượng ion được bơm vào máy phân tích và cải thiện việc truyền ion bằng cách cung cấp một nơi để các ion tích tụ. Thành phần này cho phép thiết lập kết nối giữa máy phân tích Orbitrap hoạt động không liên tục và các nguồn ion hoạt động liên tục

để đạt được khả năng sử dụng tối ưu. Độ nhạy được nâng cao thông qua việc sử dụng phần lớn thời gian phân tích để tích lũy ion, bù đắp cho ảnh hưởng của dòng ion thấp như tốc độ thu thập chậm hơn và chất lượng quang phổ không thuận lợi, do đó cho phép giải quyết vấn đề sử dụng tốc độ thấp cho MS/MS.

1.6.2. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS)

1.6.2.1. Nguyên tắc cơ bản

Sắc ký lỏng (LC) là quá trình tách xảy ra trên cột tách với pha tĩnh là chất rắn và pha động là chất lỏng. Khi tiến hành sắc ký, các chất phân tích được phân bố liên tục giữa pha động và pha tĩnh. Do cấu trúc phân tử và tính chất lí hoá của các chất khác nhau, nên khả năng tương tác của chúng với pha tĩnh và pha động khác nhau. Do vậy, chúng di chuyển với tốc độ khác nhau và tách ra khỏi nhau.

Pha động trong HPLC có vai trò quan trọng trong việc tách các chất phân tích trong quá trình sắc ký. Có hai loại pha động: pha động có độ phân cực cao (sắc ký pha đảo) và pha động có độ phân cực thấp (sắc ký pha thuận). Có thể phối hợp 2 hay 3 dung môi và thay đổi thành phần dung môi theo thời gian gọi là rửa giải gradient.

Trong HPLC, bơm là bộ phận quan trọng hàng đầu. Bơm dùng trong sắc ký lỏng cần phải đáp ứng một số yêu cầu khá cao: tạo được áp suất cao, tạo dòng liên tục, không bị ăn mòn bởi nhiều loại dung môi. Hiện nay các thiết bị sắc ký lỏng hiện đại, bơm có thể tạo được áp suất rất cao lên đến hơn 15.000 psi.

Bộ phận bơm mẫu có nhiệm vụ đưa mẫu vào cột phân tích theo phương pháp dòng chảy không ngừng. Hiện nay, phương pháp phổ biến là dùng van bơm có vòng mẫu với dung tích xác định và chính xác. Vòng mẫu có thể có dung tích khác nhau từ 5 đến 100 μL . Loại từ 20 μL đến 50 μL được dùng phổ biến. Có hai cách bơm mẫu vào trong cột, bằng cách bơm mẫu bằng tay và bơm mẫu tự động. Cột sắc ký là trái tim của quá trình sắc ký. Cột thông thường làm bằng thép không rỉ hoặc thủy tinh. Ngày nay, cột bằng thép không gỉ được dùng phổ biến, chiều dài cột khoảng 10-30 cm, đường kính trong 1-10 mm, hạt chất nhồi cỡ có đường kính khoảng 2-10 μm . Loại pha tĩnh sử dụng tùy thuộc vào kỹ thuật sắc ký sử dụng. Để đảm bảo tuổi thọ của cột nên sử dụng một tiền cột ở trước cột phân tích. Các detector được sử dụng

trong LC bao gồm: detector quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS), detector chuỗi diod quang (DAD), detector huỳnh quang (FLD), detector khúc xạ, detector điện hóa, detector tán xạ vi sai... và detector khối phổ (MS).

Khối phổ (MS) là một trong những bộ phận quan trọng nhất của thiết bị sắc ký lỏng. Một detector lý tưởng trong sắc ký lỏng đạt được những yêu cầu sau: Độ nhạy phân tích cao, đáp ứng được với các chất cần phân tích hoặc đặc trưng của chúng, không phá hủy mẫu, không nhạy cảm với các thay đổi nhiệt độ và tốc độ dòng của pha động, có thể vận hành liên tục, cho độ lặp lại tốt và dễ sử dụng.

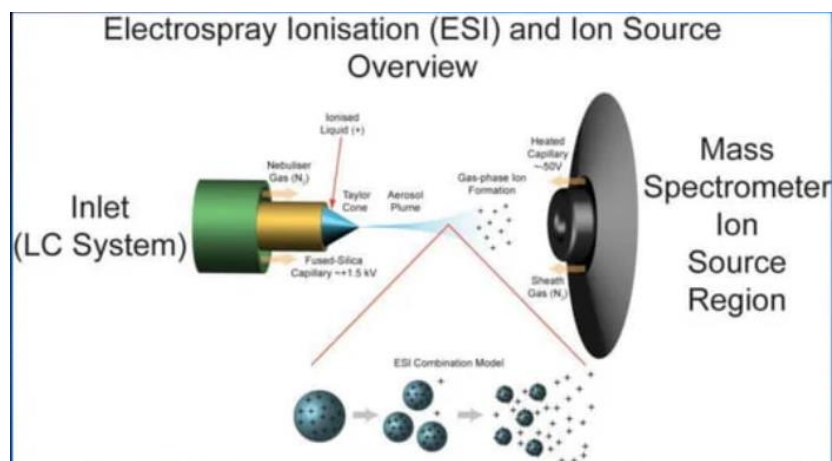
Khối phổ gồm có 3 thành phần là nguồn ion hóa, bộ phân tích khối và bộ phát hiện. Mẫu từ máy sắc ký lỏng được đưa vào máy khối phổ sẽ được ion hóa trong buồng ion hóa, sau đó được chuyển đến bộ phận lọc và phân tích khối để tách các ion khác nhau theo tỷ lệ m/z . Các ion được bộ phận phát hiện thu nhận tín hiệu, chuyển tín hiệu vào máy tính để xử lý.

1.6.2.2. Phân loại

Nguồn ion hóa trong MS thường được cấu tạo để thực hiện nhiệm vụ hóa hơi, loại dung môi và ion hóa mẫu. Có nhiều kỹ thuật ion hóa khác nhau nhưng hai kỹ thuật hay được sử dụng trong khối phổ hai lần bao gồm ion hóa phun điện tử (ESI) và ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (APCI) [90].

a) Ion hóa phun điện tử (ESI)

Nguyên tắc: Dòng chảy dung môi chứa chất phân tích từ thiết bị sắc ký lỏng đi qua một ống mao quản có đường kính khoảng 0,1 mm và với một điện trường cao (từ 3 đến 6 kV) sẽ tạo thành các hạt mang điện (Hình 1.6). Dòng khí nitơ thổi vào mẫu làm bay hơi nhanh dung môi biến các hạt đã rất nhỏ trở thành cực nhỏ trước khi mẫu được đưa vào buồng ion hóa. Các giọt phun ra có kích thước rất nhỏ chứa ion phân tử là $(M+H)^+$ nếu ở chế độ ion dương hay $(M-H)^-$ nếu ở chế độ ion âm. Ngoài ra, quá trình ion hóa có thể tạo ra một số ion khác do sự có mặt của các chất trong môi trường như $(M+Na)^+$, $(M+CH_3OH)^+$ hay các ion đa điện tích như $(M^{+2}H)^{2+}$, $(M^{+3}H)^{3+}$, $(M^{+4}H)^{4+}$...

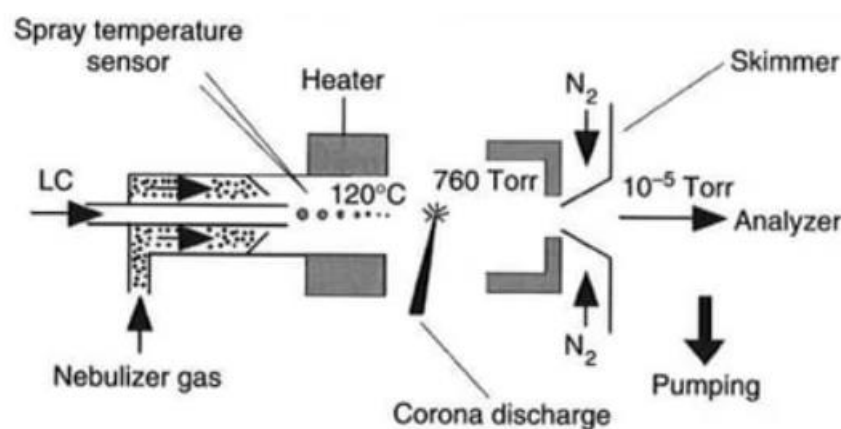


Hình 1.6. Ví dụ minh họa cho sơ đồ bố trí của ion hóa phun điện tử

ESI là phương pháp ion hóa có khả năng tạo ra phức bằng quá trình cho nhận electronic trong pha khí, phân tích trong phổ khối lượng 70,000 Da và không bị ảnh hưởng của nền mẫu. Tuy nhiên, sự hiện diện của các muối và cặp ion của thuốc thử như TFA có thể làm giảm độ nhạy của thiết bị.

b) Ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (APCI)

Nguyên tắc: Mẫu ở dạng lỏng từ thiết bị sắc ký lỏng được đi qua đầu phun để tạo thành các hạt sương nhỏ, dưới tác động của nguồn nhiệt cao nhanh chóng hóa hơi. Sau khi hóa hơi, dòng khí này được ion hóa nhờ một bộ phận phóng điện để tạo thành các ion phân tử (Hình 1.7)



Hình 1.7. Ví dụ minh họa cho sơ đồ bố trí của ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển

Khi những ion dung môi hiện diện ở áp suất thường, sự ion hóa hóa học của các ion phân tử phân tích có hiệu quả cao. Quá trình dịch chuyển proton hay phản ứng proton hóa dễ xảy ra, quá trình cộng điện tử hay khử proton tạo $(M-H)^-$ dễ hình thành. Tuy nhiên, những ion đa hóa trị không tồn tại do quá trình ion hóa có năng lượng cao hơn ESI.

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị và dụng cụ

2.1.1.1. Thiết bị

- Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng ghép nối detector khối phổ (HPLC-MS/MS) bao gồm: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng HPLC (Model: CTO- 20A, Shimadzu, Japan) và hệ thống khối phổ (Model: AB SCIEX 5500, USA)
- Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC-HR/MS gồm sắc ký lỏng siêu hiệu năng Ultimate 3000 kết nối với khối phổ Q-exactive Plus của Thermo Scientific.
- Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng ghép nối detector khối phổ LC-MS/MS Agilent Triple Quad 6460.
- Cột sắc ký pha đảo C₁₈ (100 mm x 3,5 µm x 2,1 mm) và tiền cột, Waters
- Cột sắc ký pha đảo BEH C₁₈ (100 mm x 1,7 µm x 2,1 mm) và tiền cột, Waters.
- Cột sắc ký pha đảo Eclipse Plus C₁₈ (150 mm x 3,5 µm x 2,1 mm) và tiền cột, Agilent.
- Cột chiết pha rắn SPE SCX (500 mg, 3 cc), Sigma
- Cột chiết pha rắn SPE HLB (200 mg, 6 cc), Water
- Cân phân tích chính xác đến 0,1 mg và 0,01 mg, Mettler Toledo.
- Cân kỹ thuật, chính xác 0,01 g, Mettler Toledo.
- Máy đồng nhất mẫu, Phillips.
- Máy ly tâm có thể đạt được tốc độ tối thiểu 6000 vòng/phút đối với ống ly tâm 50 mL, Mikro 200R, Hettich.
- Máy ly tâm có thể đạt được tốc độ tối thiểu 13000 vòng/phút đối với ống ly tâm 2 mL, Mikro 220R, Hettich.
- Máy lắc xoáy vortex, IKA.
- Máy rung siêu âm, Elma.

2.1.1.2. Dụng cụ

- Micropipet 10- 100, 20- 200, 100- 1000, 500- 5000 µL.
- Bình định mức các loại: 5 mL, 10 mL, 50 mL và 100 mL.

- Ống ly tâm nhựa 15 mL có nắp kín.
- Ống ly tâm nhựa 2 mL có nắp kín.
- Ống đong 50, 100 mL.
- Lọ đựng mẫu 1,8 mL có nắp kín.
- Pipet pasteur
- Màng lọc mẫu, kích thước lỗ 0,2 μm .
- Màng lọc dung môi, kích thước lỗ 0,45 μm
- Giấy lọc.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

❖ Chất chuẩn nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý:

Bảng 2.1. Các chất phân tích nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên chất	Hãng cung cấp	Độ tinh khiết (%)
1.	2-Hydroxypropyl nortadalafil	Toronto reseach chemicals	98,0
2.	Acetaminotadalafil	Toronto reseach chemicals	98,9
3.	Acetil acid	Toronto reseach chemicals	98,0
4.	Acetildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
5.	Acetylvardenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
6.	Aminotadalafil	LGC	99,4
7.	Avanafil	Toronto reseach chemicals	98,0
8.	Benzamidenafil	Toronto reseach chemicals	>90,0
9.	Benzylsildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
10.	Carbodenafil	LGC	99,1
11.	Chlorodenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
12.	Chloropretadalafil	LGC	99,7
13.	Cyclopentylafil	Toronto reseach chemicals	96,0
14.	Depiperazino-thiosildenafil	Toronto reseach chemicals	95,0
15.	Descarbonsildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
16.	Desmethyl fondenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
17.	Dimethylacetildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0

STT	Tên chất	Hãng cung cấp	Độ tinh khiết (%)
18.	Dimethylsildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
19.	Gendenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
20.	Homosildenafil	Toronto reseach chemicals	99,5
21.	Hydroxyacetildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
22.	Hydroxychlorodenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
23.	Hydroxyhomosildenafil	Toronto reseach chemicals	97,0
24.	Hydroxythio-homosildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
25.	Hydroxythiovardenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
26.	Hydroxyvardenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
27.	Imidazosagatriazinone	Toronto reseach chemicals	98,0
28.	Isosildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
29.	MDLenafil carbonate	Toronto reseach chemicals	96,0
30.	Mirodenafil	LGC	99,1
31.	Mutaprodenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
32.	N-Desethylvardenafil	Toronto reseach chemicals	97,0
33.	N-Desmethylsildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
34.	N-Octylnortadalafil	Toronto reseach chemicals	96,0
35.	Nitrodenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
36.	Noracetildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
37.	Norneosildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
38.	Norneovardenafil	Toronto reseach chemicals	96,0
39.	Nortadalafil	Toronto reseach chemicals	95,0
40.	O-desethyl-o-propyl sildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
41.	Piperazonifil	Toronto reseach chemicals	95,0
42.	Piperiacetildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
43.	Propoxyphenyl aildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
44.	Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil	Toronto reseach chemicals	98,7
45.	Propoxyphenylthio-hydroxyhomosildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
46.	Pseudovardenafil	Toronto reseach chemicals	98,0

STT	Tên chất	Hãng cung cấp	Độ tinh khiết (%)
47.	Sildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
48.	Sildenafil N-oxide	Toronto reseach chemicals	99,5
49.	Tadalafil	Toronto reseach chemicals	96,0
50.	Thioaildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
51.	Thiohomosildenafil	Toronto reseach chemicals	98,0
52.	Udenafil	Toronto reseach chemicals	96,0
53.	Vardenafil	Toronto reseach chemicals	98,0

❖ **Chất chuẩn nhóm hỗ trợ giảm cân**

- Sibutramine hydrochloride (hãng: TRC, độ tinh khiết: 98,0%)
- Desmethyisibutramine (hãng: TRC, độ tinh khiết: 98,0%)
- Didesmethyisibutramine (hãng: TRC, độ tinh khiết: 98,0%)
- Fenfluramine hydrochloride (hãng: LGC, độ tinh khiết: 99,6%)
- Phenylpropanolamine hydrochloride (hãng: Mikromol, độ tinh khiết: 99,7%)
- Loperamid hydrochloride (hãng: LGC, độ tinh khiết: 99,7%)

❖ **Chất chuẩn nhóm hỗ trợ tiểu đường**

- Metformin hydrochloride (hãng: LGC, độ tinh khiết: 99,1%)
- Phenformin hydrochloride (hãng: LGC, độ tinh khiết: 98,8%)
- Buformin hydrochloride (hãng: LGC, độ tinh khiết: 99,1%)
- Glibenclamide (hãng: LGC, độ tinh khiết: 99,2%)
- Gliclazide (hãng: LGC, độ tinh khiết: 99,9%)

Danh mục các chất chuẩn kèm theo thông tin chi tiết về nhà cung cấp, số lô và đặc tính kỹ thuật được liệt kê tại Phụ lục 1.

❖ **Cách pha dung dịch chuẩn nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý**

- *Dung dịch chất chuẩn gốc 1000 µg/mL*: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào cốc có mỏ 25 ml trên cân phân tích có độ chính xác đến 0,01 mg. Hòa tan bằng MeOH và chuyển vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch và lắc đều. Bảo quản các dung dịch ở 2 ÷ 8°C.

- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 µg/mL:* Dùng micropipet hút chính xác 100 µL các dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.
- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 1 µg/mL:* Dùng micropipet hút chính xác 1 mL dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 µg/mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.
- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 100 ng/mL:* Dùng micropipet hút chính xác 100 µL dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 µg/mL vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.

❖ Cách pha dung dịch chuẩn nhóm hỗ trợ giảm cân

- *Dung dịch chất chuẩn gốc 500 µg/mL:* Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào cốc cân 25 mL trên cân phân tích có độ chính xác đến 0,01 mg. Hòa tan bằng MeOH và chuyển vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.
- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 5 µg/mL:* Dùng micropipet hút chính xác 100 µL các dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.
- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 1 µg/mL:* Dùng micropipet hút chính xác 2 mL dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 µg/mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.

❖ Cách pha dung dịch chuẩn nhóm hỗ trợ tiểu đường

- *Dung dịch chất chuẩn gốc 1000 µg/mL:* Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào cốc có mỏ 25 ml trên cân phân tích có độ chính xác đến 0,01 mg. Hòa tan bằng MeOH và chuyển vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch và lắc đều. Bảo quản các dung dịch ở -20°C.
- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 µg/mL:* Dùng micropipet hút chính xác 100 µL các dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH và lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.

- *Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 1 µg/mL*: Dùng micropipet hút chính xác 1000 µL dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 10 µg/mL vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng MeOH lắc đều. Bảo quản dung dịch ở 2 ÷ 8°C.

❖ Hóa chất dung môi khác

Các loại hoá chất sử dụng đều thuộc loại tinh khiết dùng cho phân tích. Nước được sử dụng cho thiết bị là nước đề ion, sử dụng cho quá trình chuẩn bị mẫu là nước cất 2 lần.

- Methanol (Merck)
- Acetonitril (Merck)
- Acid formic (Merck)
- Acid acetic (Merck)
- Ammoni format (Merck)
- Natri acetat (Merck)
- Chloroform (Merck)
- n- Hexan (Merck)
- Diethyl ether (Merck)
- Ethyl acetate (Merck)
- Muối magie sulfat (Merck)
- Muối natri clorua (Merck)
- Bột làm sạch C18, cỡ hạt 40 µm
- Bột carbon graphit (GCB)
- Dung dịch 10 mM ammonium format và 0,1% acid formic trong nước: Hòa tan 0,63 g ammonium format và 1 mL acid formic vào bình định mức 1000 mL, định mức tới vạch bằng nước cất 2 lần.
- Dung dịch 10 mM ammonium format và 0,1% acid formic trong acetonitril: Hòa tan 0,63 g ammonium format và 1 mL acid formic vào bình định mức 1000 mL, định mức tới vạch bằng acetonitril.
- Dung dịch acid acetic 0,1% trong acetonitril: Hút 1 mL acid acetic vào bình định mức 1 L, định mức tới vạch bằng nước cất 2 lần, lắc đều.

- Dung dịch acetonitril: Nước (50:50, v/v): Đong 500 mL acetonitril và 500 mL nước vào bình 1000 mL, đậy nắp và lắc đều.

- Dung dịch acetonitril: Nước (30:70, v/v): Đong 300 mL acetonitril và 700 mL nước vào bình 1000 mL, đậy nắp và lắc đều.

- Dung dịch acid formic 0,1%: Hút 1 mL acid formic vào bình định mức 1 L, định mức tới vạch bằng nước cất 2 lần, đậy nắp và lắc đều.

- Hỗn hợp chất làm sạch: Cân 50 ± 5 mg C18, $25 \pm 2,5$ mg bột GCB trên cân phân tích cho vào ống nhựa 2 mL, lắc trộn đều. Mỗi hỗn hợp được sử dụng cho một mẫu phân tích.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các mẫu TPBVSK được mua tại các cửa hàng thuốc trên địa bàn thành phố Hà Nội.

- Đối tượng mẫu được lựa chọn để thẩm định phương pháp sắc ký. Thông tin mẫu được đưa ra trong Phụ lục 2:

- 92 mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý dạng viên nang cứng và viên nang mềm.
- 30 mẫu TPBVSK có tác dụng hỗ trợ giảm cân dạng viên nang cứng, nang mềm và trà giảm cân.
- 30 mẫu TPBVSK có tác dụng hỗ trợ tiêu đường dạng viên nang cứng, nang mềm và dạng lỏng.

2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

2.2.2.1. Chuẩn bị mẫu sơ bộ

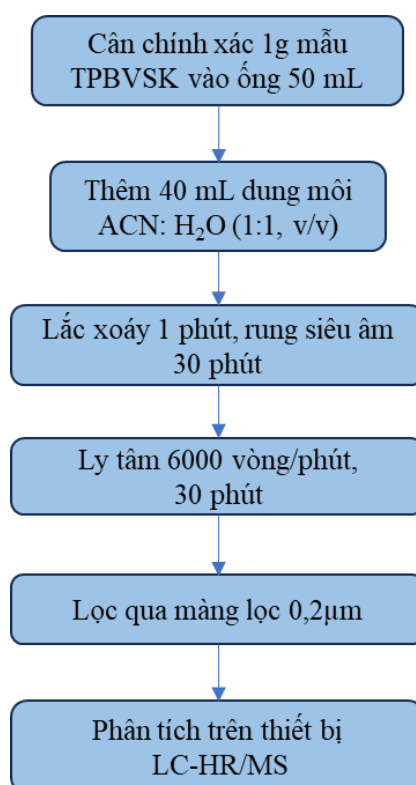
- Mẫu viên nang cứng được xay nghiền và trộn đều bằng máy đồng nhất mẫu.
- Mẫu viên nang mềm được tách bỏ phần vỏ nang, lấy phần ruột trộn đều.
- Mẫu túi lọc được tách bỏ phần túi, lấy phần ruột trộn đều.

2.2.2.2. Quy trình xử lý mẫu

Qua tham khảo một số tài liệu [9, 11, 31], quy trình xử lý mẫu dự kiến được thực hiện như sau:

a) Quy trình xử lý mẫu phân tích sàng lọc các chất cấm

Để xử lý mẫu cho phân tích sàng lọc, cần lựa chọn được dung môi chiết mà có thể chiết tối đa tất cả các chất phân tích và hạn chế tối thiểu việc chiết các chất gây ảnh hưởng. Để không bị loại bỏ mất chất phân tích, quy trình xử lý mẫu cho phân tích sàng lọc thường chỉ bao gồm bước chiết chất phân tích từ nền mẫu vào trong dung môi, thu lấy phần dịch chiết, loại bỏ phần cặn và phân tích trên thiết bị. Quy trình xử lý mẫu phân tích sàng lọc các chất cấm được trình bày trong hình 2.1.

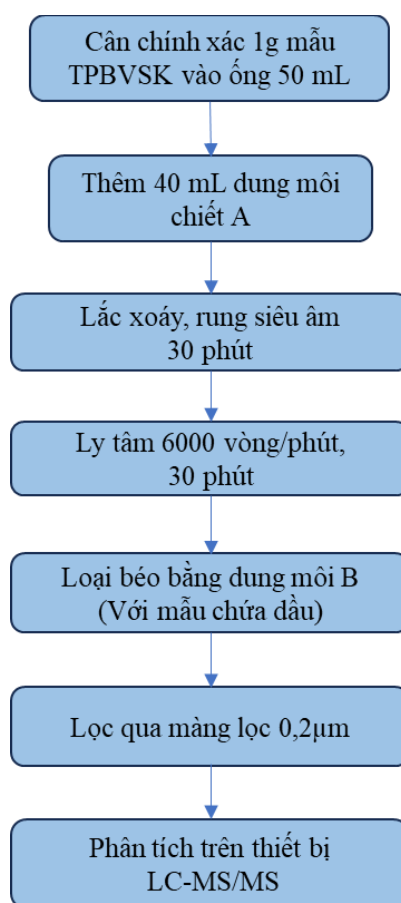


Hình 2.1. Quy trình chiết mẫu TPBVSK đối với sàng lọc các chất cấm

b) Quy trình xử lý mẫu phân tích định lượng nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý

Tiến hành khảo sát phương pháp chiết lỏng- rắn với các hệ dung môi chiết khác nhau gồm methanol, acetonitril, nước và kết hợp các dung môi, kết hợp quá trình rung siêu âm được trình bày trong hình 2.2.

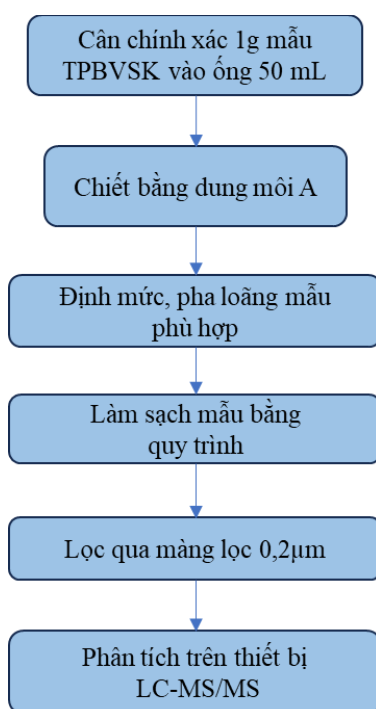
Đối với nền mẫu viên nang mềm (có chứa dầu), quy trình xử lý mẫu được khảo sát thêm bước loại béo. Các dung môi dùng để khảo sát bao gồm: diethyl ether, n-hexan, ethyl acetate và so sánh với mẫu không loại béo.



Hình 2.2. Khảo sát quy trình chiết mẫu TPBVSK đối với nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý

c) Quy trình xử lý mẫu phân tích định lượng nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân

Mẫu trắng thêm chuẩn của chất cấm nhóm hỗ trợ giảm cân được chiết bằng các loại dung môi khác nhau: 2 loại dung môi được lựa chọn là MeOH và ACN/ 1% axit formic. Đồng thời, tiến hành khảo sát 4 quy trình làm sạch mẫu khác nhau. Quy trình xử lý mẫu được trình bày ở hình 2.3 và quy trình làm sạch dịch chiết được trình bày trong bảng 2.2.



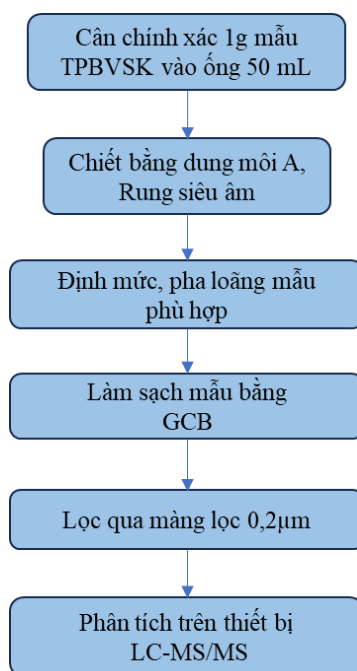
Hình 2.3. Sơ đồ quy trình chiết mẫu TPBVSK với nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân

Bảng 2.2. Quy trình làm sạch mẫu TPBVSK với nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân

Tên	Quy trình	
Quy trình 1	Không có giai đoạn làm sạch	Lọc mẫu qua màng lọc
Quy trình 2	Làm sạch qua cột SPE SCX	- Hoạt hóa cột: 6 mL MeOH, 6 mL H ₂ O - Nạp mẫu: 4 mL - Rửa tạp: 3 mL H ₂ O, 3 mL MeOH - Rửa giải: 4 mL MeOH: NH ₄ OH (95:5)
Quy trình 3	Làm sạch qua cột SPE HLB	- Hoạt hóa cột: 3 mL MeOH, 3 ml H ₂ O - Nạp mẫu: 4 mL - Rửa tạp: 3 mL H ₂ O - Rửa giải: 3 mL MeOH
Quy trình 4	Làm sạch bằng kỹ thuật d-SPE, sử dụng carbon hoạt tính	- Hút 10 mL dịch chiết vào ống ly tâm 15 mL có chứa sẵn 50 mg GCB - Lắc khoảng 30 giây- 1 phút - Ly tâm trong vòng 1 phút, lấy dịch ra ống ly tâm khác

d) Quy trình xử lý mẫu phân tích định lượng nhóm chất cảm hỗ trợ tiểu đường

Tiến hành khảo sát phương pháp chiết lỏng- rắn với các hệ dung môi chiết khác nhau gồm methanol, acetonitril và nước, kết hợp quá trình rung siêu âm. Đồng thời, tiến hành khảo sát quá trình làm sạch mẫu với khối lượng GCB khác nhau. Quy trình xử lý mẫu được trình bày ở hình 2.4.



Hình 2.4. Sơ đồ quy trình chiết mẫu TPBVSK với nhóm chất cảm hỗ trợ tiểu đường

2.2.3. Phương pháp phân tích

2.2.3.1. Phương pháp sàng lọc các chất cảm bằng LC-HR/MS

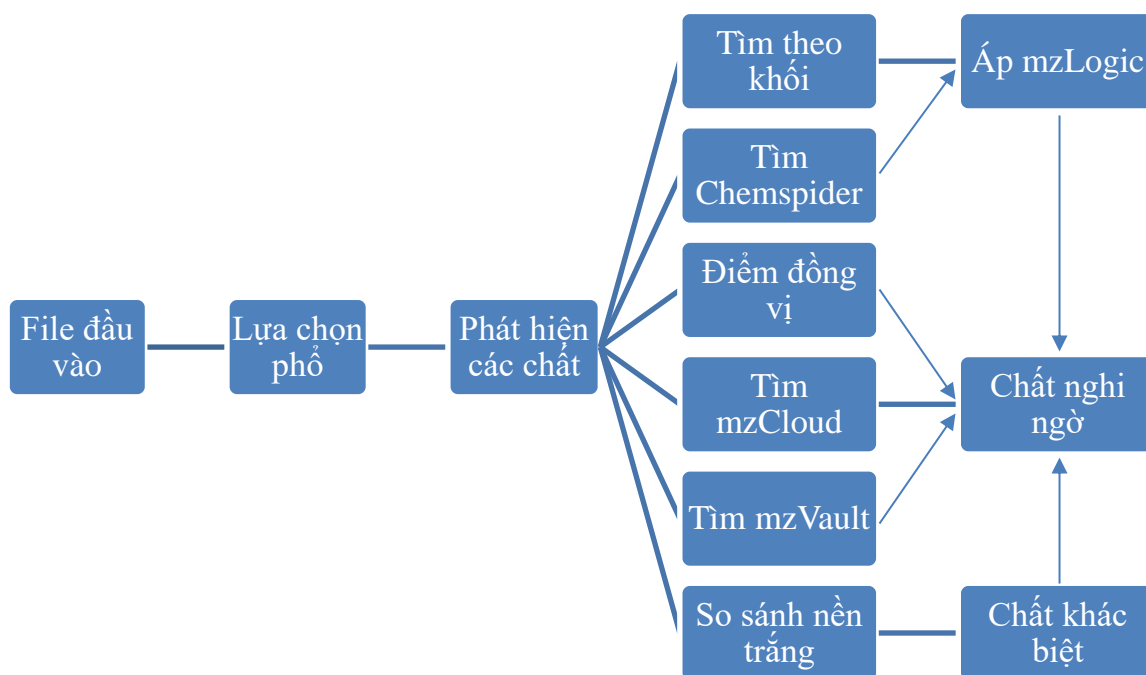
- Khảo sát điều kiện khối phổ: Tra cứu mảnh phổ lý thuyết dựa vào CTPT của các hợp chất, sau đó, tìm các điều kiện tối ưu của MS để xác định ion mẹ; lựa chọn các ion con phù hợp. Tiến hành bơm 1 μ L dung dịch các chất chuẩn vào khối phổ. Đo mảnh phổ thực nghiệm bằng chế độ Fullscan đối với mảnh mẹ và All ion fragmentation (AIF) để tìm kiếm mảnh con của chất phân tích.
- Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng: Lựa chọn cột tách, pha động và khảo sát gradient nhằm tách được tối đa các hợp chất.
 - Khảo sát cột tách: dựa vào bản chất của chất phân tích và các tài liệu đã công bố, khảo sát một số cột C18 với các kích thước cột khác nhau.

- Khảo sát thành phần pha động: dựa trên các tài liệu đã được công bố về việc xác định các chất cấm, tiến hành khảo sát một số pha động gồm các thành phần: acetonitril, methanol, acid formic 0,1% và amonifomat 10 mM. Đánh giá sự ảnh hưởng của việc bổ sung acid formic và ammonium format trong acetonitril hoặc methanol, hoặc hỗn hợp acetonitril: methanol (1:1). Điều kiện tối ưu là điều kiện mà tại đó các chất phân tích tách tốt nhất, thu được pic nhọn, cân đối.

- Khảo sát tỉ lệ pha động: khảo sát chế độ tách đẳng dung môi và chương trình gradient.

- *Xử lý số liệu phân tích sàng lọc*

Mẫu sau khi được phân tích trên thiết bị sẽ được chuyển sang phần mềm xử lý số liệu để tiếp tục quá trình, tương thích với Obitrapp và phần mềm Compound Discoverers phiên bản 3.3, với điều kiện tiên quyết là các lần phân tích lặp lại của cùng một mẫu phải cho cùng một kết quả dự đoán. Mô hình hóa bước này ở hình 2.4.



Hình 2.5. Quy trình sàng lọc chất cấm bằng phần mềm Compound Discoverer

Mẫu sau khi xử lý qua phần mềm, cần phân tích thì mới có cơ sở để định hướng kết quả. Ưu tiên dự đoán sẽ được dựa vào diện tích pic, hệ số tương thích với

dữ liệu thư viện, hệ số tương thích về tính logic cấu tạo và sự xuất hiện đồng thời trong các lần phân tích lặp để có thể cho ra bảng số liệu nhất quán.

Tiến hành so sánh dữ liệu sắc ký đồ và mảnh phổ tương ứng với thư viện phổ tự thiết lập, thư viện phổ trực tuyến Mzcloud, thư viện Spiderchem, thư viện Mzvault và dự đoán công thức cấu trúc chất phân tích.

Sau khi sử dụng phần mềm để dự đoán các chất phân tích, độ chính xác của chất phân tích có mặt trong mẫu được thể hiện qua độ khớp với từng thư viện phổ (Hình 2.6).

Checked	Name	Formula	Annotation Score	FISH	Molecular Weight	RT [min]	Area (Max.)	# Che	# m/z	mzCloud Best Match	Mass	mzCloud Best Score	MS2
<input type="checkbox"/>	Benzamidenafil	C19 H23 N3 O6	██████		389.15857	18.528	102733649	3	1	100.0	████		████
<input type="checkbox"/>	Piperiacetildenafil	C24 H31 N5 O3	██████		437.24269	16.913	445453939	1	4	100.0	████		████
<input type="checkbox"/>	Gendenafil	C19 H22 N4 O3	██████		354.16928	19.575	452940404	10	10	99.9	████		████
<input type="checkbox"/>	Piperiacetildenafil	C24 H31 N5 O3	██████		437.24259	17.126	833246872	1	1	99.9	████		████
<input type="checkbox"/>	Norneo sildenafil	C22 H29 N5 O4 S	██████		459.19485	20.817	264937975	2	8	99.9	████		████
<input type="checkbox"/>	Hydroxychloroder	C19 H23 Cl N4 O3	██████		390.14595	19.592	199611958	1	4	99.9	████		████
<input type="checkbox"/>	Imidazosagatriazin	C17 H20 N4 O2	██████		312.15858	20.535	512933070	10	2	99.9	████		████

Hình 2.6. Minh họa tìm kiếm hợp chất chưa biết trong mẫu bằng phần mềm Compound discoverer

+ Tại mỗi điểm trên sắc ký đồ, tín hiệu chất phân tích và phổ đồ tương ứng được dự đoán cấu trúc thông qua mảnh ion cao nhất, các mảnh đồng vị và các mảnh con tương ứng. Từ lý thuyết giải phổ đồng vị và mảnh con, dự đoán cấu trúc chất phân tích.

+ Đối với chất phân tích đã được dự đoán ở trên, tiến hành so sánh và khớp công thức hóa học dự đoán và phổ đồ với các thư viện phổ. Các chất phân tích có mảnh phổ khớp nhất với thư viện có độ chính xác cao nhất. Các thông số được thể hiện qua chỉ số Mzcloud best match ($\geq 80\%$).

2.2.3.2. Phương pháp định lượng nhóm chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý

Hệ thống máy khối phổ được sử dụng là máy sắc ký lỏng siêu hiệu năng Ultimate 3000 kết nối với khối phổ Q-exactive Plus của Thermo Scientific.

Các điều kiện phân tích chất cấm hỗ trợ chức năng sinh lý được thiết lập như sau:

- Cột phân tích: BEH C18 (100 mm x 1,7 μ m x 2,1 mm) và tiền cột của Waters.
- Nguồn ion hóa: ESI dương.
- Chế độ khối phổ: Với MS sử dụng chế độ quét toàn dải (full scan) và với MS/MS sử dụng chế độ dd-MS² (data-dependent) với 3 giá trị năng lượng va chạm tương đối là 40%, 70%, 100% (NCE).
- Độ phân giải: MS 70.000 (FWHM) và MS/MS 17.500 (FWHM).
- Độ chính xác khối: Cài đặt ở 5 ppm.
- Chương trình gradient pha động gồm 2 thành phần kênh A và kênh B
 - + Kênh A: 10 mM ammonium format và 0,1% acid formic trong nước
 - + Kênh B: 10 mM ammonium format và 0,1% acid formic trong acetonitril: methanol (1:1, v/v)

2.2.3.3. Phân tích định lượng nhóm chất cấm hỗ trợ giảm cân

Hệ thống máy khối phổ được sử dụng là máy khối phổ 5500 QQQ ghép nối với hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao LC20AD của Shimadzu. Khối phổ 5500 QQQ là hệ thống nhạy nhất trong phổ khối ba tứ cực, do có độ nhạy cao, phù hợp với đối tượng mẫu phân tích là mẫu TPBVSK có nền mẫu phức tạp. Tối ưu hóa năng lượng bắn phá (CE) và điện thế đầu ra (CXP) tự động theo phần mềm của thiết bị tìm điều kiện tối ưu để có được các mảnh định tính, định lượng của sibutramin và dẫn xuất của sibutramin.

Các điều kiện phân tích chất cấm hỗ trợ giảm cân được thiết lập như sau:

- Cột phân tích: C18 (100 mm x 3,5 μ m x 2,1 mm) và tiền cột của Waters.
- Nguồn ion hóa: ESI dương.
- Khảo sát gradient pha động gồm 2 thành phần kênh A và kênh B

Hệ pha động 1: + Kênh A: Ammonium format 2 mM + acid formic 0,1%/ H₂O

+ Kênh B: ACN (100%)

Hệ pha động 2: + Kênh A: Ammonium format 2 mM + acid formic 0,1%/ H₂O

+ Kênh B: Ammonium format 2 mM + acid formic 0,1%/MeOH

2.2.3.4. Phân tích định lượng nhóm chất cấm hỗ trợ tiểu đường

Quá trình phân tích được thực hiện trên thiết bị Agilent Triple Quad 6460 của hãng Agilent, phù hợp với đối tượng mẫu phân tích là mẫu TPBVSK có nền mẫu phức tạp. Tối ưu hóa năng lượng bắn phá (CE) và điện thế đầu ra (CXP) tự động theo phần mềm của thiết bị tìm điều kiện tối ưu để có được các mảnh định tính, định lượng của chất phân tích.

Các điều kiện phân tích chất cấm hỗ trợ nhóm điều trị tiểu đường được thiết lập như sau:

- Cột phân tích Agilent Eclipse Plus C18 (150 mm x 3,0 mm; 3,5 μm) và tiền cột của hãng Agilent.
- Nguồn ion hóa: ESI dương, chế độ theo dõi chọn lọc ion (MRM)
- Tham khảo các tài liệu và dựa trên điều kiện của phòng thí nghiệm, tiến hành khảo sát pha động gồm kênh A (acid formic 0,1%; dung dịch đệm format chứa acid formic 0,1% và ammonium format 10 mM) và kênh B (ACN).

2.2.4. Thẩm định phương pháp

Thông tin mẫu trắng: Các nền mẫu trắng được thể hiện trong Bảng 2.3. Mỗi nhóm chất cấm được tiến hành thẩm định trên các nền mẫu phổ biến tương ứng với từng loại TPBVSK.

Bảng 2.3. Thông tin nền mẫu trắng của các nhóm chất cấm trong nghiên cứu

STT	Nhóm chất cấm	Nền mẫu	Điều kiện mẫu
1	Chất hỗ trợ chức năng sinh lý	- Dạng nang cứng - Dạng nang mềm	Các mẫu TPBVSK được xác định không chứa chất phân tích tương ứng
2	Chất hỗ trợ giảm cân	- Dạng nang cứng - Dạng nang mềm - Dạng trà túi lọc	

STT	Nhóm chất cấm	Nền mẫu	Điều kiện mẫu
3	Chất hỗ trợ tiêu đường	- Dạng nang cứng - Dạng nang mềm - Dạng lỏng	(Được xác định bằng phương pháp LC-MS/MS)

2.2.4.1. Thẩm định phương pháp sàng lọc (định tính)

- Giới hạn phát hiện

Theo hướng dẫn của Ủy ban Châu Âu (SANTE/12682/2019), giới hạn phát hiện của phương pháp sàng lọc (screening detection limit - SDL) là hàm lượng chất phân tích thấp nhất có thể phát hiện được trong 95% số mẫu. Tỷ lệ âm tính giả 5% được chấp nhận.

Tiến hành thêm chuẩn các nồng độ nhỏ dần của hỗn hợp các chất cấm vào nền mẫu trắng. Tại mỗi nồng độ thực hiện 20 lần. Phân tích các mẫu và xác định giới hạn lặp lại là nồng độ mà tại đó ≥ 19 mẫu cho kết quả dương tính.

- Độ chọn lọc (Độ đặc hiệu)
Chuẩn bị 20 mẫu trắng (Mẫu âm).

Chuẩn bị 20 mẫu trắng được thêm chuẩn các chất cấm ở nồng độ giới hạn phát hiện (Mẫu dương).

Mã hóa ngẫu nhiên các mẫu âm và mẫu dương.

Tiến hành phân tích theo quy trình đã được tối ưu và đánh giá kết quả như Bảng 2.4.

Bảng 2.4. Đánh giá tính chọn lọc của phương pháp định tính

Kết quả	Mẫu dương (+)	Mẫu âm (-)
Dương tính (+)	TP (True positive)	FP (False positive)
Âm tính (-)	FN (False negative)	TN (True negative)
$\text{Độ chọn lọc} = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$		$\text{Độ nhạy} = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$

Độ chọn lọc cần đạt ít nhất là 95%.

2.2.4.2. *Thẩm định phương pháp định lượng*

Đối với phương pháp định lượng, tiến hành thẩm định, đánh giá các thông số sau: độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện (MDL), giới hạn định lượng (MQL), khoảng tuyến tính và đường chuẩn, độ lặp lại, độ thu hồi. Đánh giá kết quả thẩm định với quy định của AOAC và các quy định khác của châu Âu [29].

- Độ đặc hiệu

Tính chọn lọc của phương pháp được đánh giá thông qua việc so sánh phổ của các chất phân tích trên 3 loại mẫu: mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn. Phương pháp có tính chọn lọc cao đối với chất phân tích khi không phát hiện tín hiệu của chất phân tích trên mẫu trắng, thời gian lưu của chất phân tích trên mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn không lệch quá 5%.

Ngoài ra, tính chọn lọc còn được khẳng định bằng số điểm nhận dạng và tỷ lệ các ion theo tiêu chuẩn EC 657/2002 của Châu Âu.

- Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL), giới hạn định lượng của phương pháp (MQL)

Tiến hành pha một số dung dịch có nồng độ gần với mức MDL, MQL. MDL và MQL được xác định dựa trên tỷ lệ tín hiệu nhiễu đường (S/N). Phân tích mẫu thêm chuẩn ở nồng độ thấp còn có thể xuất hiện tín hiệu của chất phân tích. Xác định tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu ($S/N = \text{Signal to noise ratio}$).

MDL là nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 3 lần nhiễu ($S/N = 3$).

MQL là nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 10 lần nhiễu ($S/N = 10$).

- Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Để xác định khoảng tuyến tính, thực hiện đo 5- 7 điểm chuẩn có nồng độ từ giá trị định lượng trở lên. Sau đó, lấy tối thiểu 3 điểm nằm trong khoảng tuyến tính. Tiến hành khảo sát sự phụ thuộc của tín hiệu vào nồng độ và vẽ đường biểu đồ thể hiện sự phụ thuộc giữa diện tích pic thu được vào nồng độ.

Khoảng tuyến tính được xây dựng trong khoảng: 10- 200 ng/mL đối với nhóm chất cảm hỗ trợ chức năng sinh lý, 2- 200 ng/mL đối với nhóm chất cảm hỗ trợ giảm cân, 10- 200 ng/mL đối với nhóm chất cảm hỗ trợ tiêu đường.

Các dung dịch chuẩn được pha trên dịch sau khi xử lý của mẫu trắng.

- Độ lặp lại và độ thu hồi

Để xác định độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp phân tích, tiến hành thí nghiệm lặp lại trên nền mẫu trắng thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ khác nhau là (N = 6) và tính toán kết quả theo các công thức sau:

- Độ lặp lại được biểu diễn theo độ lệch chuẩn tương đối RSD(%).

$$RSD (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Trong đó:

x_i : Nồng độ tính được của lần thử nghiệm thứ “i”

\bar{x} : Nồng độ trung bình tính được của N lần thử nghiệm.

N : Số lần thử nghiệm.

- Độ thu hồi $R (\%) = \frac{C}{C_c} \cdot 100$

Trong đó:

R : Độ thu hồi (%)

C : Nồng độ chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn.

C_c : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết).

2.2.5. Phân tích mẫu thực

* Phân tích sàng lọc

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để sàng lọc các hợp chất nhóm chất cấm có thể có mặt trong các sản phẩm TPBVSK. Phần lớn các chất đều đã có trong thư viện phổ được xây dựng thông qua nghiên cứu. Tuy nhiên, trường hợp phát hiện các chất mới, thực hiện tách chiết và sắc ký điều chế để thu được các chất có độ tinh khiết tương đối, sau đó xác định cấu trúc của chất bằng các phương pháp phổ như UV, MS, IR và NMR.

* Phân tích định lượng:

Đường chuẩn từ 3 điểm trên nền mẫu thực được sử dụng để tính kết quả cho các mẫu tương ứng. Căn cứ vào đường chuẩn tương quan giữa diện tích pic và nồng độ, căn cứ vào diện tích pic mẫu tính kết quả theo công thức sau:

$$X = \frac{C \times V \times k}{m \times 1000}$$

Trong đó:

V: Thể tích dịch chiết cuối cùng chạy máy (mL).

C: Nồng độ dung dịch chiết mẫu tính theo đường chuẩn (ng/mL).

k : Hệ số pha loãng

m: Khối lượng hoặc thể tích của mẫu phân tích (g).

X: Hàm lượng chất cấm trong mẫu thử ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Trong trường hợp mẫu thực có hàm lượng chất phân tích cao hơn đường chuẩn, tiến hành pha loãng mẫu phù hợp với đường chuẩn xây dựng.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Thiết bị LC-HR/MS: Các kết quả phân tích sàng lọc được xử lý bằng phần mềm Compound discoverer 3.1 và kết quả định lượng được xử lý bằng phần mềm TraceFinder 4.1 của thiết bị LC-HR/MS Ultimate 3000 Q-exactive hãng Thermo Scientific. Các số liệu phân tích được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Phần mềm TraceFinder 4.1 hỗ trợ phân tích định lượng, cho phép người dùng xác định nồng độ của các hợp chất trong mẫu. Phần mềm này có khả năng xử lý hàng ngàn mẫu mỗi ngày, giúp tiết kiệm thời gian và nâng cao hiệu quả công việc. Ngoài ra, TraceFinder còn tích hợp các công cụ báo cáo và quản lý dữ liệu, giúp người dùng dễ dàng theo dõi và quản lý kết quả phân tích.

Thiết bị LC-MS/MS: Xác định hàm lượng chất cấm trong mẫu TPBVSK bằng phần mềm của thiết bị LC. Các kết quả thẩm định phương pháp được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình LC-HR/MS sàng lọc một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

3.1.1. Khảo sát điều kiện HR/MS phân tích chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

3.1.1.1. Tìm kiếm mảnh phổ các chất phân tích

Dựa vào cấu trúc của các chất phân tích và tham khảo [31], cho thấy các chất cấm đều có thể phân tích bằng chế độ ion hóa phun điện tử dương ESI (+). Nghiên cứu tiên hành bơm 10 μ L dung dịch chuẩn hỗn hợp 1 μ g/mL vào thiết bị HR/MS đo mảnh phổ thực nghiệm bằng chế độ Fullscan đối với mảnh mẹ và dd-dependent MS² đối với mảnh con. Đồng thời, quét chế độ toàn dải ion con với các ion mẹ lựa chọn được (All ion fragmentation - AIF) để tìm kiếm mảnh con của chất phân tích.

Các điều kiện khối phổ bao gồm:

- Full MS-dd-MS²:
 - Độ phân giải MS: 70000 (FWHM)
 - Khoảng khối: m/z 220- 1100
 - Độ phân giải MS²: 17500 (FWHM)
 - Năng lượng va chạm tương đối (NCE): 30%.
- AIF:
 - Độ phân giải: 70000 (FWHM)
 - Khoảng khối: 50-750
 - Năng lượng va chạm tương đối (NCE): 40%, 70% và 100%

Các kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát mảnh phổ ion mẹ và ion con của các chất cấm

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
I	Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý				
1.	2-Hydroxypropyl nortadalafil	$C_{24}H_{23}N_3O_5$	$[M+H]^+$	434,17105	135,04406; 169,07602; 204,08078; 262,08626; 284,13935; 197,07094; 130,06513; 115,05423; 232,07569; 312,13427
2.	Acetaminotadalafil	$C_{23}H_{20}N_4O_5$	$[M+H]^+$	433,15065	204,08078; 262,08626; 135,04406; 205,0886; 233,08352; 232,07569; 169,07602; 191,07295; 263,09408; 250,08626
3.	Acetil acid	$C_{18}H_{20}N_4O_4$	$[M+H]^+$	357,15570	285,13450; 300,08487; 313,16528; 273,23201; 234,78161; 329,12441; 57,55269; 76,77712; 91,76711; 128,33941; 166,09776
4.	Acetildenafil	$C_{25}H_{34}N_6O_3$	$[M+H]^+$	467,27652	111,09167; 97,07602; 70,06513; 84,08078; 72,08078; 127,12297; 112,09950; 297,13460; 56,04948; 166,09749
5.	Acetylvardenafil	$C_{25}H_{34}N_6O_3$	$[M+H]^+$	467,27652	169,09715; 70,06513; 84,08078; 341,16082; 111,09167; 72,08078; 127,12297; 97,07602; 112,09950; 110,06004

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
6.	Aminotadalafil	$C_{21}H_{18}N_4O_4$	$[M+H]^+$	391,14008	204,08078; 135,04406; 262,08626; 233,08352; 169,07602; 232,07569; 250,08626; 191,07295; 203,07295
7.	Avanafil	$C_{23}H_{26}ClN_7O_3$	$[M+H]^+$	484,18584	155,02582; 375,12184; 105,03349; 77,03858; 95,04914; 53,03858; 357,11128; 233,10330; 67,05423; 221,10330
8.	Benzamidenafil	$C_{19}H_{23}N_3O_6$	$[M+H]^+$	390,16596	151,07536; 107,04914; 135,04406; 91,05423; 79,05423; 105,03349; 90,04640; 136,05188; 65,03858; 93,03349
9.	Benzylsildenafil	$C_{28}H_{34}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	551,24350	91,05423; 65,03858; 134,09643; 377,12781
10.	Carbodenafil	$C_{24}H_{32}N_6O_3$	$[M+H]^+$	453,26087	311,11387; 339,14517; 166,09749; 255,12404; 69,04472; 97,07602; 225,07709; 70,06513
11.	Chlorodenafil	$C_{19}H_{21}ClN_4O_3$	$[M+H]^+$	389,13749	361,10619; 285,13426; 311,11387; 154,06110; 166,09749; 69,05730; 256,09548; 76,97887; 165,01830
12.	Chloropretadalafil	$C_{22}H_{19}ClN_2O_5$	$[M+H]^+$	427,10553	135,04406; 274,08559; 204,08078; 216,08078; 189,06988; 262,08674; 244,07350; 302,08117
13.	Cyclopentylafil	$C_{26}H_{36}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	529,25920	461,19682; 377,13029; 344,14611; 313,16608; 277,28223; 237,59493; 210,18739; 169,09731; 142,73310; 98,09704; 75,59057

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
14.	Depiperazino-thiosildenafil	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₄ S ₂	[M+H] ⁺	409,10118	381,06896; 365,03707; 352,03045; 328,13556; 300,10448; 272,07283; 253,43238; 218,38203; 200,90222; 182,07341; 146,98571; 130,30821; 91,75983; 69,50264
15.	Descarbonsildenafil	C ₂₁ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	[M+H] ⁺	463,21291	418,15475; 311,15069; 432,17177; 406,15494; 361,13279; 344,14795; 283,11908; 238,83536; 192,99106; 175,69979; 151,05383; 125,02768; 87,09227; 72,08158; 58,06610
16.	Desmethyl fondenafil	C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₃	[M+H] ⁺	439,24589	339,14505; 311,11395; 396,20255; 374,42169; 319,71493; 196,38647; 165,01724; 120,37976; 99,09190; 73,11301
17.	Dimethylacetildenafil	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃	[M+H] ⁺	467,27652	84,08078; 127,12297; 112,09950; 111,09167; 70,06513; 297,13416; 58,06513; 166,09749; 325,16590; 410,21867
18.	Dimethylsildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	[M+H] ⁺	489,22785	99,09167; 71,07295; 56,04948; 113,10732; 70,06513; 283,11895; 311,15025; 84,08078; 377,12780; 225,07709

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
19.	Gendenafil	$C_{19}H_{22}N_4O_3$	$[M+H]^+$	355,17647	327,14517; 285,13462; 298,10604; 256,09548; 311,11387; 69,04472; 120,04439; 154,06112; 313,16590; 166,09749
20.	Homosildenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	489,22785	72,08078; 58,06513; 99,09167; 113,10732; 70,06513; 283,11895; 84,08078; 71,07295; 114,11515; 311,15025
21.	Hydroxyacetildenafil	$C_{25}H_{34}N_6O_4$	$[M+H]^+$	483,27143	97,07602; 70,06513; 127,08659; 143,11789; 100,07569; 297,13460; 88,07569; 166,09749; 112,09951; 128,09441
22.	Hydroxychlorodenafil	$C_{19}H_{23}ClN_4O_3$	$[M+H]^+$	391,15314	313,12952; 285,1346; 363,12184; 256,09548; 120,04439; 69,04472; 166,09883; 78,99452; 327,14517; 255,08765
23.	Hydroxyhomosildenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_5S$	$[M+H]^+$	505,22277	99,09167; 70,06513; 58,06513; 84,06822; 97,07602; 283,11895; 88,07569; 129,10224; 112,09950; 311,15025
24.	Hydroxythio-homosildenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S_2$	$[M+H]^+$	521,19992	99,09167; 70,06513; 58,06513; 84,06823; 299,09611; 129,10224; 97,07602; 88,07569; 327,12741; 112,09950

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
25.	Hydroxythiovardenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S_2$	$[M+H]^+$	521,19992	167,06375; 360,12506; 99,09167; 315,09037; 138,02462; 150,10257; 58,06513; 299,09611; 70,06513; 332,09307
26.	Hydroxyvardenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_5S$	$[M+H]^+$	505,22277	169,09715; 344,14791; 99,09167; 110,06004; 299,11387; 123,09167; 58,06513; 56,04948; 68,01309; 82,06513
27.	Imidazosagatriazinone	$C_{17}H_{20}N_4O_2$	$[M+H]^+$	313,16590	285,13463; 256,09548; 120,04439; 68,03690; 255,08765; 241,07230; 269,10330; 69,04472; 154,06110; 94,02874
28.	Isosildenafil	$C_{22}H_{30}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	475,21220	58,06513; 99,09167; 283,11895; 100,09950; 56,04948; 253,07240; 70,06513; 311,15025; 225,07709
29.	MDLenafil carbonate	$C_{47}H_{62}N_{12}O_{11}S_2$	$[M+H]^+$	1048,64223	112,09950; 82,06513; 58,06513; 97,07602; 111,09167; 56,04948; 487,21220; 83,06037; 84,08078; 283,11895
30.	Mirodenafil	$C_{26}H_{37}N_5O_5S$	$[M+H]^+$	532,25882	99,09167; 296,13935; 312,13427; 70,06513; 56,04948; 84,06820; 210,06619; 129,10224; 88,07569; 121,03964

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
31.	Mutaprodenafil	$C_{27}H_{35}N_9O_5S_2$	$[M+H]^+$	630,22824	142,00711; 602,23247; 560,22363; 516,15042; 489,22772; 439,15549; 404,13937; 377,12856; 344,14797; 312,15851; 288,21153; 219,20777; 163,22714; 113,10774; 84,98616
32.	N-Desethylvardenafil	$C_{21}H_{28}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	461,19655	169,09715; 344,14791; 110,06004; 299,11387; 316,11661; 123,09167; 68,01309; 82,06513; 56,04948
33.	N-Desmethylsildenafil	$C_{21}H_{28}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	461,19655	85,07602; 283,11895; 311,15025; 56,04948; 299,10868; 225,07709; 254,07983; 253,07249; 377,12780; 344,14791
34.	N-Octylnortadalafil	$C_{29}H_{33}N_3O_4$	$[M+H]^+$	489,31264	169,07602; 135,04406; 204,08078; 262,08626; 338,22269; 115,05423; 197,07094; 264,10191; 130,06513; 232,07569
35.	Nitrodenafil	$C_{17}H_{19}N_5O_4$	$[M+H]^+$	358,15098	330,11968; 316,11661; 154,06118; 256,09548; 68,03695; 255,08765; 313,11694; 227,09274; 269,10330; 136,05054
36.	Noracetildenafil	$C_{24}H_{32}N_6O_3$	$[M+H]^+$	453,26087	70,06513; 97,07602; 113,10732; 98,08385; 58,06513; 56,04948; 297,13463; 166,09749; 325,12952; 353,16082

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
37.	Norneosildenafil	C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S	[M+H] ⁺	460,20130	283,11895; 84,08078; 299,09611; 311,15025; 154,06101; 316,11661; 255,12404; 344,14791; 166,09749
38.	Norneovardenafil	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄	[M+H] ⁺	357,15573	169,07602; 110,06004; 329,12443; 328,11661; 123,09167; 68,01309; 300,08531; 55,05423; 82,06513; 95,06037
39.	Nortadalafil	C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	376,12918	204,08078; 262,08626; 135,04406; 233,08352; 232,07569; 169,07602; 191,07295; 254,09240; 250,08626
40.	O-desethyl-o-propyl sildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	[M+H] ⁺	489,22845	447,11960; 416,97849; 391,14451; 347,08125; 325,16612; 283,11909; 252,20022; 230,78935; 193,95794; 163,05384; 107,28071; 100,10004; 91,75806; 70,06595; 58,06599
41.	Piperazonifil	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄	[M+H] ⁺	483,27256	465,26167; 436,22269; 429,52412; 408,22737; 380,20885; 339,18190; 297,13488; 266,45598; 244,12189; 203,11833; 153,10273; 127,08668; 99,09230; 72,08144

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
42.	Piperiacetildenafilil	$C_{24}H_{31}N_5O_3$	$[M+H]^+$	438,24997	98,09643; 70,06513; 297,13464; 55,05423; 166,09749; 341,16082; 69,04472; 325,12952; 86,09643
43.	Propoxyphenyl aildenafilil	$C_{24}H_{34}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	503,24468	461,19514; 391,14362; 347,08197; 325,16609; 283,11925; 256,09442; 189,66799; 159,62481; 137,61562; 113,10770; 99,09223; 91,76256; 71,07376
44.	Propoxyphenyl-homohydroxysildenafilil	$C_{24}H_{34}N_6O_5S$	$[M+H]^+$	519,23842	99,09167; 70,06513; 283,11895; 84,06821; 97,07602; 299,11387; 129,10224; 88,07569; 112,09952; 255,12404
45.	Propoxyphenylthio-hydroxyhomosildenafilil	$C_{24}H_{34}N_6O_4S_2$	$[M+H]^+$	535,21557	99,09167; 70,06513; 56,04948; 299,09611; 58,06513; 84,0682; 129,10224; 315,09037; 88,07569; 271,10119
46.	Pseudovardenafil	$C_{22}H_{29}N_5O_4S$	$[M+H]^+$	460,20130	169,09715; 110,06004; 344,14791; 299,11387; 123,09167; 284,12678; 68,01309; 82,06513; 55,05423; 95,06037
47.	Sildenafilil	$C_{22}H_{30}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	475,21220	58,06513; 100,0995; 99,09167; 56,04948; 283,11895; 70,06513; 311,15025; 225,07709; 299,11387

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
48.	Sildenafil N-oxide	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₅ S	[M+H] ⁺	491,20712	99,09167; 56,04948; 70,06513; 404,13870; 344,14791; 58,06513; 97,07602; 283,11895; 311,15025; 377,12782
49.	Tadalafil	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	390,14483	204,08078; 135,04406; 262,08626; 169,07602; 205,08861; 232,07569; 233,08352; 240,11314; 268,10805; 250,08626
50.	Thioaildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂	[M+H] ⁺	505,20501	99,09167; 71,07295; 299,09611; 113,10732; 56,04948; 70,06513; 327,12741; 84,08078; 241,05420; 298,08828
51.	Thiohomosildenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂	[M+H] ⁺	505,20501	72,08078; 99,09167; 113,10732; 56,04948; 299,09611; 70,06513; 84,08078; 327,12741; 71,07295; 355,15806
52.	Udenafil	C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S	[M+H] ⁺	517,25915	84,08078; 112,11208; 283,11895; 58,06513; 325,16590; 299,11387; 81,06988; 255,12404; 79,05423; 82,06513
53.	Vardenafil	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	[M+H] ⁺	489,22785	169,09715; 344,14791; 110,06004; 299,11387; 72,08078; 123,09167; 70,06513; 376,10740; 68,01309; 113,10732
II	Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân				
54.	Sibutramin	C ₁₇ H ₂₆ ClN	[M+H] ⁺	280,18237	125,01525; 139,03096; 103,05428; 153,04664; 97,10118; 179,06220; 83,08553; 103,05423
55.	Desmethyl sibutramin	C ₁₆ H ₂₄ ClN	[M+H] ⁺	266,16693	125,01530; 139,03090; 153,46910; 103,05490

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
56.	Didesmethyl sibutramin	C ₁₅ H ₂₂ ClN	[M+H] ⁺	252,15118	125,01532; 139,03085; 235,12460
57.	Fenfluramin	C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N	[M+H] ⁺	232,13080	159,04160; 109,04484; 83,02922; 187,07290
58.	Loperamid	C ₂₉ H ₃₃ N ₂ O ₂ Cl	[M+H] ⁺	477,23033	72,04439; 115,05423; 210,12773; 238,12264; 266,15394; 267,15683
59.	Phenylpropanolamin	C ₉ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	152,10699	56,04948; 91,05423; 115,05423; 117,06988; 134,09643
III	Nhóm chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiêu đường				
60.	Metformin	C ₄ H ₁₁ N ₅	[M+H] ⁺	130,10872	60,05562; 71,06043; 85,05091; 96,05560; 113,08220; 88,08629; 56,03760; 68,02431
61.	Phenformin	C ₁₀ H ₁₅ N ₅	[M+H] ⁺	206,14002	60,05563; 164,11830; 85,05080; 105,06991; 189,11356; 147,09160; 103,05430; 79,05428
62.	Buformin	C ₆ H ₁₅ N ₅	[M+H] ⁺	158,14002	60,19998; 141,21040; 116,21155; 99,00078; 85,11143
63.	Glibenclamid	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	[M+H] ⁺	494,15110	55,05484; 100,11210; 169,00517; 198,03165; 259,05195; 304,07351; 369,06702; 414,12357;
64.	Gliclazid	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	[M+H] ⁺	324,13764	110,09643; 119,06048; 127,12302; 153,10220; 168,11315; 80,07007; 93,07029; 91,05423; 65,03860

Kết quả trong bảng cho thấy, các mảnh con thu được của từng chất cấm dao động từ 9- 15 mảnh, do đó phương pháp đảm bảo độ đặc hiệu. Đối chiếu với thư viện mzCloud, mảnh mẹ của các chất cấm đều có độ chính xác khối so với mảnh lý thuyết trong khoảng 5 ppm (5×10^{-6}), đạt yêu cầu đặt ra của AOAC [29].

3.1.1.2. Tìm kiếm mảnh phổ lý thuyết

Trong số các chất cấm được nghiên cứu, các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý được xem là phức tạp nhất do sự đa dạng của chúng. Ban đầu chỉ một số chất như: sildenafil, tadalafil, vardenafil được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên, để tránh sự kiểm tra của các cơ quan chức năng dẫn đến ngày càng nhiều các chất PDE-5i và chất tương tự chúng được tổng hợp. Các chất thay thế chỉ khác các chất nhóm PDE-5i nguyên bản ở một hoặc vài nhóm thế. Các dẫn chất này có hoạt độ, tác dụng tương tự với các chất gốc nên có thể được phân lập và sử dụng trái phép trong TPBVSK. Do đó, cần thiết phải tối ưu các điều kiện để phát hiện được các chất tương tự trong cùng nhóm của các chất cấm, khi không có chất chuẩn của chúng.

Đối với các chất PDE-5i chưa có chất chuẩn, nhưng đã có các thông tin về phân mảnh đã được công bố, tiến hành tra cứu mảnh phổ lý thuyết theo thư viện Mzcloud. Sau đó, tiến hành xây dựng bảng phổ lý thuyết của một số chất phân tích để ứng dụng phân tích sàng lọc. Kết quả được trình bày trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Các mảnh phổ lý thuyết của ion mẹ và ion con của chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý còn lại

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
1.	Desmethylthiosildenafil	$C_{21}H_{28}N_6O_3S_2$	$[M+H]^+$	477,17371	85,07602; 299,09610; 327,12784; 56,04948; 269,04858; 241,05429; 298,08833; 271,10053; 227,03792

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
2.	Desmethylenetadalafil	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	378,14483	204,08008; 204,08008; 123,04416; 250,08603; 180,08008; 169,07649; 234,09136; 130,06517; 256,10812; 238,08639
3.	Dinitrodenafil	C ₁₇ H ₁₈ N ₆ O ₆	[M+H] ⁺	403,13606	283,11279; 358,10269; 375,10480; 225,07710; 361,10172; 154,06116; 344,09900; 344,09900; 217,10846; 253,07246
4.	Gisadenafil	C ₂₃ H ₃₃ N ₇ O ₅ S	[M+H] ⁺	520,23366	72,08078; 111,09170; 58,06513; 99,09167; 56,04948; 83,06037; 70,06513; 113,10734; 332,13530
5.	N-Butyltadalafil	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	432,19178	135,04416; 204,08008; 169,07669; 262,08630; 205,08862; 250,08634; 282,16011; 232,07572; 191,07683; 264,10196
6.	N-Ethyltadalafil	C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	404,16048	135,04418; 204,08008; 169,07646; 262,08663; 205,08876; 232,07574; 250,08663; 233,08345; 254,12880; 191,07360
7.	Propoxyphenyl-thioildenafil	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₃ S ₂	[M+H] ⁺	519,22066	477,17455; 458,11860; 407,12811; 341,14373; 315,09125; 299,09564; 271,26389; 245,50922; 195,92928; 149,23769; 135,60355

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
8.	Propoxyphenyl-sildenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	489,22785	58,06513; 283,11900; 100,09905; 99,09167; 299,11723; 56,04948; 255,12484; 225,07742; 166,09745; 97,07602
9.	Propoxyphenyl-thiosildenafil	$C_{23}H_{32}N_6O_3S_2$	$[M+H]^+$	505,20501	58,06513; 299,09610; 99,09167; 100,09950; 313,11180; 56,04948; 70,06513; 315,09170; 329,10671; 271,10124
10.	Pyrazole N-demethylsildenafil	$C_{21}H_{28}N_6O_4S$	$[M+H]^+$	461,19655	297,13460; 313,12095; 58,06513; 101,10783; 241,10848; 269,10383; 99,09167; 285,09862; 70,06513; 212,07005
11.	Thiosildenafil	$C_{22}H_{30}N_6O_3S_2$	$[M+H]^+$	491,18936	58,06513; 99,09167; 100,09951; 299,09610; 56,04948; 70,06513; 341,14224; 327,12074; 85,07602; 312,10331
12.	Vardenafil N-oxide	$C_{23}H_{32}N_6O_5S$	$[M+H]^+$	505,22277	169,09723; 344,14790; 477,19105; 70,06513; 113,10733; 110,06285; 377,12768; 123,09170; 98,08385; 56,04948
13.	Vardenafil oxopiperazine	$C_{21}H_{26}N_6O_5S$	$[M+H]^+$	475,17582	169,09712; 344,14793; 110,06459; 299,11309; 123,09178; 316,11606; 68,01309; 82,06513; 55,05423; 95,06037

STT	Tên chất	Công thức phân tử	Dạng ion	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)
14.	Zaprinast	C ₁₃ H ₁₃ N ₅ O ₂	[M+H] ⁺	272,11420	120,04447; 202,06118; 230,06733; 92,04948; 157,03916; 104,04957; 55,02907; 65,03858; 159,05530; 132,04440

Trên cơ sở đó, tiến hành xây dựng nguồn dữ liệu đối chiếu (thư viện) để phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý, nhóm hỗ trợ giảm cân và nhóm hỗ trợ tiểu đường gồm một số thông tin trong thư viện ở bảng 3.1 - 3.2. Hình 3.1 minh họa thư viện phổ của aminotadalafil đã được xây dựng với các thông tin như tên chất phân tích, công thức phân tử, mảnh mẹ, các mảnh con với phần mềm TraceFinder. Để định lượng aminotadalafil theo lý thuyết phân mảnh của khối phổ, từ 1 mảnh mẹ sẽ có 10 mảnh con, tất cả đều có độ phân giải lệch khối cỡ 5 ppm Da, điều này cho phép xác định chính xác và nâng cao tính chọn lọc khi phân tích đồng thời nhiều chất cùng nhóm. Thư viện phổ của nghiên cứu được xây dựng dựa trên rất nhiều chất phân tích.

Compound Database - PDE5-20230224

Tree View Pane

Expand All Collapse All

- All Results
 - *_JSTD_Pyrazole N-Demethyl Sildenafil-d3 (AOAC)
 - *_JSTD_Tadalafil-d3 (AOAC)
 - *_JSTD_Vardenafil-d5
 - 2-Hydroxypropylnortadalafil
 - Acetaminotadalafil (AOAC)
 - Acetil acid
 - Acetildenafil (AOAC)
 - Acetylvardenafil
 - Aminotadalafil**
 - T1: 391.14008
 - T1F1: 391.14008 -> 135.04406
 - T1F2: 391.14008 -> 262.0859
 - T1F3: 391.14008 -> 311.11348
 - T1F4: 391.14008 -> 269.10399
 - T1F5: 391.14008 -> 250.08599
 - T1F6: 391.14008 -> 169.07598
 - T1F7: 391.14008 -> 302.08074
 - T1F8: 391.14008 -> 233.0837
 - T1F9: 391.14008 -> 205.08599
 - Avanafil (AOAC)
 - Benzamidenafil
 - Benzylsildenafil
 - Carbodenafil
 - Chlorodenafil
 - Chloropretadalafil
 - Cyclopentylafil
 - Depiperazinotiosildenafil
 - Descarbonsildenafil
 - Desmethyl carbodenafil
 - Desmethyl fondenafil
 - Desmethylenetadalafil
 - Desmethylthiosildenafil
 - Dimethylacetildenafil
 - Dimethylsildenafil
 - Dinitrodenafil
 - Dithiodesmethylcarbodenafil
 - Gendenafil
 - Gisadenafil
 - Homosildenafil (AOAC)
 - Hydroxyacetildenafil (AOAC)
 - Hydroxychlorodenafil
 - Hydroxyhomosildenafil (AOAC)
 - Hydroxythiohomosildenafil (AOAC)
 - Hydroxythiovaridenafil
 - Hydroxyvardenafil
 - Icariin
 - Imidazosagatriazinone
 - Isosildenafil
 - Lodenafil carbonate (AOAC)
 - Mirodenafil (AOAC)
 - Mutaprodenafil
 - N-Butyl Nortadalafil

Peak View Pane

Compound Name	Peak Label	Peak Workflow	Associated Target Peak	Chemical Formula	MS Order	Precursor m/z	Product m/z	m/z	Adduct	Polarity
Aminotadalafil	T1: 391.14008	TargetPeak		C21H18N4O4	ms1	0.000	391.14008	391.14008	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F1: 391.14008 -> 13	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	135.04406	135.04406	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F2: 391.14008 -> 26	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	262.0859	262.0859	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F3: 391.14008 -> 31	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	311.11348	311.11348	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F4: 391.14008 -> 26	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	269.10399	269.10399	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F5: 391.14008 -> 25	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	250.08599	250.08599	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F6: 391.14008 -> 16	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	169.07598	169.07598	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F7: 391.14008 -> 30	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	302.08074	302.08074	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F8: 391.14008 -> 23	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	233.0837	233.0837	Hydrogen	Positive
Aminotadalafil	T1F9: 391.14008 -> 20	Fragment	T1: 391.14008	C21H18N4O4	ms2	391.14008	205.08599	205.08599	Hydrogen	Positive

Compound Details Pane

Compound Name: Aminotadalafil

Ionization: ESI

Chemical Formula: C21H18N4O4 Neutral Mass: 390.13280494

CAS No: Category:

Compound Type: Analyte Internal Standard:

Compound Groups:

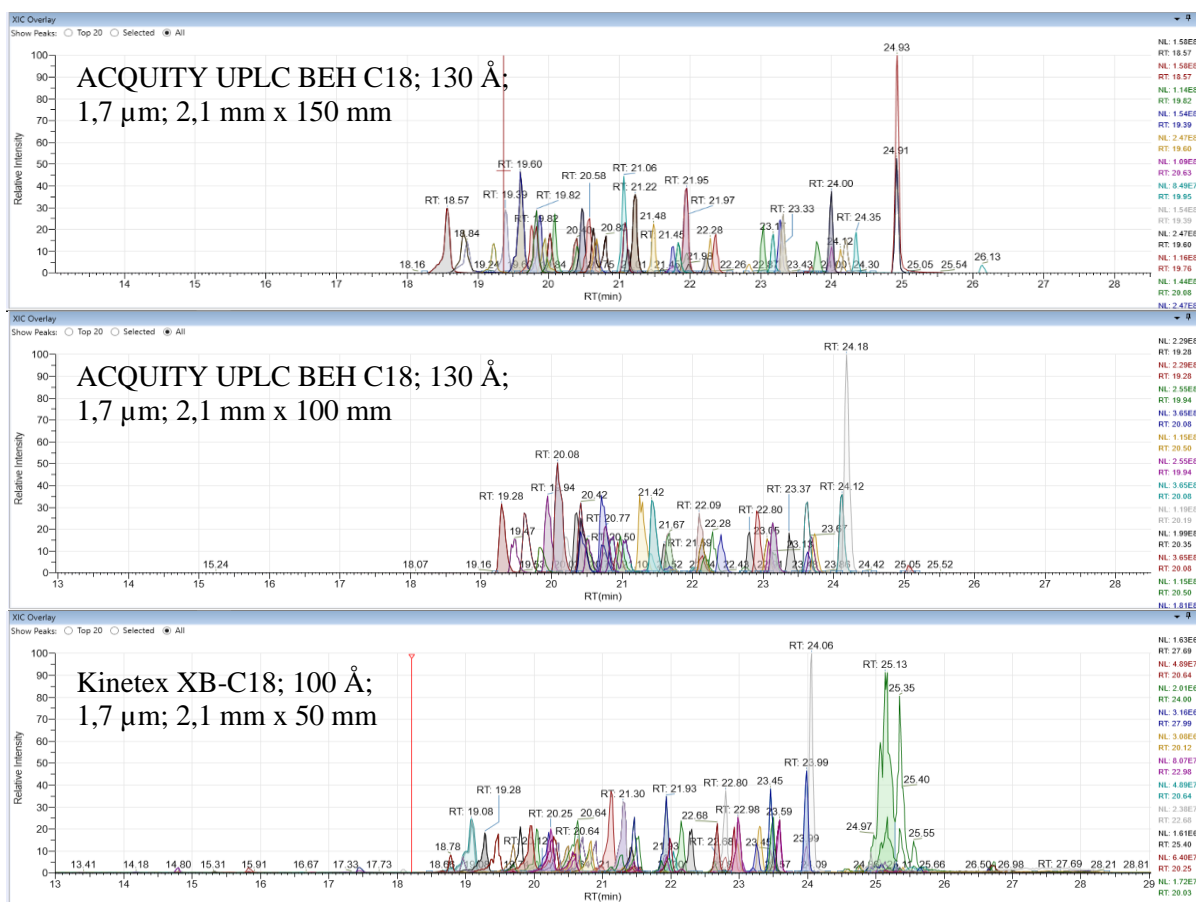
Hình 3.1. Hình ảnh minh họa xây dựng thư viện phổ của aminotadalafil

3.1.2. Điều kiện sắc ký lỏng phân tích chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

3.1.2.1. Khảo sát cột tách

Các chất cấm được nghiên cứu là các hợp chất có tính phân cực từ trung bình đến yếu, do đó cột sắc ký pha đảo có thể được sử dụng. Trên cơ sở các nghiên cứu đã công bố, cột tách sắc ký được sử dụng là cột C18, phương pháp phân tích được thực hiện trên thiết bị sắc ký lỏng cao áp nên có thể sử dụng cột có cỡ hạt nhỏ, hơn nữa kích thước cỡ hạt càng nhỏ thì hiệu quả tách tốt.

Nghiên cứu tiền hành khảo sát các cột khác nhau gồm ACQUITY UPLC BEH C18 column; 130Å; 1,7 µm; 2,1 mm x 150 mm; ACQUITY UPLC BEH C18 column; 130Å; 1,7 µm; 2,1 mm x 100 mm và Kinetex XB- C18 column; 100 Å; 1,7 µm; 2,1 mm x 50 mm được trình bày trong mục 2.2.2. Tín hiệu pic thu nhận của các chất phân tích được thể hiện tại hình 3.2.



Hình 3.2. Sắc ký đồ TIC của các chất nhóm hỗ trợ sinh lý tại các cột sắc ký khác nhau

Từ kết quả trong hình 3.2 cho thấy, cột ACQUITY UPLC BEH C18 130Å; 1,7µm; 2,1 mm x 150 mm có kích thước hạt nhỏ và chiều dài phù hợp để tách các chất phân tích và độ phân giải tốt so với hai cột sắc ký còn lại. Do vậy, cột được chọn làm điều kiện tối ưu.

Để đảm bảo tuổi thọ của cột, tiền cột tương ứng của cột BEH C18 (100 mm x 1,7 µm x 2,1 mm) được sử dụng và thiết bị được cài đặt bước gia nhiệt trước cột tại 40 °C.

3.1.2.2. *Khảo sát thành phần pha động*

Các chất phân tích được ion hóa ở dạng M+H. Do đó, khi sử dụng pha động chỉ bao gồm dung môi hữu cơ như acetonitril hoặc methanol cho tín hiệu của chất phân tích kém. Acid formic 0,1% thường được bổ sung vào pha động khối phổ để làm tăng khả năng ion hóa của chất phân tích. Một số công bố chỉ phân tích riêng các nhóm chất cấm thường sử dụng pha động là acetonitril chứa 0,1% acid formic, và methanol chứa 0,1% acid formic [52, 68, 74, 102]. Kết quả khảo sát pha động gồm acetonitril chứa 0,1% acid formic và methanol chứa 0,1% acid formic cho thấy hình dạng pic của các chất đã được cải thiện, cho pic nhọn và cân đối, đặc biệt đối với các chất có chứa nhóm acid carboxylic trong phân tử như norneovardenafil. Mặc dù vậy, khi pha động chỉ được bổ sung acid formic 0,1%, các chất phân tích có nhiều nhóm nitơ cơ bản trong phân tử, chất phân tích ở dạng trung tính và dạng ion hóa bị gặp các vấn đề về sắc ký như bị kéo đuôi hoặc hình dạng pic xấu, hoặc tách không tốt do ảnh hưởng của pH. Để khắc phục vấn đề này, bổ sung amoni format 10 mM và acid formic 0,1% trong cả pha động A và B để ổn định pH. Kết quả này tương đồng với điều kiện sắc ký đã được quy định tại AOAC 2015.12 để sàng lọc các chất cấm nhóm PDE-5i. Bên cạnh đó, thành phần pha động hữu cơ có tác động đáng kể đến độ phân giải sắc ký giữa một số hợp chất. Một số hợp chất nhóm PDE-5i có cùng số khối và giống nhau về các mảnh ion con nên không thể phân biệt được chúng dựa trên kiểu phân mảnh MS. Vì vậy, cần thiết phải nghiên cứu điều kiện tách sắc ký lỏng đối với các

hợp chất này. Kết quả tách tốt nhất thu được khi dung môi pha động chứa lượng MeOH và ACN với tỉ lệ 1:1.

Do đó, hệ dung môi pha động tối ưu gồm:

- Kênh A: 10 mM ammonium format và 0,1% acid formic trong nước

- Kênh B: 10 mM ammonium format và 0,1% acid formic trong acetonitril:methanol (1:1, v/v).

Sắc ký đồ tối ưu của một số chất cấm được chỉ ra tại Hình 3.3.

3.1.2.3. Khảo sát tỉ lệ pha động

Một số chất cấm có công thức cấu tạo tương tự nhau và chỉ khác nhau ở các nhóm thế, nên nhiều chất cấm cùng nhóm có nhiều chất trùng nhau mảnh mẹ và 1 số mảnh con. Để phân biệt các chất phân tích, bên cạnh sự phân tách về phổ MS/MS, phương pháp cần có sự phân tách sắc ký. Ngoài ra, quy trình sàng lọc các chất cấm được xây dựng trên nền mẫu TPBVSK là những nền mẫu phức tạp. Chế độ phân tích ở khối phổ là fullscan sẽ quét tất cả các chất phân tích trong dịch chiết dẫn tới các tạp chất sẽ ảnh hưởng đến tín hiệu của chất phân tích. Do vậy, cần phải khảo sát tỉ lệ pha động để tách các chất cấm ra khỏi nhau và ra khỏi tạp chất.

Tiến hành khảo sát một số chế độ đẳng dung môi với các tỷ lệ pha động (kênh A: B): 80:20; 60:40; 40:60; 20:80 cho thấy: Khi tiến hành rửa giải bằng chế độ đẳng dung môi, các pic thu được tù, bị kéo đuôi, độ nhạy kém, ảnh hưởng tới kết quả phân tích. Khi giảm tỷ lệ thành phần dung môi hữu cơ thì thời gian lưu của các chất tăng và các chất ra muộn. Đặc biệt khi rửa giải với tỷ lệ 80:20, chỉ có một số chất được rửa giải, các chất còn lại không được rửa giải, đồng thời với tỷ lệ pha động này các pic bị kéo đuôi và đỉnh tù.

Qua việc khảo sát 4 tỷ lệ pha động ở chế độ đẳng dung môi, nhận thấy việc tách và xác định các chất cấm có cấu trúc gần giống nhau bằng chế độ đẳng dung môi là không phù hợp. Do đó, cần sử dụng chương trình rửa giải gradient.

Dựa trên kết quả phân tích đẳng dung môi, nhận thấy khi tiến hành rửa giải với tỷ lệ thành phần dung môi hữu cơ tăng dần thì các chất được rửa tương đối tốt, pic nhọn, cân đối, tách tốt, với thời gian lưu dưới 25 phút. Do đó, xây dựng chế độ

rửa giải gradient với các điều kiện như bảng 3.3. Quá trình tăng từ từ kênh B (kênh dung môi hữu cơ) từ 5 phút (2% kênh B) đến 25 phút (95% kênh B) là cần thiết để tách hoàn toàn các chất phân tích ra khỏi nhau và ra khỏi nền mẫu để có sự phân tích tốt nhất bằng hệ thống khối phổ phân giải cao.

Bảng 3.3. Chương trình gradient tối ưu phân tích các chất cấm

Thời gian	Kênh A (%)	Kênh B (%)	Tốc độ dòng (mL/phút)
0,0	98	2,0	0,3
5,0	98	2,0	0,3
15,0	60	40	0,3
22,0	5,0	95	0,3
25,0	5,0	95	0,3
26,0	98	2,0	0,3
29,0	98	2,0	0,3

Quá trình phân tích 64 chất cấm chỉ trong vòng 29 phút, với tốc độ dòng được đặt cố định là 0,3 mL/phút. Với điều kiện gradient nêu trên, thời gian lưu của các chất cấm được trình bày trong bảng 3.4.

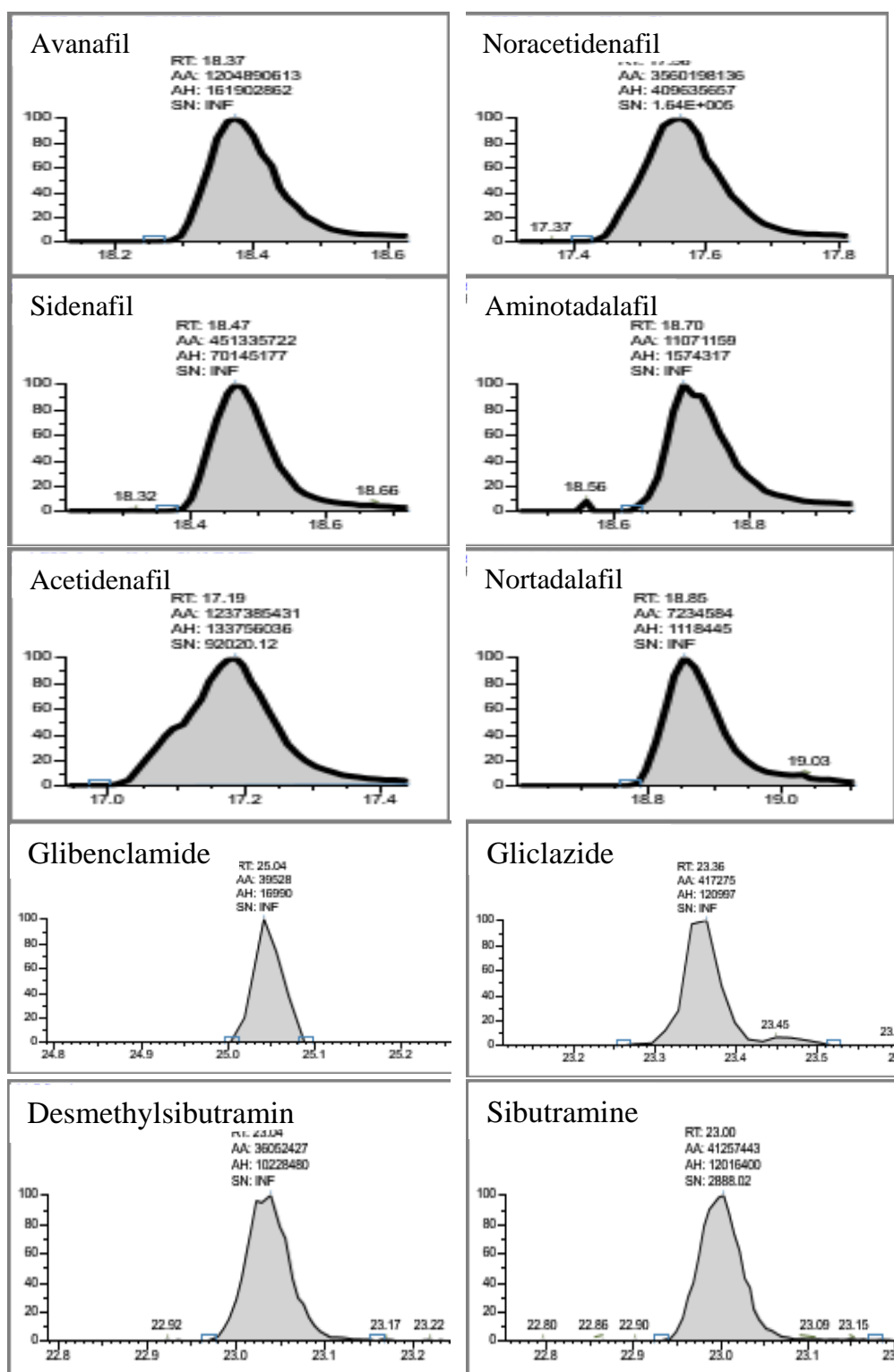
Bảng 3.4. Thời gian lưu của các chất cấm

TT	Tên chất	Mảnh m/z	RT (phút)	TT	Tên chất	Mảnh m/z	RT (phút)
1	Mirodenafil	532,25882	9,37	33	Nortadalafil	376,12918	18,14
2	Noracetildenafil	453,26087	17,56	34	Udenafil	517,25915	18,56
3	Desmethyl fondenafil	439,24589	19,29	35	Benzamidenafil	390,16596	18,74
4	N-Octylnortadalafil	489,31264	21,81	36	Norneovardenafil	357,15573	19,04
5	Acetylvardenafil	467,27652	17,31	37	Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil	519,23842	18,78
6	MDLenafil carbonate	1048,64223	20,77	38	O-desethyl-o-propyl sildenafil	489,22845	18,70
7	Hydroxyacetildenafil	483,27143	17,63	39	2-Hydroxypropyl nortadalafil	434,17105	19,04
8	Carbodenafil	453,26087	17,47	40	Tadalafil	390,14483	18,35
9	Acetildenafil	467,27652	17,19	41	Propoxyphenyl aildenafil	503,24468	18,83

TT	Tên chất	Mảnh mẹ (m/z)	RT (phút)	TT	Tên chất	Mảnh mẹ (m/z)	RT (phút)
10	Descarbonsildenafil	463,21291	17,36	42	Acetil acid	357,15570	19,46
11	Piperiacetildenafil	438,24997	18,02	43	Depiperazino-thiosildenafil	409,10118	19,87
12	Dimethylacetildenafil	467,27652	17,75	44	Mutaprodenafil	630,22824	20,02
13	Hydroxyvardenafil	505,22277	18,10	45	Gendenafil	355,17647	19,65
14	N-Desethylvardenafil	461,19655	18,10	46	Hydroxychlorodenafil	391,15314	19,74
15	Piperazonifil	483,27256	19,23	47	Hydroxythiovardenafil	521,19992	20,21
16	Vardenafil	489,22785	19,10	48	Chloropretadalafil	427,10553	20,36
17	Avanafil	484,18584	18,37	49	Chlorodenafil	389,13749	20,42
18	Isosildenafil	475,21220	18,42	50	Benzylsildenafil	551,24350	20,63
19	Hydroxyhomosildenafil	505,22277	19,62	51	Nitrodenafil	358,15098	20,87
20	N-Desmethylsildenafil	461,19655	18,56	52	Pseudovardenafil	460,20130	20,68
21	Sildenafil	475,21220	18,47	53	Imidazosagatriazinone	313,16590	20,73
22	Homosildenafil	489,22785	19,73	54	Propoxyphenylthio- hydroxyhomosildenafil	535,21557	20,86
23	Acetaminotadalafil	433,15065	18,70	55	Thiohomosildenafil	505,20501	20,55
24	Aminotadalafil	391,14008	19,82	56	Hydroxythio- homosildenafil	521,19992	19,83
25	Sildenafil N-oxide	491,20712	19,65	57	Norneosildenafil	460,20130	21,32
26	Cyclopentylnafil	529,25920	19,07	58	Thioaildenafil	505,20501	21,13
27	Dimethylsildenafil	489,22785	19,36	59	Sibutramin	280,18237	22,64
28	Metformin	130,10872	1,88	60	Desmethyl sibutramin	266,16693	22,87
29	Phenformin	206,14002	6,65	61	Didesmethyl sibutramin	252,15118	22,24
30	Buformin	158,14002	6,63	62	Fenfluramin	232,13080	19,44
31	Glibenclamid	494,15110	24,52	63	Loperamid	477,23033	22,21
32	Gliclazid	324,13764	22,64	64	Phenylpropanolamin	152,10699	10,55

Kết quả cho thấy, có thể tách được các chất cấm dựa trên sự khác nhau về khối và thời gian lưu. Trong số các PDE-5i, có một nhóm hợp chất có khối lượng phân tử giống nhau như Carbodenafil và Noracetildenafil hay Benzamidenafil và Tadalafil... Tuy nhiên, về mặt sắc ký, đã tách được các hợp chất này, thời gian lưu của các hợp

chất khác biệt rõ ràng. Một số sắc ký đồ phân tích các chất cảm được đưa ra ở hình 3.3.



Hình 3.3. Sắc ký đồ một số chất cảm tại điều kiện sắc ký lỏng tối ưu

3.1.3. Thẩm định phương pháp LC-HR/MS sàng lọc một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường

Theo hướng dẫn của AOAC [21], việc thẩm định phương pháp định tính cần thực hiện đánh giá 2 thông số: tính chọn lọc (đặc hiệu) và giới hạn phát hiện (đánh giá xác suất phát hiện (POD) tại một số nồng độ.

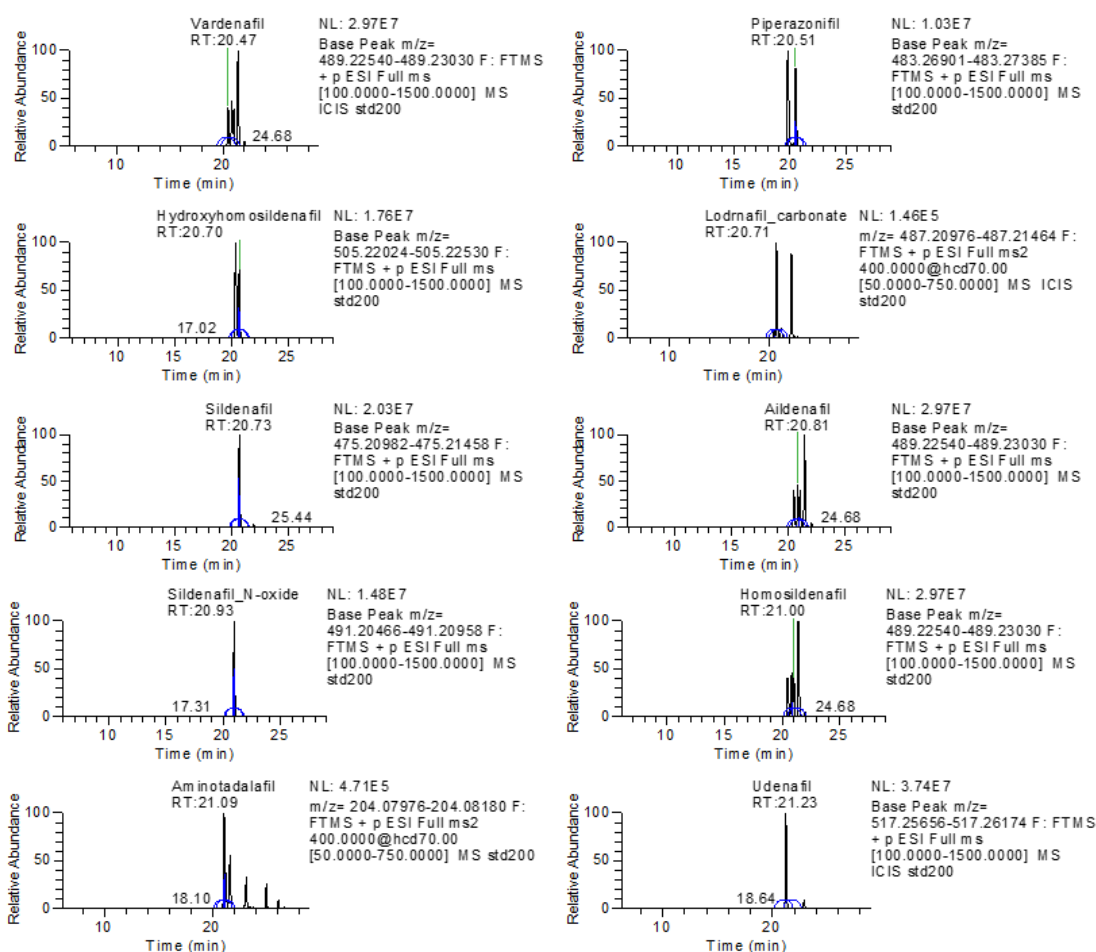
3.1.3.1. Giới hạn phát hiện

Tiến hành thêm chuẩn các nồng độ nhỏ dần của hỗn hợp các chất cấm vào nền mẫu trắng. Tại mỗi nồng độ thực hiện 20 lần. Phân tích các mẫu và xác định giới hạn lặp lại là nồng độ mà tại đó ≥ 19 mẫu cho kết quả dương tính. Kết quả thu được như trong Bảng 3.5 và hình 3.4.

Bảng 3.5. Giới hạn phát hiện của các chất cấm

STT	Chất phân tích		Nồng độ dung dịch	MDL
1	Chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý	Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil	25 ng/L	1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
		Các chất còn lại	2,5 ng/mL	0,1 mg/kg
2	Chất cấm nhóm hỗ trợ giảm cân		2,5 ng/L	0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$
3	Chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường		2,5 ng/mL	0,1 mg/kg

Hình 3.4 là sắc ký đồ một số chất cấm tại mức MDL.



Hình 3.4. Sắc ký đồ của một số chất cấm tại mức MDL

3.1.3.2. Tính chọn lọc (độ đặc hiệu)

Mỗi nhóm chất đều được xác định trên các nền mẫu phổ biến tương ứng với từng loại TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân, tiểu đường trong thực tế. Điều này đã được thể hiện ở mục 2.2.4.

Tiến hành tạo mẫu và phân tích theo thứ tự ngẫu nhiên của 20 mẫu đối chứng âm, 20 mẫu đối chứng dương được chuẩn bị như mục 2.2.4.1. Kết quả được tính theo công thức tại Bảng 2.3 và thể hiện trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Đánh giá tính chọn lọc của phương pháp

Loại mẫu	Số lượng mẫu	Mẫu dương (+)	Mẫu âm (-)
Mẫu dương (+)	20	19	1
Mẫu âm (-)	20	0	20
Độ chọn lọc: 95,2%			

Như vậy, phương pháp có độ chọn lọc đạt yêu cầu.

3.1.4. Sàng lọc các chất cấm nhóm hỗ trợ chức năng sinh lý, giảm cân và tiểu đường trong mẫu TPBVSK

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, 92 mẫu TPBVSK hỗ trợ tăng cường sinh lý, 30 mẫu hỗ trợ giảm cân và 30 mẫu hỗ trợ tiểu đường dạng viên nang cứng và viên nang mềm được tiến hành phân tích sàng lọc bằng chế độ FullMS-dd-dependent-MS². Kết quả phân tích được sàng lọc bằng phần mềm Compound Discoverer 3.1.

Nghiên cứu tiến hành so sánh dữ liệu sắc ký đồ và mảnh phổ tương ứng với thư viện phổ tự thiết lập, thư viện phổ online Mzcloud, thư viện Spiderchem, thư viện Mzvault và dự đoán công thức cấu trúc chất phân tích. Độ chính xác của kết quả được đánh giá thông qua chỉ số ghép (matching index) đối với mỗi thư viện phổ. Hình 3.5 minh họa việc tìm kiếm các hợp chất chưa biết trong mẫu TPBVSK.

Sau khi sử dụng phần mềm để dự đoán các chất phân tích, độ chính xác của chất phân tích có mặt trong mẫu được thể hiện qua độ khớp với từng thư viện phổ.

+ Tại mỗi điểm trên sắc ký đồ, tín hiệu chất phân tích và phổ đồ tương ứng được dự đoán cấu trúc thông qua mảnh ion cao nhất, các mảnh đồng vị và các mảnh con tương ứng. Từ lý thuyết giải phổ đồng vị và mảnh con, dự đoán cấu trúc chất phân tích.

+ Đối với chất phân tích đã được dự đoán ở trên, tiến hành so sánh và khớp công thức hóa học dự đoán và phổ đồ với các thư viện phổ. Các chất phân tích có mảnh phổ khớp nhất với thư viện có độ chính xác cao nhất. Các thông số được thể hiện qua chỉ số Mzcloud best match ($\geq 80\%$).

Name	Formula	FISH	Molecular Weight	RT (min)	Area (Max)	# Che	# m/z	mzCloud Be	Mar	mzCloud Best Sit	MS2	Fe	Group Areas
Benzamidenafil	C19 H23 N3 O6		389.15857	18.528	102733649	3	1	100.0					2.10e4, 2.07e4, 2.99e4, 3.59e4, 1.01e8
Piperacetildenafil	C24 H31 N5 O3		437.24269	16.913	445453939	1	4	100.0					3.28e5, 3.18e5, 4.05e5, 3.37e5, 3.32e8
Gendenafil	C19 H22 N4 O3		354.16928	19.575	452940404	10	10	99.9					1.26e4, 1.28e4, 2.29e4, 2.23e4, 4.45e8
Piperacetildenafil	C24 H31 N5 O3		437.24259	17.126	833246872	1	1	99.9					1.71e5, 1.37e5, 2.22e5, 1.84e5, 7.23e8
Norneo sildenafil	C22 H29 N5 O4 S		459.19485	20.817	264937975	2	8	99.9					3.59e4, 3.29e4, 4.46e4, 3.48e4, 2.49e8
Hydroxychloroder	C19 H23 Cl N4 O3		390.14595	19.592	199611958	1	4	99.9					1.16e4, 1.19e4, 1.75e4, 1.61e4, 1.94e8
Imidazosagatriazi	C17 H20 N4 O2		312.15858	20.535	512933070	10	2	99.9					5.08e4, 5.17e4, 6.75e4, 5.05e4, 4.93e8
Noracetildenafil	C24 H32 N6 O3		452.25350	16.441	1024117027	6	5	99.9					1.48e5, 1.44e5, 1.42e5, 1.58e5, 8.95e8
Pseudovardenafil	C22 H29 N5 O4 S		459.19487	20.416	323974552	2	8	99.9					1.96e4, 1.51e4, 1.78e4, 1.60e4, 3.15e8
Udenafil	C25 H36 N6 O4 S		516.25258	18.447	677615573	4	2	99.8					2.31e4, 2.18e4, 3.30e4, 2.63e4, 6.02e8
Avanafil	C23 H26 Cl N7 O3		483.17853	17.757	756671738	3	2	99.8					5.32e4, 5.19e4, 6.34e4, 5.66e4, 7.32e8
N-Desethyl varde	C21 H28 N6 O4 S		460.18918	17.511	248791900	7	5	99.8					7.29e4, 5.77e4, 7.55e4, 6.22e4, 2.24e8
Nitrodenafil	C17 H19 N5 O4		357.14403	20.322	100579912	3	5	99.8					1.26e4, 1.19e4, 1.83e4, 1.46e4, 9.94e7
Sildenafil	C22 H30 N6 O4 S		474.20455	17.844	295565930	6	2	99.8					4.93e4, 6.48e4, 6.16e4, 6.68e4, 2.45e8
N-Desmethyl sild	C21 H28 N6 O4 S		460.18917	17.847	172204158	7	10	99.7					5.24e4, 6.65e4, 5.94e4, 5.72e4, 1.40e8
Hydroxyacetideni	C25 H34 N6 O4		482.26402	16.050	401843002	3	3	99.7					2.55e5, 2.50e5, 2.58e5, 2.56e5, 2.13e8
Hydroxyvardeaf	C22 H27 N6 O5 S		504.21532	17.500	142002066	5	6	99.7					6.52e4, 6.52e4, 6.42e4, 6.52e4, 1.56e8

Hình 3.5. Minh họa việc tìm kiếm các hợp chất chưa biết nhóm chất cảm trong mẫu TPBVSK bằng phần mềm Compound discoverer

Bảng 3.7 tổng hợp các chất được phát hiện và số lượng mẫu tương ứng đã được phát hiện. Các kết quả cho thấy, một số chất nhóm PDE-5i đã được phát hiện trong các mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý; sibutramin, didesmethylsibutramin được phát hiện trong mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân và metformin được phát hiện trong mẫu TPBVSK hỗ trợ tiêu đường.

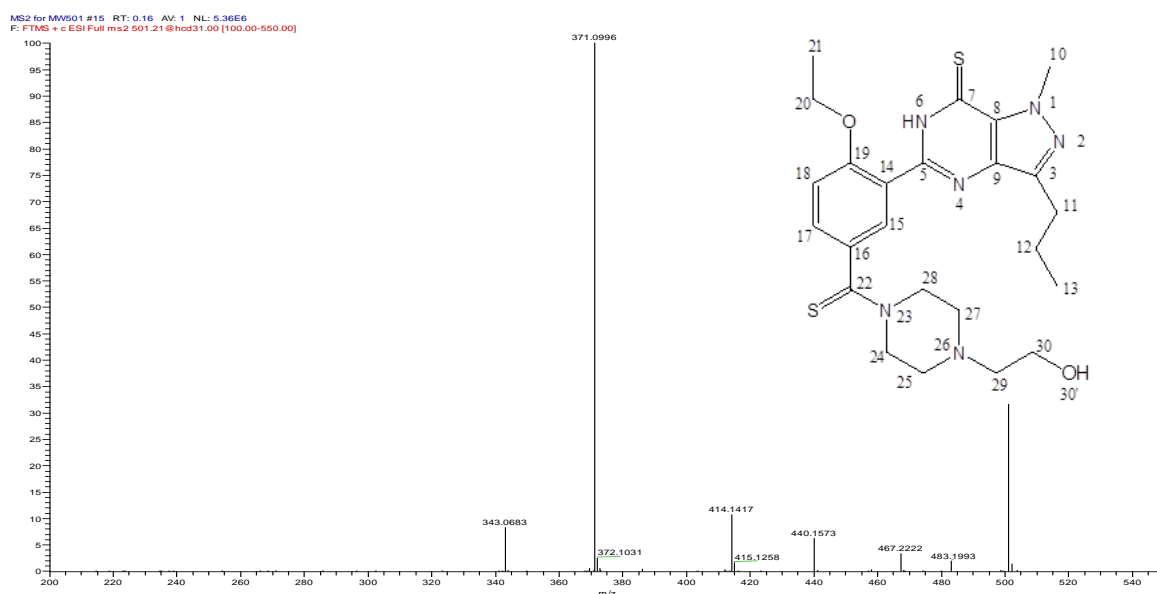
Bảng 3.7. Một số chất cảm được phát hiện trong mẫu TPBVSK

TT	Loại mẫu	Tổng mẫu	Chất phân tích	Số mẫu phát hiện	Mẫu
1	TPBVSK hỗ trợ sinh lý	92	Nortadalafil	11	SL.06 - SL.08, SL.14 - SL.16, SL.24, SL.30, SL.50, SL.61, SL.65
2			Tadalafil	10	SL.06 - SL.08, SL.18, SL.22, SL.38, SL.42,

TT	Loại mẫu	Tổng mẫu	Chất phân tích	Số mẫu phát hiện	Mẫu
					SL.50, SL.61, SL.82
3			Sildenafil	9	SL.08, SL.42
4			Hydroxyhomosildenafil	6	SL.13 - SL.17, SL.82
5			Hydroxythiohomosildenafil	6	SL.13 - SL.17, SL.82
6			Homosildenafil	6	SL.10, SL.13 - SL.17
7			Thiohomosildenafil	1	SL.10
8			Sildenafil N-oxyde	2	SL.06, SL.42
9			Chloropredadalafil	1	SL.30
10			Propoxyphenyl homohydroxysildenafil	1	SL.82
11			Propoxyphenylalildenafil	1	SL.10
12			Hydroxythiovarildenafil	1	SL.82
13			Methisosildenafil	1	SL.10
14			N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil	2	SL.18, SL.22
15	TPBVSK hỗ trợ giảm cân	30	Sibutramin	6	GC.05 - GC.10
16			Didesmethylsibutramin	1	GC.10
17	TPBVSK hỗ trợ tiêu đường	30	Metformin	1	TĐ.09

Trong số 92 mẫu TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý được phân tích, có 20 mẫu được phát hiện chứa PDE-5i, chiếm 21,7%. Trong tổng số 14 hợp chất PDE-5i được phát hiện, 12 chất đã có trong thư viện phổ của hệ thống, 01 hợp chất chưa có trong thư viện nhưng đã được công bố trên thế giới và 01 hợp chất có cấu trúc tương tự nhóm PDE-5i, tuy nhiên không phù hợp với các hợp chất trong thư viện. Để xác

nhận hợp chất này, nhóm nghiên cứu đã phối hợp với phòng thí nghiệm Dược phẩm (Bộ phận Khoa học ứng dụng, Cơ quan khoa học sức khỏe, Singapore) để phân lập, xác định cấu trúc bằng phổ hồng ngoại FTIR, phổ khối phân giải cao HRMS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR. Nó được đặt tên là N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil do có sự gắn kết của một nhóm hydroxyethyl với nitơ dị vòng của dithio-desethyl carbodenafil (Hình 3.6). Kết quả này đã được công bố trên Tạp chí phân tích dược phẩm và y sinh [59]. Hợp chất mới này không nằm trong danh mục chất cấm theo thông tư 10/2021/TT-BYT. Bên cạnh đó, trong số 14 hợp chất PDE-5i được phát hiện, có 10 chất (chiếm 71%) là các chất khác nhau tương tự của sildenafil. Tỷ lệ này cao hơn tỷ lệ được tìm thấy trong báo cáo của Kee và cộng sự [56]. Ngoài ra, có 3 chất tương tự của tadalafil (21%) và chỉ có 1 chất tương tự của vardenafil (7,1%). Điều này cho thấy sự đa dạng và phức tạp trong việc phát hiện các chất cấm nhóm PDE-5i và nghiên cứu đã bổ sung thêm vào ngân hàng dữ liệu toàn cầu 01 chất mới.



Hình 3.6. Phổ khối của hợp chất mới N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil

Trong số 30 mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân, có 06 mẫu dương tính với chất cấm, chiếm 20% số mẫu. Cả 06 mẫu dương tính đều phát hiện sibutramin và 01 mẫu chứa đồng thời cả sibutramin và didesmethylsibutramin. Việc trộn trái phép các chất

cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường có tỉ lệ thấp hơn, chỉ phát hiện 01 mẫu trong tổng số 30 mẫu, chiếm 3,33% và chỉ phát hiện 1 loại chất là metformin.

Các mẫu phát hiện dương tính với các chất cấm bằng phương pháp sàng lọc sau đó được phân tích định lượng nhằm đối chứng để khẳng định độ chính xác của phương pháp. Kết quả phân tích đối chứng cho thấy 100% số chất phát hiện bằng phương pháp sàng lọc hoàn toàn trùng khớp với phương pháp định lượng. Điều này chứng tỏ, phương pháp sàng lọc có độ chọn lọc và chính xác cao.

3.2. Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý

3.2.1. Điều kiện LC-MS/MS

Trong nghiên cứu này, 53 chất cấm nhóm PDE-5i được xác định, trong đó, có nhiều hợp chất là đồng phân cấu trúc của nhau, có cùng mảnh ion mẹ và các mảnh ion con hoặc có sự khác nhau về số khối không đáng kể. Để định lượng được đồng thời 53 chất này, cần có thiết bị khối phổ đảm bảo độ phân giải để phân biệt được các chất tương tự nhau trong cùng một nhóm. Thiết bị Ultimate 3000 kết nối với khối phổ Q-exactive Plus của Thermo Scientific được sử dụng trong phân tích sàng lọc các chất cấm tại mục 3.1 là thiết bị vừa có thể sàng lọc vừa có thể định lượng được các chất phân tích. Thiết bị này tiếp tục được sử dụng để định lượng các chất cấm nhóm PDE-5i trong TPBVSK hỗ trợ sinh lý đảm bảo độ phân giải, độ chọn lọc và độ chính xác.

Do vậy, các điều kiện LC-MS/MS tối ưu để định lượng đồng thời 53 PDE-5i là điều kiện đã được tối ưu tại mục 3.1, cụ thể như sau:

- Điều kiện LC:
 - + Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút
 - + Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng
 - + Thể tích bơm mẫu: 10 μ L
 - + Pha động: Theo chế độ gradient như Bảng 3.3
- Điều kiện khối phổ:
 - + Use lockmasses: Off

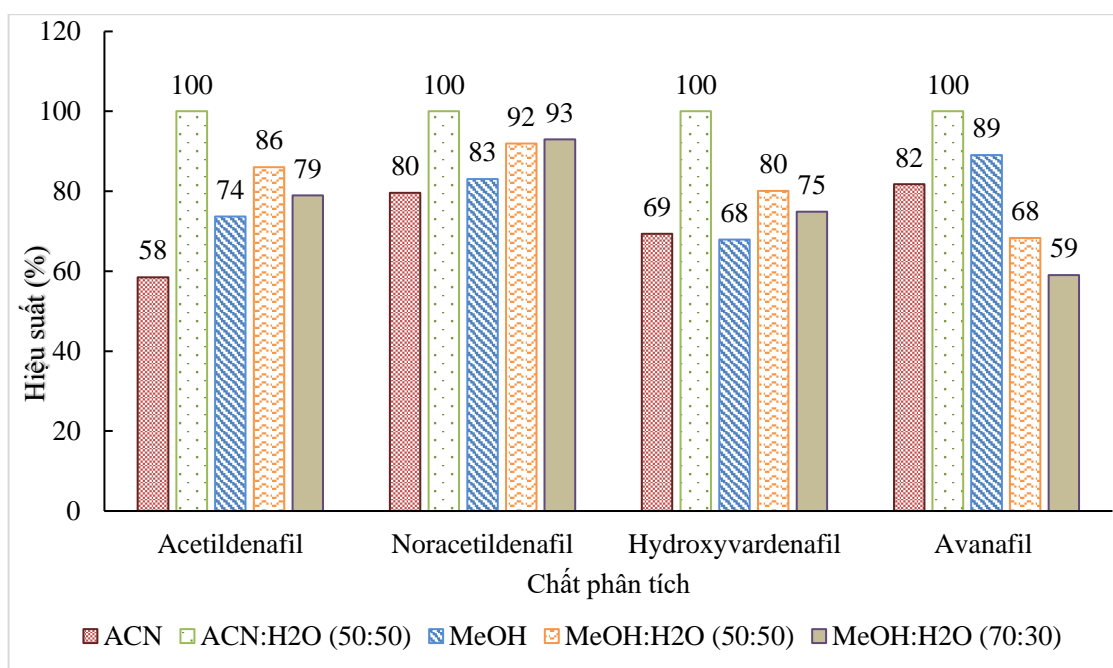
- + Lockmass injection: -
- + Chrom. Peak width: 10 s
- + Time Method duration: 29,00
- + HESI temperature: 320°C
- + Sheath gas: 30
- + Aux gas flow rate: 10
- Điều kiện FullMS/ dd MS²
 - Tổng thời gian quét: 0- 29 phút
 - Chế độ quét mảnh: Positive
 - Phân mảnh trong source (CID): 0 V
 - Điện tích (default charge): 1
 - Full MS microscan: 1
 - Độ phân giải: 70000
 - AGC target: 10⁶
 - Khoảng quét mảnh: 220 - 1100
 - Độ phân giải dd MS²: 17500
 - AGC target: 10⁵
 - Khoảng quét: 200 - 2000
 - NCE (năng lượng bắn phá tương đối): 40%, 70%, 100%
- Điều kiện phân mảnh (AIF)
 - Thời gian quét: 0-29 phút
 - Chế độ quét: Positive
 - Độ phân giải: 70000
 - NCE (năng lượng bắn phá tương đối): 40%, 70%, 100%
 - Khoảng quét: 50 - 750

Mảnh phổ: Cài đặt các mảnh phổ theo Bảng 3.1.

3.2.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu phân tích các chất nhóm hỗ trợ sinh lý

3.2.2.1. Khảo sát dung môi chiết

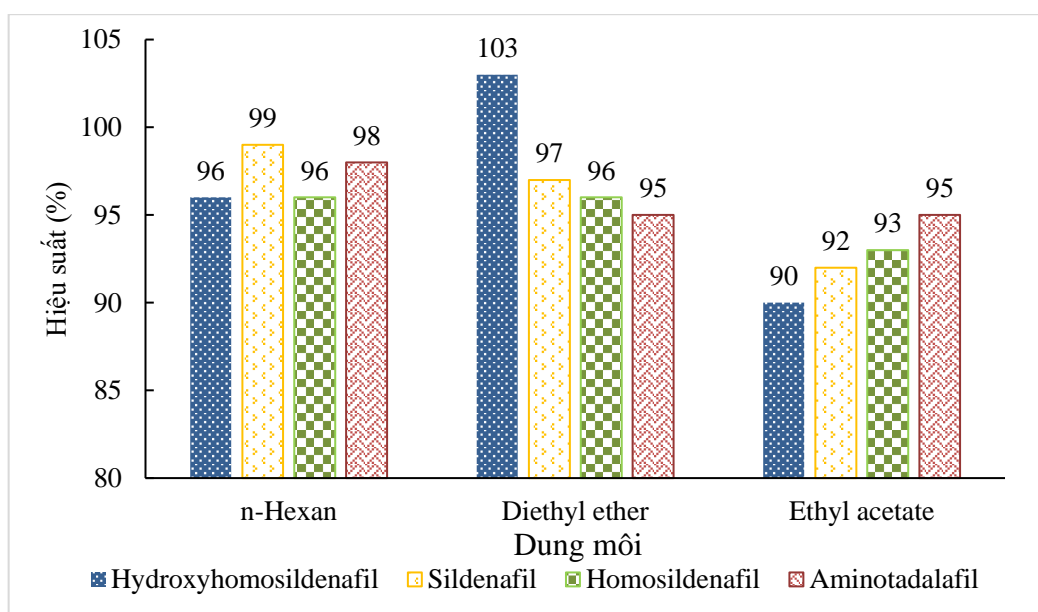
Nghiên cứu tiến hành khảo sát các hệ dung môi khác nhau gồm acetonitril, methanol, acetonitril: nước (50:50), methanol: nước (50:50), methanol: nước (70:30) được trình bày trong mục 2.2.2. Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu trắng thêm chuẩn chất phân tích PDE-5i tại nồng độ 4 mg/kg trên mẫu (tương ứng trên dịch cuối là 100 ng/mL). Kết quả khảo sát hiệu suất chiết của 4 chất đại diện được thể hiện trong hình 3.7.



Hình 3.7. Độ thu hồi một số chất PDE-5i tại dung môi chiết khác nhau

Phân tích ANOVA được sử dụng để so sánh hiệu suất chiết ở các điều kiện khác nhau cho giá trị P-value trong khoảng $1,5 \cdot 10^{-4} - 4,9 \cdot 10^{-6} < 0,05$ cho thấy sự khác nhau có nghĩa giữa các dung môi chiết khác nhau và hệ dung môi acetonitril: nước (50:50) cho độ thu hồi lớn nhất đối với các PDE-5i. So sánh với hỗn hợp methanol:nước (70:30) được sử dụng bởi Lee và cộng sự [67], Jeong và cộng sự [50] hoặc methanol được sử dụng bởi Ren và cộng sự [99], phương pháp này sử dụng lượng dung môi hữu cơ ít hơn, phù hợp với xu hướng hóa học xanh hiện nay. Do đó, hỗn hợp dung môi acetonitril: nước (50:50) đã được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu.

Đối với TPBVSK viên nang mềm dạng dầu, các chất béo có thể ảnh hưởng đến hiệu suất chiết và khả năng làm sạch mẫu. Nghiên cứu tiến hành khảo sát dung môi loại béo với 3 loại dung môi là n-hexane, diethyl ether, ethyl acetate và mẫu không loại béo được thực hiện trên mẫu trắng thêm chuẩn chất phân tích PDE-5i tại nồng độ 4 mg/kg trên mẫu (tương ứng trên dịch cuối là 100 ng/mL). Sau khi rung siêu âm mẫu với dung môi acetonitril: nước (50:50), thêm 10 mL dung môi loại béo, lắc đều và ly tâm, sau đó loại lớp dung môi lớp trên và tiến hành các bước như trên. Kết quả được thể hiện tại hình 3.8.

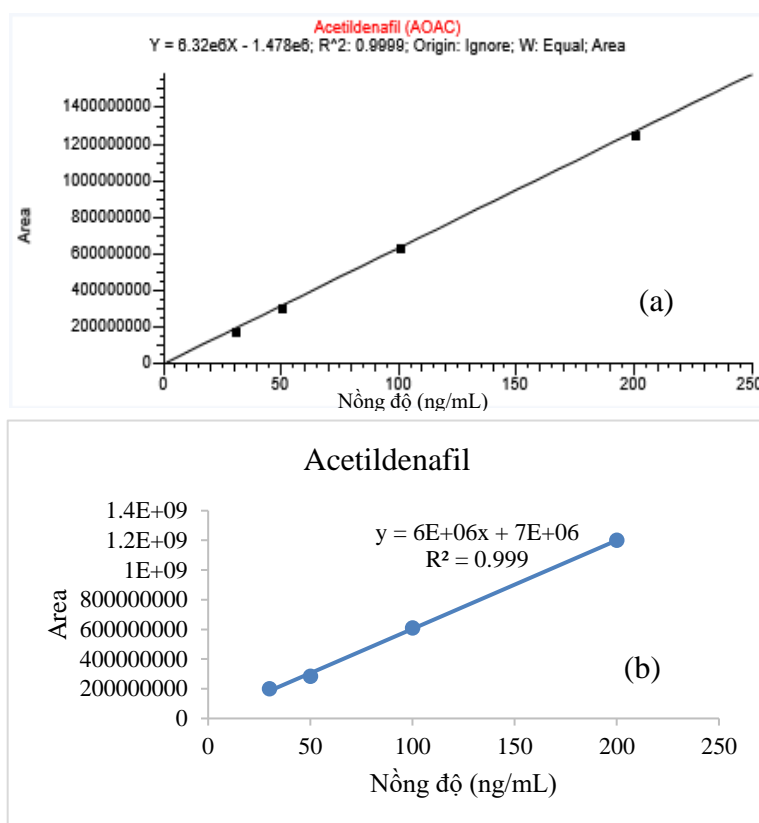


Hình 3.8. Biểu đồ kết quả khảo sát dung môi loại béo

Tiếp tục đánh giá hiệu quả của dung môi loại béo bằng cách sử dụng phân tích ANOVA. Cả ba cách làm sạch đều cải thiện cường độ của các chất phân tích. Cường độ của các chất phân tích trong các mẫu dầu được làm sạch bằng n-hexan cao hơn đáng kể so với các dung môi khác. Do đó, n-hexan được chọn để làm sạch các mẫu dầu nhằm giảm các hợp chất không mong muốn được đưa vào hệ thống LC-HR/MS, giúp bảo vệ nguồn ion khỏi các tạp chất béo. Việc sử dụng n-hexan trong các mẫu TPBVSK chứa dầu cũng chưa từng được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây.

3.2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng nền mẫu

Nghiên cứu tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu bằng cách lập đường chuẩn 3-5 điểm trên nền mẫu TPBVSK và đường chuẩn tương ứng trên nền dung môi, so sánh hệ số góc của đường chuẩn dựng trên nền dung môi và đường chuẩn dựng trên nền mẫu để đánh giá ảnh hưởng nền. Hình 3.9 là ví dụ về đánh giá ảnh hưởng nền của acetildenafil khi dựng đường chuẩn trên nền dung môi và đường chuẩn khi dựng trên nền viên nang cứng.



Hình 3.9. Đường chuẩn acetildenafil trên nền dung môi (a) và trên nền viên nang cứng (b)

Cách tính ảnh hưởng nền mẫu theo công thức:

$$\text{Matrix effects (ME)} = \frac{A - A'}{A} \times 100$$

Trong đó: A là hệ số góc của đường chuẩn trên nền dung môi

A' là hệ số góc của đường chuẩn trên nền mẫu.

Kết quả giá trị ME của acetildenafil là $5,06\% < 10\%$ cho thấy ảnh hưởng nền mẫu không đáng kể. Các kết quả tương tự cũng được xác định với các PDE-5i khác.

Do vậy, phương pháp có thể sử dụng đường chuẩn trên nền dung môi để phân tích mẫu. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này vẫn tiến hành thực hiện xây dựng đường chuẩn trên dịch chiết mẫu trắng để đảm bảo kết quả chính xác nhất.

3.2.3. Thẩm định phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý bằng LC-MS/MS

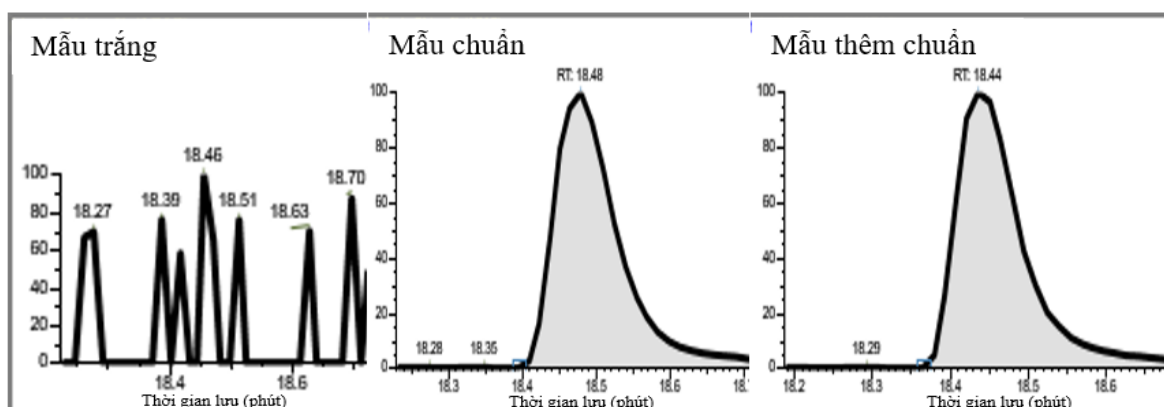
Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng ở trên, tiến hành thẩm định phương pháp với các thông số cơ bản sau:

- Độ đặc hiệu
- Giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện
- Khoảng tuyến tính
- Độ lặp lại
- Độ tái lặp
- Độ thu hồi

3.2.3.1. Độ đặc hiệu

Dựa vào bảng 3.1 cho thấy, các chất nhóm PDE-5i đều có một mảnh mẹ và 2 mảnh con trở lên nên số điểm IP > 5 đạt yêu cầu đối với phân tích trên khối phổ phân giải cao.

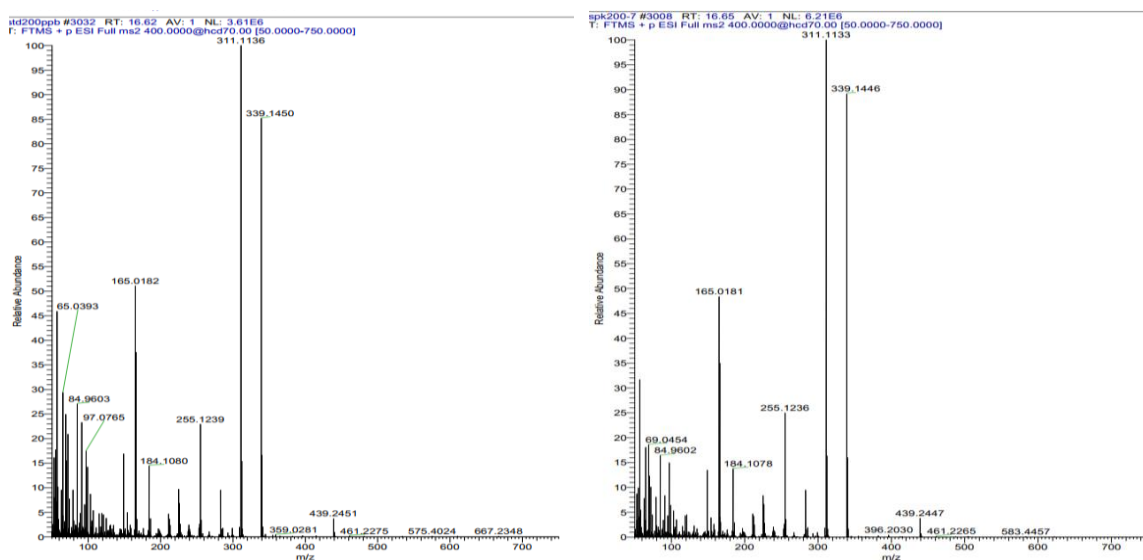
Độ đặc hiệu của phương pháp phân tích còn được xác định khi phân tích dung dịch chuẩn, dung dịch thêm chuẩn trên nền mẫu thử và dung dịch mẫu trắng. Kết quả được trình bày ở hình 3.10.



Hình 3.10. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn của sildenafil tại nồng độ 30 ng/mL

Kết quả phân tích cho thấy, mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn có tín hiệu với cùng thời gian lưu 18,4 phút đối với sildenafil.

Ngoài ra, khi so sánh phổ đồ của mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn cho thấy đều có mảnh mẹ và các mảnh con với tỷ lệ tương đương nhau. Hình 3.11 thể hiện sự so sánh mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 200 ng/mL của N-Desethylvaridenafil.



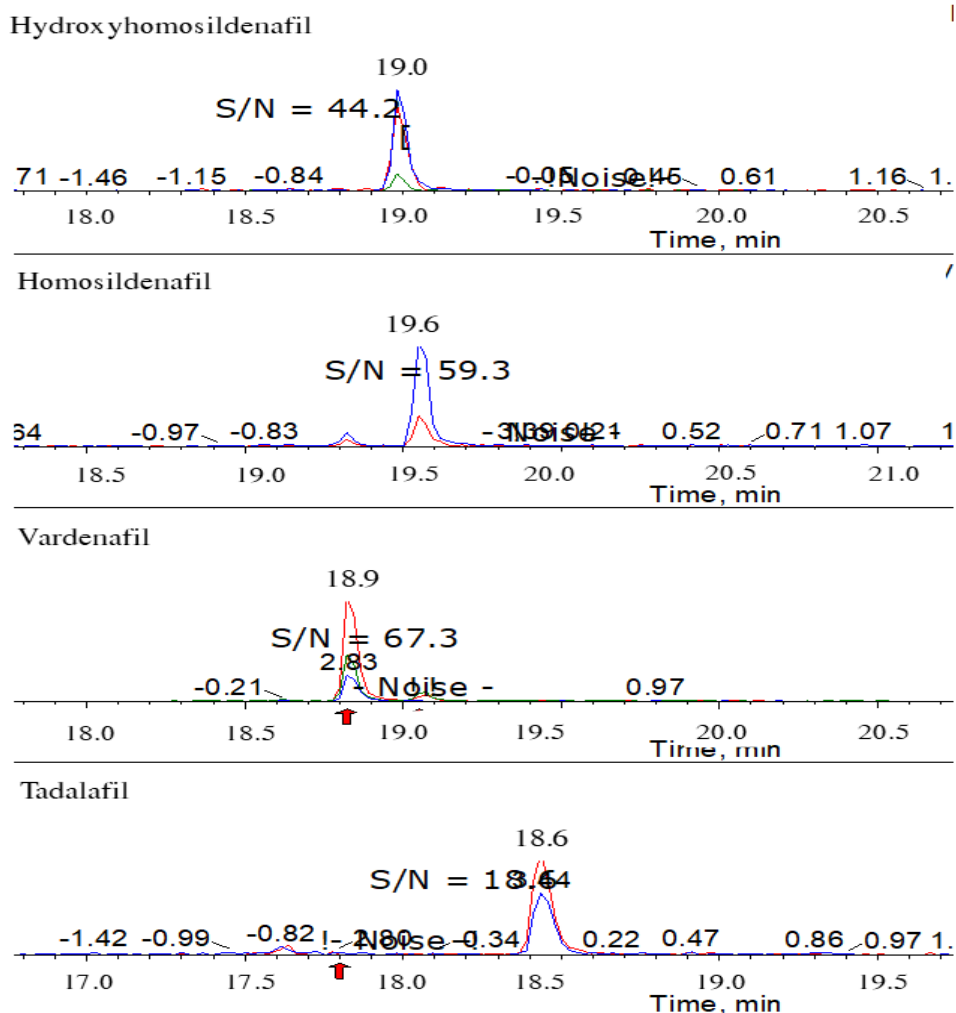
Hình 3.11. Phổ đồ của N-Desethylvaridenafil của mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn tại nồng độ 200 ng/mL

Vì vậy, phương pháp có độ đặc hiệu cao khi phân tích các chất cấm nhóm PDE-5i.

3.2.3.2. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

Thêm chuẩn các chất nhóm PDE-5i trên nền mẫu TPBVSK không chứa chất phân tích, lặp lại 6 lần. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có $S/N = 3$. Giới hạn định lượng là nồng độ cho $S/N \geq 10$. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của Sildenafil, Tadalafil và Vardenafil lần lượt là 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ và 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tương ứng với 0,025 ng/mL và 0,075 ng/mL trên dung dịch. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất còn lại lần lượt là 0,1 mg/kg và 0,3 mg/kg tương ứng với 2,5 ng/mL và 7,5 ng/mL trên dung dịch.

Hình 3.12 là sắc ký đồ của một số chất PDE-5i tại mức MDL 1,0 µg/kg trên nền TPBVSK dạng nang mềm.

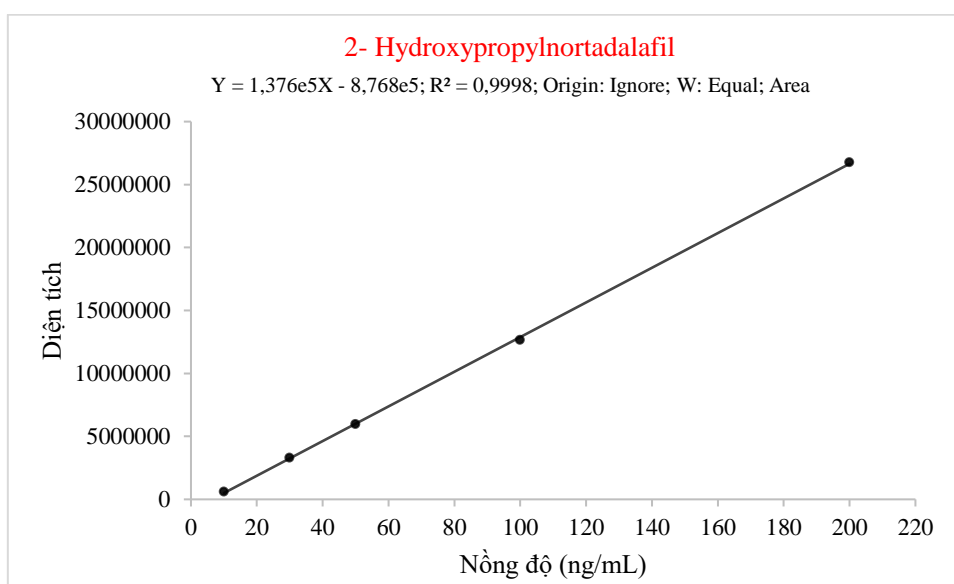


Hình 3.12. Sắc ký đồ của một số chất PDE-5i tại mức MDL 1,0 µg/kg trên nền TPBVSK dạng nang mềm

3.2.3.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Dãy chuẩn làm việc được pha trong dung dịch chiết mẫu TPBVSK trắng. Tiến hành pha dãy chuẩn làm việc nồng độ 10; 30; 50; 100; 200 ng/mL và phân tích trên LC-MS/MS. Xây dựng đường phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng.

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 10 – 200 ng/mL tín hiệu của chất phân tích tỷ lệ tuyến tính với nồng độ với $R^2 > 0,99$ với độ chệch <15% với tất cả các giá trị (Hình 3.13 là ví dụ đường chuẩn của 2-hydroxypropylnortadalafil, các kết quả tương tự của các chất PDE-5i khác được trình bày trong Phụ lục 3).



Hình 3.13. Đường chuẩn chất phân tích 2- Hydroxypropylnortadalafil

3.2.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn trên nền viên nang cứng và viên nang mềm ở 3 mức nồng độ khác nhau 30,0; 100,0 và 200,0 ng/mL trên dịch tương ứng 1,2; 2,0 và 4,0 mg/kg trên mẫu, lặp lại 6 lần cho mỗi nồng độ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.8 đối với vardenafil, bảng 3.9 và Phụ lục 3 đối với các PDE-5i khác.

Bảng 3.8. Độ lặp lại và độ thu hồi của vardenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	Hàm lượng (µg/kg)	Độ thu hồi (%)	RSD _r %	Hàm lượng (µg/kg)	Độ thu hồi (%)	RSD _r %
Spk-30-1	30,0	100	11,5	30,3	101	6,92
Spk-30-2	32,4	108		27,8	92,8	
Spk-30-3	24,0	80,0		26,0	86,7	
Spk-30-4	30,0	99,9		29,8	99,3	
Spk-30-5	27,8	92,5		31,8	106	
Spk-30-6	25,0	83,2		29,4	98,1	
Spk100-1	104	104	9,06	99,1	99,1	5,90
Spk100-2	96,8	96,8		105	105	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	Hàm lượng (µg/kg)	Độ thu hồi (%)	RSD _r %	Hàm lượng (µg/kg)	Độ thu hồi (%)	RSD _r %
Spk100-3	95,5	95,5		87,3	87,3	
Spk100-4	96,6	96,6		96,8	96,8	
Spk100-5	81,7	81,7		97,1	97,1	
Spk100-6	107	107		96,1	96,1	
Spk200-1	212	106	12,3	179	89,7	3,67
Spk200-2	220	110		188	94,2	
Spk200-3	173	86,5		190	95,1	
Spk200-4	199	99,4		176	87,8	
Spk200-5	214	107		174	87,1	
Spk200-6	161	80,4		179	89,5	

Bảng 3.9. Độ lặp lại và độ thu hồi của các chất PDE-5i

TT	Tên chất	RSD%	R%	TT	Tên chất	RSD%	R%
1	2-Hydroxypropyl nortadalafil	7,48-11,8	80-110	28	Isosildenafil	6,01-11,7	81,4-110
2	Acetaminotadalafil	2,81-10,6	81,4-108	29	Lenafil carbonate	2,89-8,78	82,4-108
3	Acetil acid	5,64-10,4	80,2-109	30	Mirodenafil	5,68-10,3	80,7-108
4	Acetildenafil	4,19-11,0	80,6-109	31	Mutaprodenafil	5,33-12,6	80,6-110
5	Acetylvardeafil	3,97-11,0	81,4-109	32	N-Desethylvardeafil	4,67-10,5	80,9-108
6	Aminotadalafil	7,03-10,8	80,1-110	33	N-Desmethylsildenafil	4,67-10,4	80,1-110
7	Avanafil	3,45-11,7	80,4-110	34	N-Octylnortadalafil	5,41-10,3	80,4-109
8	Benzamidenafil	3,86-9,47	80,0-108	35	Nitrodenafil	3,43-9,19	81,1-108
9	Benzylsildenafil	2,92-11,5	80,3-110	36	Noracetildenafil	3,94-10,8	80,8-107
10	Carbodenafil	5,43-10,4	81,1-110	37	Norneosildenafil	5,65-11,9	81,4-110
11	Chlorodenafil	4,40-11,3	80,8-110	38	Norneovardenafil	4,94-10,3	80,5-108
12	Chloropretadalafil	6,79-10,6	81,5-109	39	Nortadalafil	5,20-9,22	80,5-109
13	Cyclopentylafil	5,28-12,4	80,2-110	40	O-desethyl-o-propyl sildenafil	4,59-9,83	80,1-107

TT	Tên chất	RSD%	R%	TT	Tên chất	RSD%	R%
14	Depiperazino-thiosildenafil	5,34-10,5	80,1-110	41	Piperazonifil	4,87-7,94	83,3-110
15	Descarbonsildenafil	5,98-10,9	80,6-109	42	Piperiacetildenafil	4,66-7,58	82,5-110
16	Desmethyl fondenafil	4,89-8,14	80,1-110	43	Propoxyphenyl aildenafil	5,98-10,3	80,9-109
17	Dimethylacetildenafil	7,44-11,3	81,5-109	44	Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil	8,56-10,2	80,4-108
18	Dimethylsildenafil	3,72-6,80	81,6-110	45	Propoxyphenylthio-hydroxyhomosildenafil	5,77-11,6	80,0-109
19	Gendenafil	4,56-10,3	81,1-109	46	Pseudovardenafil	3,47-9,06	82,0-109
20	Homosildenafil	4,68-11,8	80,1-110	47	Sildenafil	5,35-12,4	81,1-110
21	Hydroxyacetildenafil	6,73-10,2	82,2-109	48	Sildenafil N-oxide	6,03-11,1	80,2-110
22	Hydroxychlorodenafil	7,55-9,73	80,1-109	49	Tadalafil	7,32-10,8	80,1-110
23	Hydroxyhomosildenafil	7,83-11,3	81,6-107	50	Thioaildenafil	4,40-10,5	83,5-110
24	Hydroxythio-homosildenafil	4,12-7,32	87,7-109	51	Thiohomosildenafil	7,18-10,5	80,2-110
25	Hydroxythiovardenafil	6,33-10,6	80,3-108	52	Udenafil	5,75-11,6	81,5-108
26	Hydroxyvardenafil	5,81-9,16	85,7-109	53	Vardenafil	5,90-12,3	80,0-110
27	Imidazosagatriazinone	4,75-11,7	81,0-109				

Các kết quả trên cho thấy, giá trị độ thu hồi trung bình của các chất PDE-5i trên các nền mẫu nằm trong khoảng từ 80,0 – 110% với độ lệch chuẩn tương đối từ 2,81 – 12,6%. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng yêu cầu $R\% \leq 80-110\%$ và $RSD\% \leq 15\%$, theo AOAC [29].

3.2.4. Phân tích các chất nhóm hỗ trợ sinh lý trong mẫu TPBVSK

Các mẫu dương tính trong tổng số 92 mẫu TPBVSK hỗ trợ sinh lý được phân tích sàng lọc tại mục 3.1.4 sẽ được phân tích định lượng để xác nhận kết quả. Kết quả phân tích định lượng 20 mẫu TPBVSK dương tính với nhóm PDE-5i được trình bày ở bảng 3.10 và Phụ lục 3.

Bảng 3.10. Kết quả phân tích định lượng các chất PDE-5i trên mẫu TPBVSK dương tính

Mẫu	Chất phát hiện	Hàm lượng (mg/g)
SL.06	Nortadalafil	50,0
	Tadalafil	11,6
	Sildenafil-N-oxide	0,073
SL.07	Nortadalafil	4,41
	Chloropretadalafil	0,006
SL.08	Sildenafil	22,2
	Tadalafil	0,39
	Sildenafil-N-oxide	0,06
SL.10	Propoxyphenylaildenafil	1,02
	Thiohomosildenafil	0,78
	Homosildenafil	0,031
	Methisosildenafil	0,03
SL.13 – SL.17	Hydroxyhomosildenafil	1,05 - 20,1
	Hydroxythiohomosildenafil	0,78 - 22,5
SL.18	Tadalafil	0,08
SL.22	Tadalafil	10,2
	Chloropretadalafil	5,25
SL.24	Nortadalafil	12,2
	Chloropretadalafil	0,25
SL.30	Nortadalafil	10,2
	Chloropretadalafil	5,25
SL.35	Acetil acid	0,13
SL.38	Tadalafil	0,12
SL.42	Sildenafil	5,25
	Tadalafil	4,77
	Aminotadalafil	0,52
	Sildenafil N-oxyde	0,56
SL.50	Nortadalafil	0,52
	Chloropretadalafil	4,77
SL.61	Nortadalafil	12,1

Mẫu	Chất phát hiện	Hàm lượng (mg/g)
SL.65	Nortadalafil	170,0
SL.82	Hydroxythiohomosildenafil	226,8
	Hydroxythiovarildenafil	216,8
	Propoxyphenyl homohydroxysildenafil	0,13
	Hydroxyhomosildenafil	0,048
	Hydroxyvarildenafil	0,047

Các kết quả cho thấy, đa số các mẫu TPBVSK có ít nhất 1 hoặc 2 hợp chất PDE-5i chính có hàm lượng cao (>1 mg/g) và các chất phụ có hàm lượng thấp. Có lẽ đây là các sản phẩm phụ của quá trình sản xuất các thành phần chính. Một số sản phẩm chỉ phát hiện hàm lượng thấp các PDE-5i mà không phát hiện thành phần chính (TPBVSK 14, 15), đây là các sản phẩm cần được tiếp tục nghiên cứu để tìm hiểu nguồn gốc của các thành phần PDE-5i này. Phần lớn các mẫu có hàm lượng thấp hơn so với liều được sử dụng làm thuốc. Phương pháp sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao rất có ý nghĩa trong việc xác định các hợp chất PDE-5i, đây là biện pháp hiệu quả để giải quyết vấn đề ngày càng có nhiều chế phẩm PDE-5i mới được sản xuất và trộn trái phép trong sản phẩm TPBVSK.

3.3. Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân

3.3.1. Khảo sát điều kiện LC-MS/MS

3.3.1.1. Khảo sát điều kiện MS/MS

Nghiên cứu tiến hành bơm chất chuẩn sibutramin, desmethyl sibutramin, didesmethyl sibutramin, fenfluramin, loperamid và phenylpropanolamin với nồng độ 1 µg/mL vào hệ thống khối phổ hai lần cùng với dòng pha động mà không qua cột sắc ký với điều kiện như sau:

- + Kênh A: Amoni format 2mM + axit formic 0,1%/ nước
- + Kênh B: Amoni format 2mM + axit formic 0,1%/ MeOH

Sau khi chọn chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử mẹ thành các ion con, lựa chọn ion con có cường độ cao nhất để định lượng và ion có cường độ thấp hơn để xác nhận, các kết quả được trình bày như trong bảng 3.11.

Bảng 3.11. Các điều kiện khối phổ phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân

STT	Chất phân tích	Khối lượng phân tử	Thời gian lưu (phút)	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	Thế ion hóa (V)	Năng lượng bắn phá (E)
1	Sibutramin	278,9	6,37	279,9	124,8	22	26
			6,38		138,4	16	26
2	Desmethyl sibutramin	265,0	6,33	266,0	124,8	24	28
			6,34		138,8	12	28
3	Didesmethyl sibutramin	251,1	6,27	252,1	208,1	47	11
			6,28		138,2	47	11
4	Fenfluramin	231,2	6,30	232,2	159,1	33	12
			6,31		187,0	20	12
5	Loperamid	477,0	7,12	477,1	266	30	15
			7,13		210	35	15
6	Phenylpropanolamin	151	4,35	151,5	134	15	19
			4,36		115	20	19

Nhận xét: Qua bảng 3.11 cho thấy, điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân, số khối của các ion mẹ tương ứng với từng chất phân tích, chúng đều có dạng là $[M+H]^+$, mỗi chất thu được 2 ion con, phù hợp với quy định của châu Âu về số điểm IP.

Chọn chế độ khảo sát tự động đối với từng ion con định lượng và định tính của từng chất. Khảo sát các thông số cho bộ phận tạo nguồn ion, thu được giá trị thông số tối ưu liệt kê trong bảng 3.12.

Bảng 3.12. Các thông số tối ưu của khối phổ để phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân

Thông số	Giá trị tối ưu
Thế ion hóa (IS) (V)	5500
Nhiệt độ ion hóa (TEM) (°C)	400
Áp suất khí nguồn ion 1 (GS1) (psi)	20
Áp suất khí nguồn ion 2 (GS2) (psi)	20
Thế đầu vào (EP) (V)	10
Áp suất khí (CUR) (psi)	25
Áp suất khí va chạm (CAD) (psi)	9

3.3.1.2. Khảo sát điều kiện LC

3.3.1.2.1. Lựa chọn cột tách

Cột tách là bộ phận quan trọng của hệ thống sắc ký. Qua tham khảo các tài liệu và điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm, nghiên cứu đã lựa chọn cột tách là cột pha đảo C₁₈. Trong nghiên cứu này, cột C₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 3,5µm) và tiền cột tương ứng được sử dụng để tách các chất nhóm hỗ trợ giảm cân.

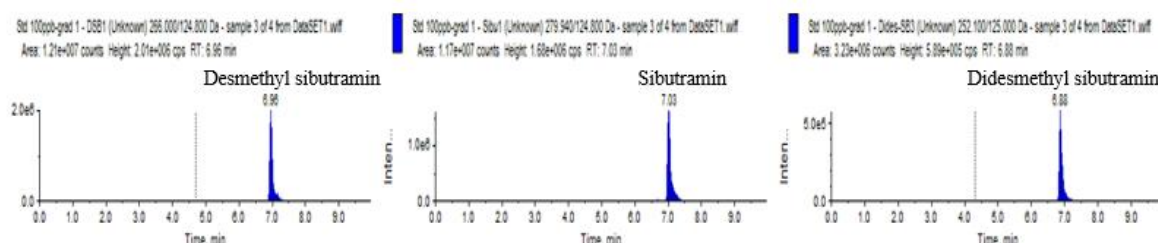
3.3.1.2.2. Lựa chọn điều kiện pha động

Quá trình ion hóa trong phân tích khối phổ là điều kiện quan trọng quyết định độ nhạy của phương pháp. Dung môi pha động không chỉ ảnh hưởng đến việc rửa giải các chất mà còn góp phần giúp quá trình ion hóa tốt hơn. Tỷ lệ thành phần các dung môi trong pha động sẽ tác động đến khả năng lưu giữ chất phân tích trên cột khác nhau, tốc độ dòng pha động cũng ảnh hưởng tới độ phân giải của hỗn hợp chất phân tích. Hai hệ dung môi tiến hành khảo sát được trình bày trong phần 2.2.3. Chương trình gradient dung môi được trình bày ở bảng 3.13, tốc độ dòng pha động là 0,35 mL/phút.

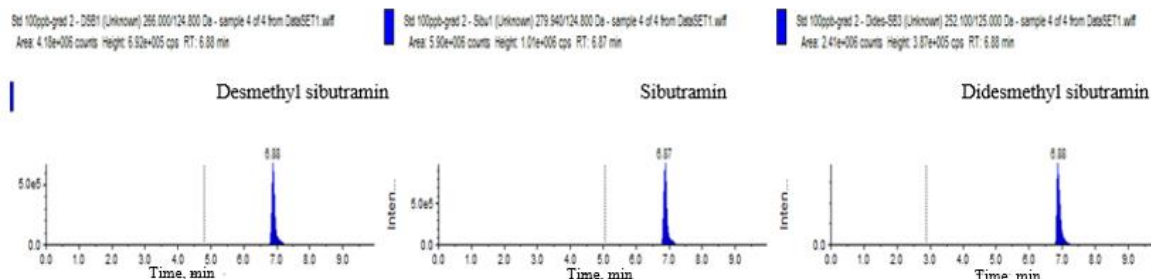
Bảng 3.13. Chương trình gradient phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân

Gradient	Thời gian (phút)	Thành phần pha động		
		Tỉ lệ% ACN	Amoni format 2mM + acid formic 0,1%/ MeOH (%)	Amoni format 2mM + acid formic 0,1%/ H ₂ O (%)
Gradient 1	0,00		10	90
	2,00		10	90
	5,00		90	10
	8,00		10	90
Gradient 2	0,00	10		90
	2,00	10		90
	5,00	90		10
	8,00	10		90

Sau khi thực hiện 2 chương trình gradient, tín hiệu pic thu nhận được của chất phân tích được thể hiện ở hình 3.14 - 3.15.



Hình 3.14. Tín hiệu pic của một số chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại chương trình gradient 1



Hình 3.15. Tín hiệu pic của một số chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại chương trình gradient 2

Qua sắc đồ, tín hiệu pic thu nhận được khi thực hiện bởi hệ pha động 2 (mục 2.2.2) với chương trình gradient 1 cao hơn khi tiến hành phân tích bởi hệ pha động 1 với chương trình gradient 2. Vì vậy, thành phần pha động tối ưu là hệ pha động 2:

+ Kênh A: Amoni format 2mM + axit formic 0,1%/ H₂O

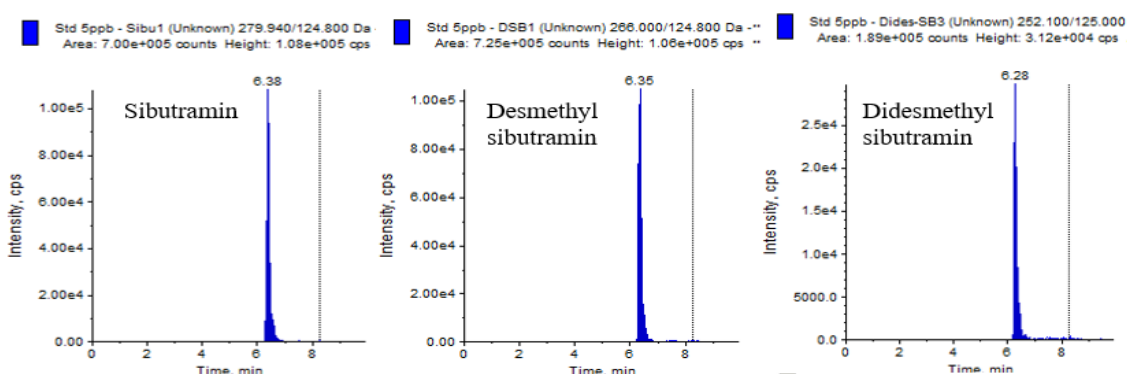
+ Kênh B: Amoni format 2mM + axit formic 0,1%/MeOH

Do tốc độ dòng ảnh hưởng đến thời gian lưu giữ chất phân tích trên cột. Tốc độ dòng nhỏ tạo độ phân giải tốt nhưng thời gian phân tích dài. Sau khi đã lựa chọn được hệ pha động thích hợp, nghiên cứu cũng thay đổi tốc độ dòng pha động là 0,4 mL/phút và chế độ gradient 3 như bảng 3.14.

Bảng 3.14. Chương trình gradient 3 phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân

Thời gian (phút)	Amoni format 2mM + acid formic 0,1%/MeOH	Amoni format 2mM + acid formic 0,1%/ H ₂ O (%)
0,00	10	90
3,00	10	90
5,00	95	5
7,00	95	5
8,00	10	90

Theo sắc đồ tín hiệu các pic các chất nhóm hỗ trợ giảm cân (Hình 3.16), không có sự thay đổi lớn về tín hiệu pic, tuy nhiên thời gian lưu của chất phân tích đã ngắn hơn từ 7 phút xuống 6 phút 38.



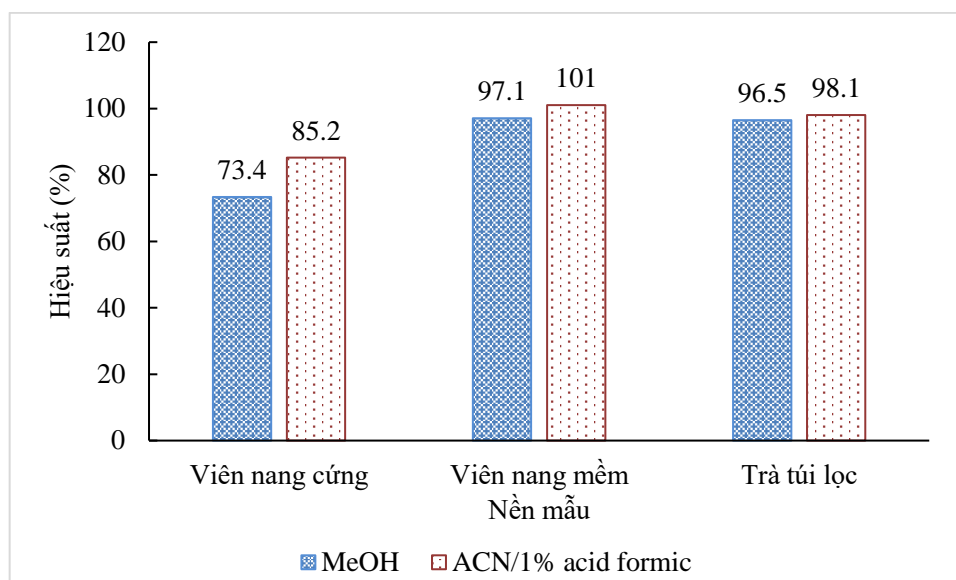
Hình 3.16. Tín hiệu pic của một số chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại chương trình gradient 3

Từ các kết quả thu được, điều kiện tối ưu cho hệ pha động được lựa chọn là hệ pha động 2, chương trình rửa giải theo gradient 3 (Bảng 3.14) và tốc độ dòng là 0,4 mL/phút.

3.3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu phân tích các chất cảm nhóm hỗ trợ giảm cân

3.3.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Dung môi chiết mẫu được thực hiện với mục đích tìm được dung môi hòa tan được nhiều nhất chất phân tích nhưng chọn lọc với chất phân tích. Hai loại dung môi được khảo sát là MeOH và hỗn hợp dung môi ACN/ acid formic 1%. Kết quả độ thu hồi sibutramin trên 3 nền mẫu: viên nang cứng, viên nang mềm và mẫu trà túi lọc được thể hiện trên hình 3.17 và Phụ lục 4.



Hình 3.17. Độ thu hồi sibutramin tại dung môi chiết khác nhau

Từ biểu đồ cho thấy, nền mẫu có ảnh hưởng đến độ thu hồi. Độ thu hồi của sibutramin trên nền mẫu viên nang cứng là thấp nhất và độ thu hồi của hai dẫn xuất khi sử dụng 2 loại dung môi chiết cho thấy không có sự khác biệt lớn. Vì dung môi MeOH có khả năng hòa tan chọn lọc chất phân tích không tốt bằng ACN/ axit formic 1% nên độ thu hồi của chất phân tích trên các nền mẫu khi sử dụng dung môi chiết MeOH có xu hướng sai số dương. Do vậy, nghiên cứu lựa chọn hỗn hợp dung môi ACN/ axit formic 1% làm dung môi chiết tối ưu.

3.3.2.2. Khảo sát quy trình làm sạch mẫu

Trước khi tiến hành xác định hàm lượng các chất trên thiết bị LC-MS/MS, 4 quy trình làm sạch mẫu được khảo sát để làm sạch dung dịch sau chiết.

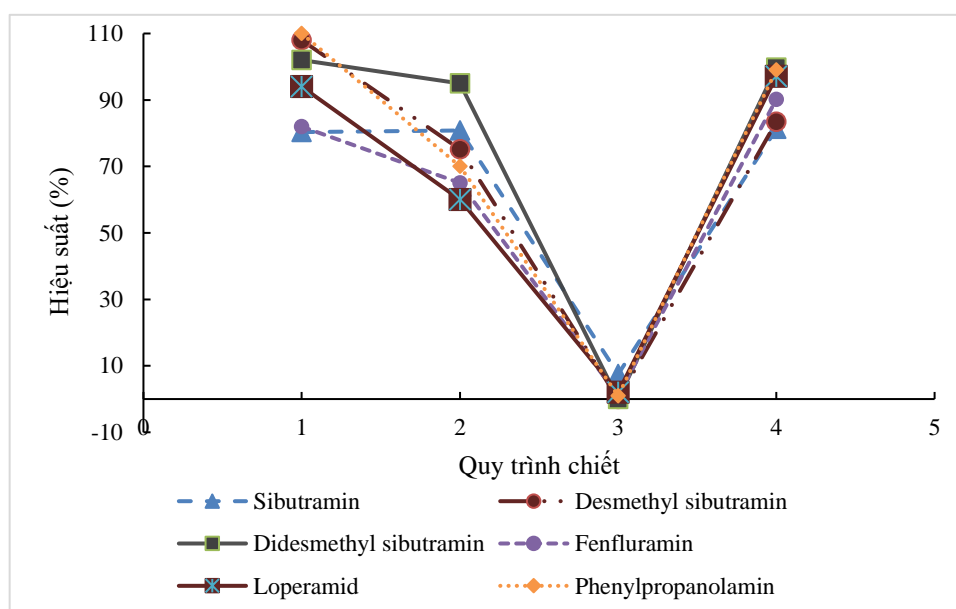
Quy trình 1: Chiết mẫu, lọc mẫu, và tiến hành xác định ngay bằng thiết bị LC-MS/MS

Quy trình 2: Loại tạp bằng cách cho mẫu chiết qua cột SPE-SCX

Quy trình 3: Loại tạp bằng cách cho mẫu chiết qua cột SPE-HLB

Quy trình 4: Sử dụng than hoạt tính

Kết quả độ thu hồi tương ứng với từng quy trình làm sạch mẫu được trình bày ở hình 3.18.



Hình 3.18. Độ thu hồi của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại quy trình làm sạch khác nhau

Độ thu hồi của chất phân tích khi sử dụng quy trình 1 có xuất hiện sai số dương chứng tỏ quy trình 1 xảy ra sự hòa tan chưa chọn lọc chất phân tích. Quy trình 3 sử dụng cột HLB có độ thu hồi thấp do chất phân tích bị mất hoàn toàn khi đi qua cột, không được lưu lại trên cột. Quy trình 2 và 4 có độ thu hồi tương đương, tuy nhiên khi hàm lượng chất phân tích thấp và các bước nạp mẫu, rửa tạp, rửa giải của quy trình 2 có thể đã ảnh hưởng tới độ thu hồi trên nền mẫu. Nghiên cứu cũng đã tiến hành so sánh sự khác nhau về giá trị trung bình của 2 phương pháp bằng xử lý thống

kê, kết quả cho thấy 2 giá trị trung bình khác nhau có ý nghĩa. Vì vậy, quy trình 4 được chọn làm điều kiện tối ưu để làm sạch mẫu.

Bên cạnh đó, nghiên cứu tiến hành khảo sát khối lượng than hoạt tương ứng với lượng mẫu cần làm sạch do hàm lượng than hoạt tính ảnh hưởng tới khả năng hấp phụ các chất phân tích.

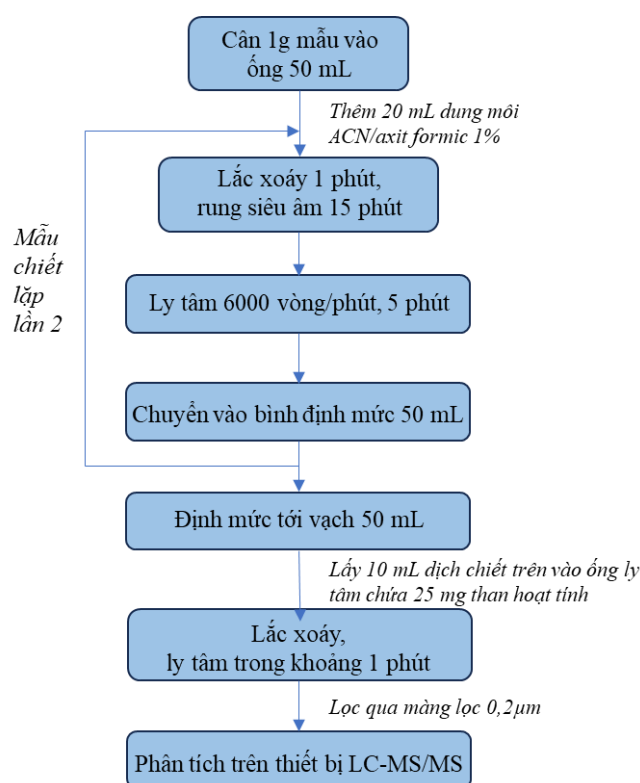
Khối lượng than hoạt tính được khảo sát tại 25 mg, 50 mg, 75 mg và 100 mg tương ứng với 10 mL dịch chiết mẫu, mỗi mẫu được tiến hành làm lặp 6 lần. Kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.15.

Bảng 3.15. Độ thu hồi của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân tại khối lượng than hoạt tính khác nhau

Than hoạt tính Chất phân tích	Độ thu hồi (%)			
	25 mg	50 mg	75 mg	100 mg
Sibutramin	84,8	75,5	74,2	80,7
Desmethyl sibutramin	107	83,1	68,6	30,7
Didesmethyl sibutramin	100	61,7	68,0	21,4
Fenfluramin	95,5	79,6	73,4	36,4
Loperamid	89,4	67,5	57,5	30,8
Phenylpropanolamin	86,0	71,5	68,5	20,5

Từ kết quả trong bảng 3.15 cho thấy, độ thu hồi của chất phân tích phụ thuộc vào hàm lượng than hoạt tính, khi lượng than hoạt tính lớn dần thì độ thu hồi bị giảm, nguyên nhân do than hoạt tính đã hấp phụ chất phân tích. Do vậy, lượng than hoạt tính 25 mg tương ứng lượng mẫu 10 mL được lựa chọn làm điều kiện tối ưu.

Sau khi khảo sát và lựa chọn được các điều kiện chiết và làm sạch mẫu phù hợp, quy trình tối ưu phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK được trình bày ở hình 3.19.



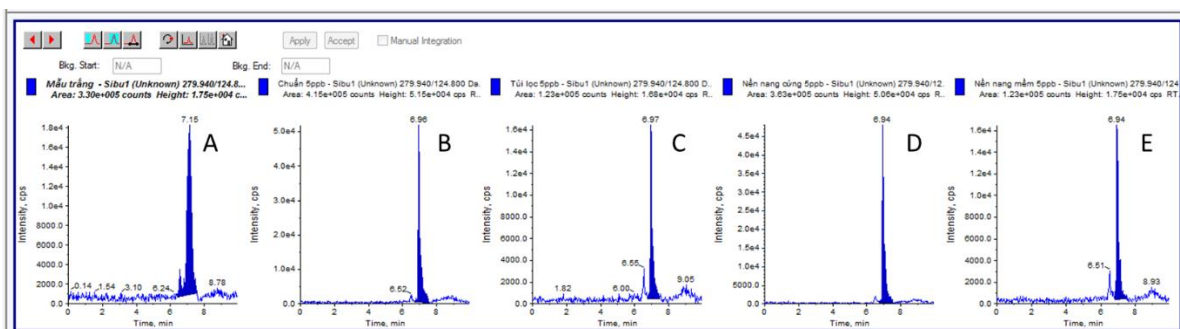
Hình 3.19. Quy trình tối ưu xác định các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK

3.3.3. Thẩm định phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ giảm cân bằng LC-MS/MS

3.3.3.1. Độ đặc hiệu

Đối với kỹ thuật MS cần đáp ứng được yêu cầu về điểm IP (Identification Point). Số điểm IP của các chất cấm được tính mỗi ion mẹ được tính 2 điểm IP, mỗi ion con được tính 2,5 điểm IP. Dựa vào bảng 3.11 cho thấy, các chất nhóm hỗ trợ giảm cân đều có một mảnh mẹ và 2 mảnh con trở lên nên số điểm IP = 5 đạt yêu cầu đối với phân tích trên khối phổ.

Độ đặc hiệu của phương pháp phân tích còn được xác định khi phân tích dung dịch chuẩn, dung dịch thêm chuẩn trên nền mẫu thử và dung dịch mẫu trắng. Kết quả được thể hiện trong hình 3.20 và Phụ lục 4.

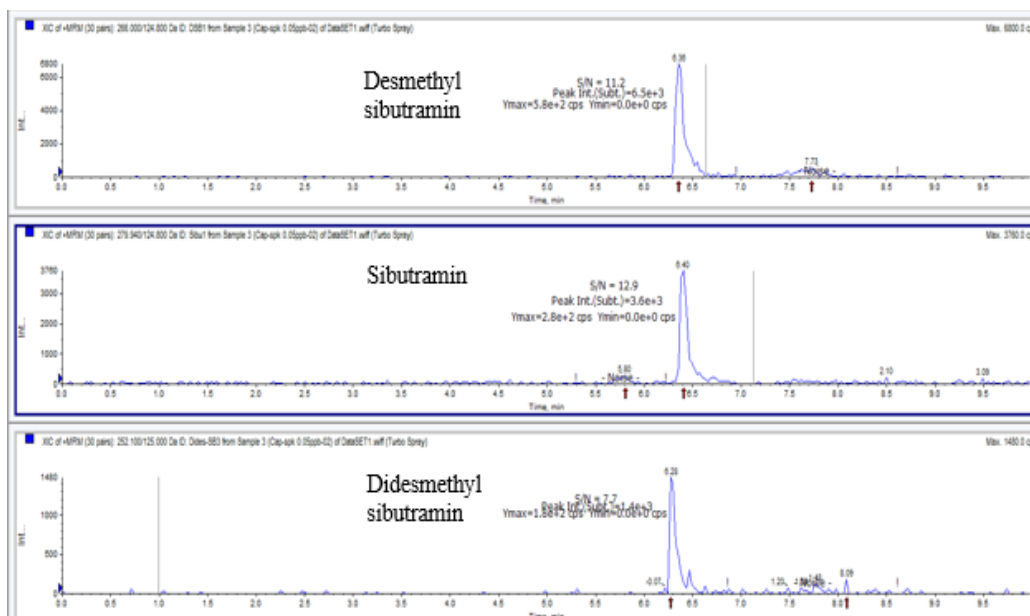


Hình 3.20. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn sibutramin trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và viên nang mềm (E)

Kết quả phân tích cho thấy, mẫu trắng không xuất hiện tín hiệu chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn có tín hiệu với cùng thời gian lưu không quá 2%. Như vậy, phương pháp đảm bảo độ đặc hiệu để phân tích các chất cảm nhóm hỗ trợ giảm cân.

3.3.3.2. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL)

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn với nồng độ thấp còn có thể xuất hiện tín hiệu chất phân tích. Phân tích lặp lại 6 lần. Tiến hành xác định tỷ lệ S/N. Giới hạn phát hiện là nồng độ mà tại đó có $S/N = 3$. Giới hạn định lượng là giới hạn mà tại đó $S/N = 10$ hay $MQL = 3,3 MDL$. Hình 3.21 là sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn tại mức nồng độ $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$.

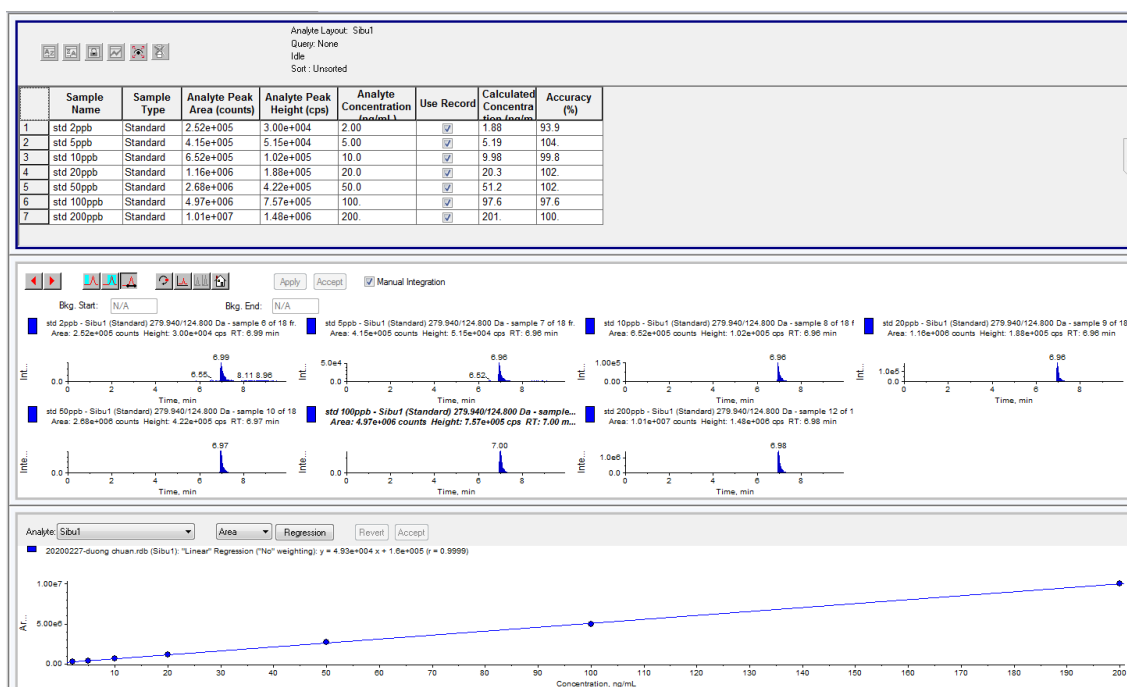


Hình 3.21. Sắc đồ mẫu trắng thêm chuẩn tại mức nồng độ $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ đối với nền mẫu viên nang cứng

Từ kết quả cho thấy, tại mức nồng độ 0,3 µg/kg, tỷ lệ S/N ≥ 10. Do đó, giới hạn định lượng của phương pháp là 0,3 µg/kg đối với cả 3 nền mẫu viên nang cứng, viên nang mềm và mẫu dạng lỏng tương ứng với 6 ng/L trên dung dịch và giới hạn phát hiện là 0,1 µg/kg tương ứng với 2 ng/L trên dung dịch. Với giới hạn định lượng là 0,3 µg/kg, phương pháp có đủ hiệu năng để có thể phân tích các mẫu TPBVSK trên thị trường, đáp ứng được yêu cầu theo quy định tại một số nước EU, Nhật Bản, Hoa Kỳ.

3.3.3.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Dãy chuẩn làm việc được pha trong dung dịch chiết mẫu trắng. Pha dãy chuẩn làm việc nồng độ 2; 5; 10; 20; 50; 100 và 200 ng/mL và phân tích trên LC-MS/MS. Xây dựng đường chuẩn phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng. Đường chuẩn được lập trên phần mềm của thiết bị thể hiện trong hình 3.22 và Phụ lục 4.



Hình 3.22. Đường chuẩn phân tích sibutramin

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ phân tích, tín hiệu của chất phân tích tỷ lệ tuyến tính với nồng độ với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$ với độ chệch <15% với tất cả các giá trị. Vì vậy, khoảng nồng độ từ 2 ng/mL đến 200 ng/mL được nghiên cứu chọn làm khoảng định lượng.

3.3.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Dựa trên hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ giảm cân thường trộn trái phép vào TPBVSK trong mẫu thực tế, nghiên cứu tiến hành khảo sát độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp bằng cách phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở 2 mức nồng độ khác nhau, hàm lượng là 2,0 và 5,0 mg/g đối với sibutramin, desmethylsibutramin, didesmethylsibutramin và 5,0 và 10 mg/g đối với fenfluramin, loperamid và phenylpropanolamin lặp lại 6 lần cho mỗi nồng độ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.16 và Phụ lục 4.

Bảng 3.16. Độ lặp lại và độ thu hồi của sibutramin

Mức Mẫu	2 mg/g		5 mg/g	
	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%
1	2,04	102	4,75	95,0
2	1,92	96,0	4,52	90,3
3	1,78	88,9	4,14	82,7
4	1,75	87,3	4,62	92,4
5	1,76	91,8	4,76	95,3
6	1,65	93,4	4,63	92,7
Độ thu hồi trung bình (%)	90,7		91,4	
SD (%)	0,14		0,23	
RSD (%)	9,80		5,08	

Từ các kết quả thu được, độ thu hồi trung bình của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân lần lượt nằm trong khoảng 82,7 – 102% và độ lệch chuẩn tương đối từ 2,73 – 9,80%. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng yêu cầu của AOAC (độ thu hồi 60-115% và độ lệch chuẩn tương đối $\leq 21\%$ tại nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [29].

3.3.4. Phân tích các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong mẫu TPBVSK

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, nghiên cứu tiến hành xác định hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong 30 mẫu TPBVSK có tác dụng hỗ trợ giảm cân trên thị trường. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.17 và Phụ lục 4.

Bảng 3.17. Kết quả phân tích hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ giảm cân trong một số mẫu TPBVSK

Mẫu	Hàm lượng (mg/g)		
	Sibutramin	Desmethylsibutramin	Didesmethylsibutramin, fenfluramin, loperamid, phenylpropanolamin
GC.01 - GC.04	-	-	-
GC.05	2,20	-	-
GC.06	4,65	-	-
GC.07	11,6	-	-
GC.08	5,63	-	-
GC.09	10,0	-	-
GC.10	11,9	2,05	-
GC.11 - GC.20	-	-	-
GC.21 - GC.30	-	-	-

“-”: không phát hiện hoặc nhỏ hơn MDL

Qua bảng kết quả phân tích, nghiên cứu đã phát hiện có 06 mẫu viên nang cứng dương tính với sibutramin, 01 mẫu viên nang cứng dương tính với desmethylsibutramin, không phát hiện mẫu nào dương tính với didesmethylsibutramin, fenfluramin, loperamide và phenylpropanolamin.

So sánh với nghiên cứu của Jeongeun và các cộng sự tại Hàn Quốc [52] sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS phát hiện 09/25 mẫu có Sibutramin với hàm lượng từ 0,72 đến 48,6 mg/g. Kết quả phân tích các mẫu thực tại Việt Nam cho thấy tỉ lệ mẫu phát hiện sibutramin thấp hơn và hàm lượng trong các mẫu có xu hướng chụm hơn. Ngoài ra, tỉ lệ số mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe phát hiện sibutramin và mẫu có dẫn xuất của sibutramin là 269/20 mẫu theo báo cáo của FDA [110]. Điều này cho thấy sự

tương đồng về kết quả phân tích mẫu thực của nghiên cứu này với báo cáo của FDA về tỉ lệ mẫu phát hiện sibutramin và dẫn xuất của sibutramin.

3.4. Xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiêu đường

3.4.1. Khảo sát các điều kiện LC-MS/MS

3.4.1.1. Khảo sát điều kiện MS/MS

Nghiên cứu khảo sát điều kiện khối phổ bằng cách bơm các dung dịch chuẩn có nồng độ 1 µg/mL. Lựa chọn ion con có cường độ cao nhất để định lượng và ion có cường độ thấp hơn để xác nhận. Các thông số khối phổ được trình bày trong bảng 3.18.

Bảng 3.18. Các điều kiện khối phổ phân tích các chất hỗ trợ tiêu đường

STT	Chất phân tích	Mảnh mẹ	Mảnh con	Thế va chạm (CE)
1.	Metformin	130,1	60,2	52
			71,2	76
2.	Phenformin	206,1	60,2	32
			105,1	16
3.	Buformin	158,1	60,2	12
			42,8	32
4.	Glibenclamid	494,2	369,0	48
			169,0	12
5.	Gliclazid	324,1	91,1	20
			65,2	20

Qua bảng 3.18 cho thấy, điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với quy định của châu Âu về số điểm IP.

Chọn chế độ khảo sát tự động đối với từng ion con định lượng và định tính của từng chất. Khảo sát các thông số cho bộ phận tạo nguồn ion, thu được giá trị thông số tối ưu liệt kê trong bảng 3.19.

Bảng 3.19. Các thông số tối ưu của khối phổ để phân tích các chất nhóm tiểu đường

Thông số	Giá trị tối ưu
Thế ion hóa (IS) (V)	4000
Nhiệt độ ion hóa (°C)	300
Tốc độ dòng khí (L/min)	11
Áp suất buồng ion hóa (psi)	15

3.4.1.2. Khảo sát điều kiện LC

3.4.1.2.1. Lựa chọn cột tách

Cột tách là bộ phận quan trọng của hệ thống sắc ký. Qua tham khảo các tài liệu và điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm, nghiên cứu đã lựa chọn cột tách là cột pha đảo C18. Trong nghiên cứu này, cột Eclipse Plus C18 (150 mm x 3,0 mm; 3,5 µm) và tiền cột tương ứng được sử dụng để tách các chất nhóm tiểu đường.

3.4.1.2.2. Lựa chọn điều kiện pha động

Nghiên cứu tiến hành phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 100 ng/mL với hai hệ dung môi tiến hành khảo sát được trình bày trong phần 2.2.3. Diện tích pic của các chất phân tích được trình bày trong bảng 3.20.

Bảng 3.20. Kết quả khảo sát ảnh hưởng pha động đối với các chất nhóm tiểu đường

Chất phân tích	Diện tích pic	
	Pha động 1 (Acid formic 0,1%)	Pha động 2 (Dung dịch đệm ammonium format 10mM, acid formic 0,1%)
Metformin	222022	195629
Phenformin	145319	129168
Buformin	159970	47009
Glibenclamid	70705	33950
Gliclazid	24303	14902

Kết quả so sánh diện tích pic của các chất phân tích khi phân tích bằng pha động chứa acid formic 0,1% cho tín hiệu cao hơn với tất cả các chất phân tích so với dung dịch đệm chứa acid formic 0,1% và amoni format 10 mM. Do đó, nghiên cứu

lựa chọn pha động phân tích chứa acid formic 0,1% và ACN với chương trình gradient như bảng 3.21. Hệ sắc ký lỏng được vận hành theo các điều kiện sau:

- Cột sắc ký: Agilent Eclipse Plus C18 (150 mm x 3,0 mm, 3,5 μ m) và tiền cột tương ứng

- Thể tích bơm mẫu: 5 μ L

- Pha động: acid formic 0,1% (kênh A) và acetonitril (kênh B)

- Tốc độ dòng: 0,4 mL/phút

- Chương trình gradient: Bảng 3.21

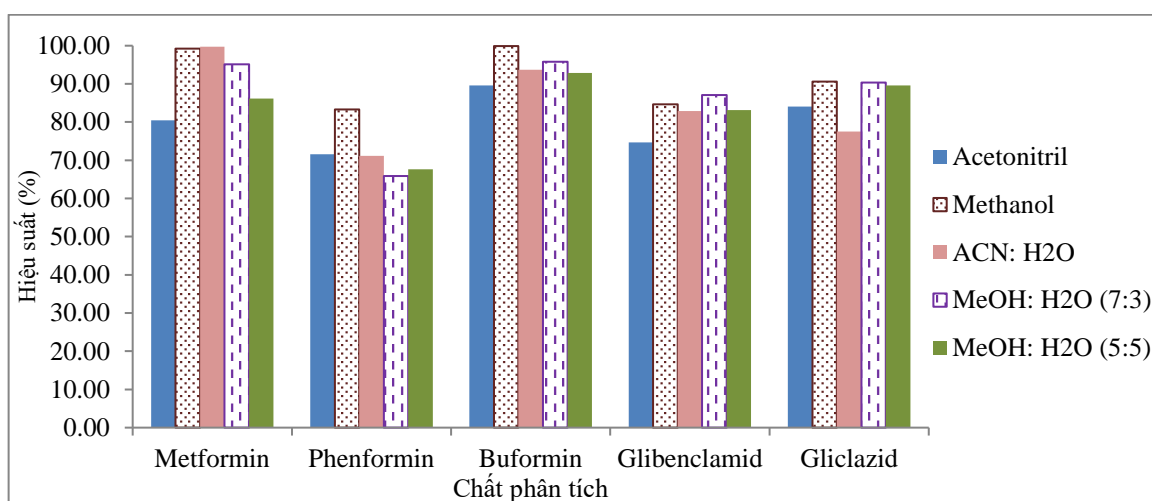
Bảng 3.21. Chương trình gradient phân tích các chất nhóm tiểu đường

Thời gian (phút)	Acid formic 0,1% trong nước (%)	ACN (%)
0,0	90	10
2,0	90	10
3,0	10	90
7,0	10	90
8,0	90	10
10	90	10

3.4.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường

3.4.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Tiến hành thêm chuẩn ở mức nồng độ 100 ng/mL và 5 loại dung môi được khảo sát là MeOH, ACN, ACN: H₂O (1:1), MeOH: H₂O (7:3) và MeOH: H₂O (5:5). Kết quả độ thu hồi trên dung môi chiết trên nền mẫu thực phẩm bảo vệ sức khoẻ dạng viên nang cứng được trình bày trong hình 3.23.



Hình 3.23. Độ thu hồi các chất nhóm tiểu đường tại dung môi chiết khác nhau

Từ biểu đồ và kết quả cho thấy, trong 5 loại dung môi sử dụng, methanol cho hiệu quả chiết tốt với các chất phân tích (với độ thu hồi $\geq 80\%$). Vì vậy, nghiên cứu chọn methanol làm dung môi chiết tối ưu.

3.4.2.2. Khảo sát số lần chiết mẫu

Tiến hành chiết lại lần ba với 10 mL methanol phần cặn ở trên để đánh giá hiệu quả của số lần chiết. Kết quả cho thấy khi chiết lần ba lượng chất phân tích còn lại không đáng kể. Như vậy, quy trình phân tích với hai lần chiết lặp đã đảm bảo chiết kiệt chất phân tích ra khỏi nền mẫu.

Do nền mẫu TPBVSK thường chứa hỗn hợp các loại dược liệu chứa nhiều flavonoid, acid phenolic cũng như các chất màu chlorophyll, ... Các chất này hầu hết đều là các chất phân cực, dễ hòa tan trong dung môi chiết là methanol, có thể ảnh hưởng đến tín hiệu của chất phân tích cũng như gây bẩn và giảm tuổi thọ của cột sắc ký và thiết bị. Do đó, nghiên cứu tiến hành khảo sát điều kiện làm sạch mẫu.

3.4.2.3. Khảo sát quy trình làm sạch mẫu

Khi so sánh một số kỹ thuật làm sạch như chiết pha rắn (SPE) và chiết phân tán pha rắn (d-SPE), thấy rằng kỹ thuật d-SPE là kỹ thuật đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả để loại trừ các chất mang màu và các thành phần có nguồn gốc từ thực vật, giá thành rẻ, tiết kiệm thời gian phân tích. Do đó, nghiên cứu tiến hành khảo sát điều kiện chiết phân tán pha rắn sử dụng bột than hoạt tính (GCB).

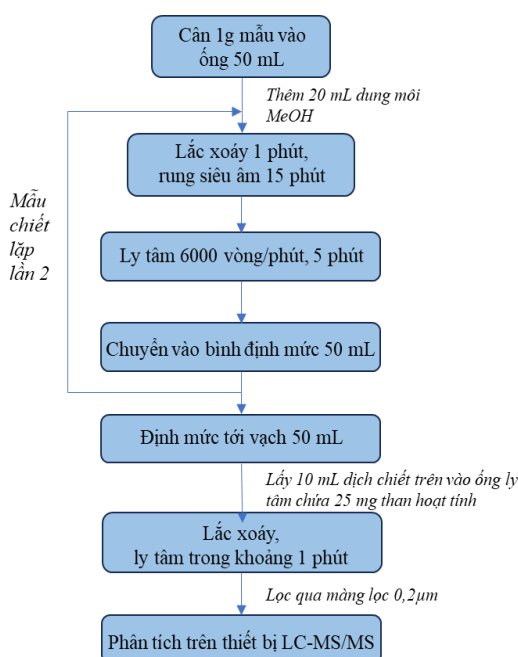
Tiến hành khảo sát lượng than hoạt tính được khảo sát tại 25 mg, 50 mg và 100 mg tương ứng với 10 mL dịch chiết mẫu. Mỗi mẫu được tiến hành làm lặp 3 lần. Kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Độ thu hồi của các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường tại khối lượng than hoạt tính khác nhau

Chất phân tích	Độ thu hồi (%)		
	25 mg	50 mg	100 mg
Metformin	91,4	93,7	80,6
Phenformin	99,2	98,7	87,4
Buformin	93,4	92,5	85,9
Glibenclamid	98,2	92,7	83,8
Gliclazid	91,6	91,6	87,6

Từ kết quả cho thấy, độ thu hồi của chất phân tích phụ thuộc vào hàm lượng than hoạt tính, khi lượng than hoạt tính lớn dần thì độ thu hồi bị giảm, nguyên nhân do than hoạt tính đã hấp phụ chất phân tích. Do vậy, lượng than hoạt tính 25 mg tương ứng lượng mẫu 10 mL được lựa chọn làm điều kiện tối ưu.

Quy trình tối ưu phân tích một số chất nhóm hỗ trợ tiểu đường được trình bày ở hình 3.24.



Hình 3.24. Quy trình tối ưu xác định các chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trong mẫu TPBVSK

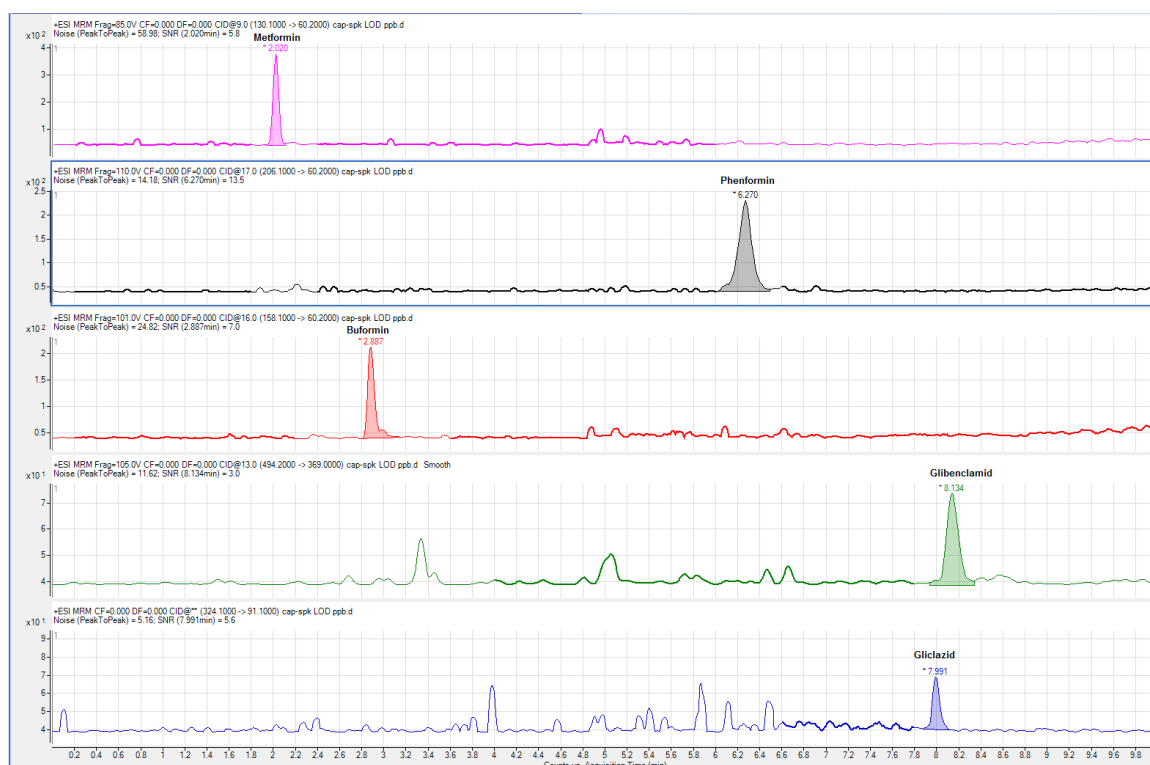
3.4.3. Thẩm định phương pháp phân tích các chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường bằng LC-MS/MS

3.4.3.1. Độ đặc hiệu

Dựa vào bảng 3.18 cho thấy, các chất cấm nhóm hỗ trợ tiểu đường đều có một mảnh mẹ và 2 mảnh con trở lên nên số điểm IP = 5 đạt yêu cầu đối với phân tích trên khối phổ.

3.4.3.2. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL)

Tiền hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn với nồng độ 0,1 mg/kg trên các nền mẫu trắng viên nang cứng, viên nang mềm và dạng lỏng. Kết quả cho thấy các giá trị S/N đều lớn hơn 3 cho thấy phương pháp đạt MDL ở mức 0,1 mg/kg theo quy định. Hình 3.25 là sắc ký đồ của một số chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trên các nền TPBVSK ở mức thêm chuẩn 0,1 mg/kg.



Hình 3.25. Sắc ký đồ của một số chất nhóm hỗ trợ tiểu đường trên các nền TPBVSK ở mức thêm chuẩn 0,1 mg/kg

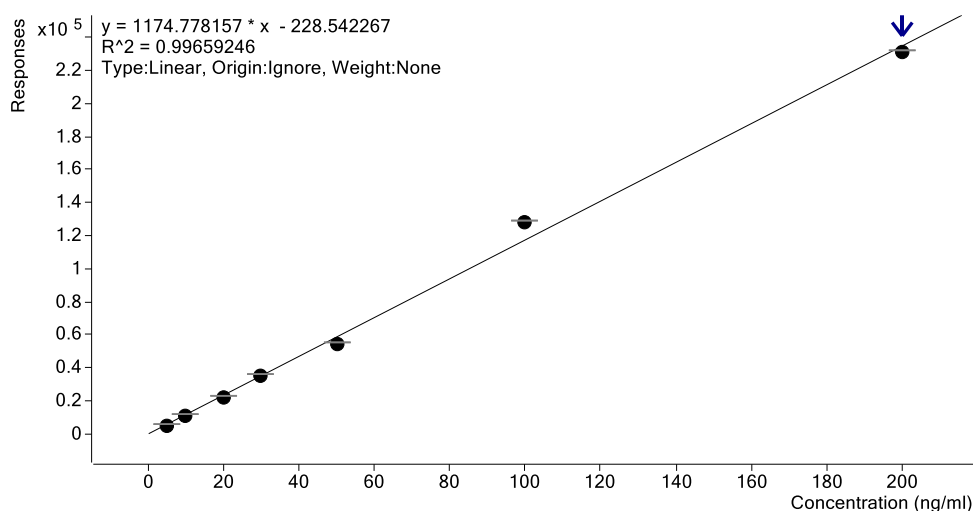
MDL của các chất cấm nhóm tiểu đường là 0,1 mg/kg tương ứng với 2,0 ng/mL trên dung dịch và MQL là 0,3 mg/kg tương ứng với 6,0 ng/mL trên dung dịch được thể hiện chi tiết trong bảng 3.23.

Bảng 3.23. Giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện của một số chất nhóm hỗ trợ tiểu đường

Chất phân tích	S/N tại 0,1 mg/kg	S/N tại 0,3 mg/kg	MDL (mg/kg)	MLQ (mg/kg)
Metformin	5,8	44,0	0,1	0,3
Phenformin	13,5	59,4		
Buformin	7,0	32,5		
Glimepirid	3,0	11,8		
Glibenclamide	5,6	10,7		

3.4.3.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Dãy chuẩn làm việc được pha trong dung dịch chiết mẫu trắng. Pha dãy chuẩn làm việc nồng độ 10; 20; 30; 50; 100; 200 ng/mL và phân tích trên LC-MS/MS. Xây dựng đường phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng. Đường chuẩn được lập trên phần mềm của thiết bị thể hiện trong hình 3.26 và Phụ lục 5.



Hình 3.26. Đường chuẩn phân tích burfomin

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ phân tích, tín hiệu của chất phân tích tỷ lệ tuyến tính với nồng độ với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$ với độ chệch $< 15\%$ với tất cả các giá trị. Vì vậy, khoảng nồng độ từ 10 ng/mL đến 200 ng/mL được nghiên cứu chọn làm khoảng định lượng.

3.4.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi

Nghiên cứu tiến hành khảo sát độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp bằng cách phân tích các mẫu trắng thêm chuẩn ở 4 mức nồng độ khác nhau, hàm lượng là 1,0; 2,0; 5,0 và 10 mg/kg, lặp lại 6 lần cho mỗi nồng độ. Các kết quả được thể hiện trong bảng 3.24 và Phụ lục 5.

Bảng 3.24. Độ lặp lại và độ thu hồi của burfomin

Mức Mẫu	10 mg/kg		5 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg	
	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Hàm lượng	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%
1	8,59	85,9	5,00	2,20	2,20	109,9	0,94	94,2
2	9,26	92,6	5,17	2,14	2,14	106,8	0,90	89,9
3	8,94	89,4	5,02	2,01	2,01	100,4	0,85	85,4
4	9,25	92,5	4,59	2,20	2,20	110,1	0,84	83,7
5	8,59	85,9	5,02	2,19	2,19	109,5	0,98	97,8
6	9,34	93,4	4,58	2,03	2,03	101,6	0,91	90,5
Độ thu hồi TB (%)	90,0		97,9		106,4		90,26	
SD (%)	3,01		5,08		4,09		5,30	
RSD (%)	7,50		8,32		9,55		5,87	

Từ các kết quả thu được, độ thu hồi trung bình của các chất nhóm hỗ trợ giảm cân lần lượt nằm trong khoảng 82,0 - 108,6% và độ lệch chuẩn tương đối từ 2,62 - 8,97%. Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chính xác đáp ứng yêu cầu của AOAC [29].

3.4.4. Phân tích các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường trong mẫu TPBVSK

Trên cơ sở phương pháp đã xây dựng, nghiên cứu tiến hành xác định hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường trong 30 mẫu TPBVSK dạng viên nang cứng, viên nang mềm và dạng lỏng. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.25.

Bảng 3.25. Kết quả phân tích hàm lượng các chất nhóm hỗ trợ tiêu đường trong một số mẫu TPBVSK

Mẫu	Hàm lượng (mg/kg)	
	Metformin	Phenformin, Buformin, Glibenclamid, Gliclazid
TĐ.01 - TĐ.08	-	-
TĐ.09	2,20	-
TĐ.10	-	-
TĐ.11 - TĐ.20	-	-
TĐ.21 - TĐ.30	-	-

“-”: không phát hiện hoặc nhỏ hơn MDL

Qua bảng kết quả phân tích, nghiên cứu đã phát hiện có 1 mẫu viên nang cứng, dương tính với metformin và không phát hiện mẫu nào dương tính với phenformin, buformin, glibenclamid và gliclazid.

Các kết quả phân tích chất cấm trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe hỗ trợ tiêu đường cho thấy tỉ lệ phát hiện rất thấp. Các kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Ma Jun cùng các cộng sự [74] và báo cáo của FDA [110]. Trong thời gian tới, nghiên cứu tiếp tục thu thập các mẫu trên thị trường và ứng dụng phương pháp phân tích để có các kết quả đánh giá toàn diện hơn.

KẾT LUẬN

Với các mục tiêu, nội dung nghiên cứu đề ra, sau quá trình thực hiện, luận án đã đạt được các kết quả như sau:

1. Đã xây dựng quy trình LC-HR/MS sàng lọc các chất cấm nhóm hỗ trợ sinh lý, hỗ trợ giảm cân và tiểu đường trong TPBVSK: điều kiện HRMS tìm kiếm các mảnh phổ lý thuyết và thực nghiệm, giới hạn phát hiện 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ đến 0,1 mg/kg ; ứng dụng sàng lọc các chất cấm trong 152 mẫu TPBVSK: 20 mẫu dương tính nhóm PDE-5i với 14 hợp chất, 06 mẫu dương tính với sibutramin và desmethylsibutramin, 01 mẫu dương tính với metformin. Phát hiện 01 hợp chất mới nhóm PDE-5i là N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil góp phần bổ sung vào thư viện toàn cầu nhóm PDE-5i.
2. Đã xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ chức năng sinh lý: dung môi chiết acetonitril: nước, MDL: 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cho Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil và 0,1 mg/kg cho các chất còn lại, độ thu hồi trong khoảng 80-110% với RSD < 15%; ứng dụng phương pháp định lượng các PDE-5i trong 92 mẫu TPBVSK phát hiện được 12 hợp chất với hàm lượng trong khoảng 0,006- 226,8 mg/g .
3. Đã xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân gồm: dung môi chiết ACN/ axit formic 1%, MDL: 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, độ thu hồi trong khoảng 80-110% với RSD < 9,80%; ứng dụng phương pháp phân tích 30 mẫu TPBVSK hỗ trợ giảm cân: 06 mẫu chứa sibutramin với hàm lượng 2,20- 11,9 mg/g , 01 mẫu chứa desmethylsibutramin với hàm lượng 2,0 mg/g .
4. Đã xây dựng quy trình LC-MS/MS xác định đồng thời một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường gồm: dung môi chiết MeOH, MDL: 0,1 mg/kg , độ thu hồi trong khoảng 83-114% với RSD < 10,6%; ứng dụng phương pháp phân tích 30 mẫu TPBVSK hỗ trợ tiểu đường phát hiện 01 mẫu viên nang cứng có chứa metformin với hàm lượng 2,2 mg/kg .

Các kết quả đạt được của luận án là căn cứ để các cơ quan quản lý sửa đổi, bổ sung các quy định về chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe được quy định tại Thông tư 10/2021/TT-BYT bao gồm: bổ sung danh mục chất cấm và quy định về mức giới hạn phát hiện của các chất cấm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Thi Oanh Nguyen**, Cao-Son Tran, Thi Thu Hang Do, Thi Minh Hoa Nguyen, Quang-Dong Bui, Cao-Tien Bui, Hong-Ngoc Nguyen, Thu-Hien Dang, Viet-Chien Dinh, Thi Anh Huong Nguyen, Thi Hong Hao Le (2021), "Rapid Screening and Quantitative Determination of Illegal Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors (PDE-5i) in Herbal Dietary Supplements", Journal of Analytical Methods in Chemistry (ISI, Q2), Vol. 2021, Article ID 5579500, 11 pages.
2. **Thi Oanh Nguyen**, Khanh Cao Cong, Thi Thanh Hoa Mac, Thi Anh Huong Nguyen, Thi Hong Hao Le (2022), "Controlling of adulterants in weight loss dietary supplements in Vietnam", The All-Russian scientific and practical online conference for young scientists and Rospotrebnadzor experts with international participation "Fundamental and applied aspects of health risk analysis – 2022", Perm (Russian) from 10th to 14th October, 2022, <https://fcrisk.ru/forums/node/1280>.
3. **Nguyễn Thị Oanh**, Hoàng Quốc Anh, Vũ Thị Trang, Cao Công Khánh, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Mạc Thị Thanh Hoa, Đinh Việt Chiến, Lê Thị Phương Thảo, Trần Cao Sơn, Nguyễn Thị Ánh Hường, Lê Thị Hồng Hào (2024), "Phân tích hàm lượng các chất hỗ trợ giảm đường huyết trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS)", đăng trên Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ (Tạp chí được tính 1 điểm theo Hội đồng chức danh Giáo sư nhà nước) <https://js.vnu.edu.vn/NST/article/view/5666/4689>.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Bộ Y Tế (2021), *Thông tư số 10/2021/TT-BYT ngày 30/6/2021 quy định danh mục chất cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe*, Phụ lục Danh mục các chất.
2. Ngô Quý Châu (2015), *Bệnh học nội khoa tập 2*, Nhà xuất bản Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
3. Chính Phủ (2018), *Nghị định số 15/2018/NĐ-CP ngày 02/02/2018 Nghị định chi tiết thi hành một số điều của Luật an toàn thực phẩm*, Khoản 1, Điều 3.
4. Cục An toàn thực Phẩm (2014), *Cục ATTP thu hồi hiệu lực giấy Chứng nhận tiêu chuẩn sản phẩm và Xác nhận công bố hợp quy của 02 TPCN*, truy cập 10 giờ ngày 02/06/2023, tại trang <https://vfa.gov.vn/thanh-kiem-tra/cuc-attp-thu-hoi-hieu-luc-giay-chung-nhan-tieu-chuan-san-pham-va-xac-nhan-cong-bo-hop-quy-cua-02-tpcn.html>.
5. Dương Thị Mai Hoa, Phạm Thị Ngọc Mai, Cao Công Khánh, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Mạc Thị Thanh Hoa, Trần Hùng Sơn, Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Thị Hồng Hảo (2020), "Xác định đồng thời hàm lượng sibutramine và một số dẫn xuất trong thực phẩm bổ sung hỗ trợ giảm cân bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)", *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, 3(2), tr. 104-114.
6. Vũ Thị Thanh Huyền (2015), "Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh đái tháo đường tại thành phố Hà Nội năm 2014", *Tạp chí Y học Việt Nam*, 1, tr. 68- 73.
7. Khánh Đình Quốc (2021), *Thực trạng mắc bệnh đái tháo đường type 2 ở người lao động thường xuyên phải làm ca, thêm giờ và một số yếu tố nguy cơ*, Trường đại học Y Hà Nội, Luận án tiến sĩ.
8. Trịnh Văn Lầu, Trần Việt Hùng, Lê Thị Phương Chi (2008), "Nghiên cứu phân tích phát hiện các chất chống rối loạn cương dương trộn trái phép trong thuốc đông dược và thực phẩm chức năng", *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 3, tr. 113-118.

9. Nguyễn Trọng Linh, Cao Hữu Nghĩa, Châu Vĩnh Thị (2022), "Tầm soát các chất hóa dược tổng hợp: ức chế PDE5, kháng viêm, giảm đau, giảm cân trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng LC-MS/MS", *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, 5(2), tr. 462-473.
10. Đào Thị Cẩm Minh, Nguyễn Thị Thanh Huyền, Lê Văn Vũ, Nguyễn Thị Kiều Anh, Phạm Thị Thanh Hà (2019), "Xây dựng phương pháp phát hiện sildenafil trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng kết hợp tán xạ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS)", *Tạp chí Dược học*, 59(2), tr. 74-78.
11. Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh (2020), "Xác định một số chất ức chế Phosphodiesterase -5 trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS", *Tạp chí Dược liệu*, 25(1), tr. 27-32.
12. Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Vũ Tùng Lâm, Nguyễn Thế Anh, Nguyễn Thị Kiều Anh (2019), "Định tính và định lượng thuốc hạ glucose huyết nhóm sulfonylurea trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Dược liệu*, 24(6), tr. 346- 351.
13. Sóng Sức khỏe & đời (2024), *Mất thị lực, tổn thương não vì uống Detox Táo giảm cân có chất cấm Sibutramin*, truy cập ngày 15 giờ ngày 10/4/2024, tại trang <https://suckhoedoisong.vn/mat-thi-luc-ton-thuong-nao-vi-uong-detox-tao-giam-can-co-chat-cam-sibutramin-169240410143309689.html>.
14. Lê Thị Bảo Trâm, Tạ Nguyễn Khánh Hà, Hoàng Thị Minh Nguyệt, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh, Nguyễn Hải Phong, Huỳnh Văn Chung, Đào Thị Cẩm Minh (2023), "Phát hiện một số thuốc hạ glucose máu trộn lẫn trong chế phẩm dược liệu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)", *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 132(1), tr. 65-73.

Tài liệu Tiếng Anh

15. Abdelrahman M.M., Emam R.A., Ali N.W., Abdelaleem E.A. (2021), "Validated spectrofluorometric determination of hypoglycemic combination,

- in pure form and pharmaceutical formulation using 9,10-phenanthraquinone reagent", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 247, pp. 1-7.
16. Akamatsu S., Mitsuhashi T. (2013), "Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry", *Drug Testing and Analysis*, 6, pp. 426-433.
 17. Al-Tahami Khaled (2014), "Determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements sold in the Yemeni market", *International Journal of Scientific Research*, 3(4), pp. 403-405.
 18. Ali I., Aboul-Enein H. (2004), "Validated Method for Tadalafil Analysis in Pharmaceutical Preparations by Capillary Electrophoresis", *Chromatographia*, 60, pp. 187-191.
 19. Ananya K., Sarikitiya C., Cheng H.Ph., Sangay W., Jenjira S., Kritsada S., Kasrin S., Asamee S., Kiattisak P. (2023), "Sibutramine detection in weight-loss products using a sodium/phosphorus dual-doped carbon nanotubes modified electrode", *Microchemical Journal*, 190, pp. 1-10.
 20. Andrew Duncan (2000), "Screening for surreptitious laxative abuse", *Annals of Clinical Biochemistry*, 37, pp. 1-8.
 21. AOAC 2015.12 (2015), *Screening and Identification of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors in Dietary Ingredients and Supplements*, AOAC International, United States.
 22. Apovian C.M., Aronne L.J., Bessesen D.H., McDonnell M.E., Murad M.H., Pagotto U., Still C.D. (2015), "Pharmacological Management of Obesity: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(2), pp. 342-362.
 23. Association of South East Asian Nations (2015), *ASEAN Guiding principles for inclusion into or exclusion from the negative list of substances for health supplements*, Association of South East Asian Nations (ASEAN), Indonesia.

24. Bortolini C., Pivato A., Bogialli S., Pastore P. (2015), "One-shot' analysis of PDE-5 inhibitors and analogues in counterfeit herbal natural products using an LC-DAD-QTOF system", *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(20), pp. 6207-6216.
25. Ching C.K., Lai C.K., Poon W.T., Wong E.N.P., Yan W.W., Chan A.Y.W, Mak T.W.L (2008), "Hazards posed by a banned drug-phenformin is still hanging around", *Hong Kong Med J*, 14(1), pp. 50-54.
26. Chiolero A. (2018), "Why causality, and not prediction, should guide obesity prevention policy", *The Lancet Public Health*, 3(10), pp. 461-462.
27. Christopoulou-Aletra H., Papavramidou N. (2004), "Methods Used by the Hippocratic Physicians for Weight Reduction", *World Journal of Surgery*, 28(5), pp. 513-517.
28. Comisarow M.B., Marshall A.G. (1974), "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy", *Chemical Physics Letters*, 25(2), pp. 282-283.
29. Deorge W.L. (2012), *AOAC Official Methods of Analysis- Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, International AOAC, Arlington.
30. Diva C., Vadalía J., Joshi H., Vegad U.G. (2022), "Rapid screening of undeclared hypoglycemics in counterfeit herbal antidiabetic products using HPTLC-MS", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 45(5), pp. 100-106.
31. Dietary Supplements Chapters: <2251> (2017), "Screening for undeclared drugs and drug analogues", *The United States Pharmacopeia*, (USP 40) NF 35.
32. Do T.T.K., Theocharis G., Reich E. (2015), "Simultaneous Detection of Three Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors and Eight of Their Analogs in Lifestyle Products and Screening for Adulterants by High-Performance Thin-Layer Chromatography", *Journal of AOAC International*, 98(5), pp. 1226-1233.

33. Doomkaew A., Prutthiwanasan B., Suntornsuk L. (2015), "Stability indicating MEKC method for the determination of gliclazide and its specified impurities", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, pp. 119-128.
34. Elina P.G., Kalin I., Stanislav G., Anna M. (2018), "Detection of sibutramine in herbal food supplements by UHPLC/HR-MS and UHPLC/MS-MS", *Biomedical Research*, 29(14), pp. 3006-3009.
35. Elkady E.F., El-Zaher A.A., Elwy M.H., Saleh M.A. (2015), "Validated liquid chromatographic method for simultaneous determination of metformin, pioglitazone, sitagliptin, repaglinide, glibenclamide and gliclazide - Application for counterfeit drug analysis", *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 13, pp. 1-8.
36. Flores J.R., Nevado J.J.B., Peñalvo G.C., Diez N.M. (2004), "Development of a Micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of three drugs employed in the erectile dysfunction therapy", *Journal of Chromatography B*, 811(2), pp. 231–236.
37. Friedman H.S. (2015), *Encyclopedia of Mental Health*, Academic Press, Oxford.
38. Geer-Wallace M.A., McCord J.P. (2020), "High-resolution mass spectrometry", *Breathborne Biomarkers and the Human Volatilome*, pp. 253-270.
39. Gilard V., Balayssac S., Tinaugus A., Martins N., Martino R., Malet-Martino M. (2015), "Detection, identification and quantification by ¹H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, pp. 476–493.
40. Hancu G., Hilochie A., Vlad A.R., Cârje A., Tero-Vescan A. (2016), "Enantiomeric Separation of Sibutramine by Capillary Zone Electrophoresis", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(6), pp. 1116-1120.

41. Haslam D.W., James W.P.T. (2005), "Obesity", *The Lancet*, 366(9492), pp. 1197–1209.
42. Hayun M.B.P., Maggadani B.P., Amalina N. (2016), "Determination of sibutramine adulterated in herbal slimming products using TLC densitometric method", *Indonesian Journal of Pharmacy*, 27(1), pp. 15-21.
43. Heal D.J., Smith S.L., Gosden J., Nutt D.J. (2013), "Amphetamine, past and present a pharmacological and clinical perspective", *Journal of Psychopharmacology*, 27(6), pp. 479–496.
44. Hong J.H., Kwon Y.S., Kim I.Y. (2016), "Pharmacodynamics, pharmacokinetics and clinical efficacy of phosphodiesterase-5 inhibitors", *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(2), pp. 183-192.
45. Huang Z., Xiao S., Luo D., Chen B., Yao S. (2008), "Simultaneous Determination of Sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in Dietary Supplements for Weight Control by HPLC–ESI-MS", *Journal of Chromatographic Science*, 46(8), pp. 707-711.
46. Idris A.M., Alnajjar A.O. (2007), "Multi-response optimization of a capillary electrophoretic method for determination of vardenafil in the bulk drug and in a tablet formulation", *Acta Chromatographica*, 19(19), pp. 97-109.
47. International Union of Pure and Applied Chemistry (1997), *Compendium of chemical terminology* 2, 2, Wiley, England.
48. Ivana M.S.G., Goran S.N., Ivan M.S., Marinković V.D. (2009), "Quantitative analysis of Loperamide hydrochloride in the presence its acid degradation products", *Scientific paper*, 63(1), pp. 39-46.
49. James W.P.T., Caterson I.D., Coutinho W., Finer N., Van-Gaal L.F., Maggioni A.P., Renz C.L. (2010), "Effect of Sibutramine on Cardiovascular Outcomes in Overweight and Obese Subjects", *New England Journal of Medicine*, 363(10), pp. 905–917.

50. Jeong J.H. (2016), "LC-ESI-MS/MS analysis of phosphodiesterase-5 inhibitors and their analogues in foods and dietary supplements in Korea", *Food Additives & Contaminants: Part B*, 9(1), pp. 1-8.
51. Jensen M.D., Ryan D.H. (2013), "2013 AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults", *Circulation*, 129(25), pp. 102-138.
52. Jeongeun K., Dasom S., Hui-Seung K., Junghyuck S., Gunyoung L., Eunju L. (2022), "Simultaneous Determination of 80 Unapproved Compounds using HPLC and LC-MS/MS in Dietary Supplements", *Mass Spectrometry Letters*, 13(3), pp. 58-59.
53. Jiru M. (2019), "Analysis of phosphodiesterase type 5 inhibitors as possible adulterants of botanical-based dietary supplements: extensive survey of preparations available at the Czech market", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, pp. 713-724.
54. Kaddoumi A., Nakashima M.N., Maki T., Matsumura Y., Nakamura J., Nakashima K. (2003), "Liquid chromatography studies on the pharmacokinetics of phentermine and fenfluramine in brain and blood microdialysates after intraperitoneal administration to rats", *Journal of Chromatography B*, 791(1), pp. 291-303.
55. Kamal-Ahmed R., Saad E.M., Fahmy H. M., Nashar R.M.E. (2021), "Design and application of molecularly imprinted Polypyrrole/Platinum nanoparticles modified platinum sensor for the electrochemical detection of Vardenafil", *Microchemical Journal*, 171, pp. 1-11.
56. Kee C.L., Ge X., Gilard V., Malet-Martino M., Low M.Y. (2018), "A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found as adulterants in dietary supplements", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, pp. 250–277.
57. Kee C.L., Ge X., Low M.Y. (2015), "Application of Orbitrap-mass spectrometry to differentiate isomeric sildenafil and thiosildenafil-like

- analogues used for the adulteration of dietary supplements", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(10), pp. 1737-1748.
58. Kerstin S., Olaf S., Maciej B. (1993), "High-Resolution, Accurate-Mass Orbitrap Mass Spectrometry - Definitions, Opportunities and Advantages", *University Science Books*, pp. 1-5.
59. Kee C.-L., Ge X., Tran C.-S., Bui Q.-D., Cheah N.-P., Low M.-Y. (2020), "Isolation and characterization of N-hydroxyethyl dithio-desethyl carbodenafil from a health supplement", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 189, pp. 1-18.
60. Khazan M., Hedayati M., Kobarfard F., Askari S., Azizi F. (2014), "Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements", *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(3), pp. 1-6.
61. Khorassani F.E., Misher A., Garris S. (2015), "Past and present of antiobesity agents: Focus on monoamine modulators", *American Journal of Health-System Pharmacy*, 72(9), pp. 697-706.
62. Kim N.S., Kim K.Y., Yoo G.J., Lee J.H., Park H.N., Sung-Kwan P., Sun Y.B. (2018), "Determination of 26 anti-diabetic compounds in dietary supplements using a validated UPLC method", *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 35(3), pp. 387-394.
63. Knoll S., Jacob S., Mieck S., Triebskorn R., Braunbeck T., Huhn C. (2020), "Development of a capillary electrophoresis–mass spectrometry method for the analysis of metformin and its transformation product guanylurea in biota", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, pp. 4985-4996.
64. Ku Y.R., Chag L.Y., Ho L.K., Lin J.H. (2003), "Analysis of synthetic anti-diabetic drugs in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(2), pp. 329-334.

65. Lai E., Feng S. (2006), "Solid phase extraction - Non-aqueous capillary electrophoresis for determination of metformin, phenformin and glyburide in human plasma", *Journal of Chromatography B*, 843(1), pp. 94–99.
66. Lebel P., Gagnon J., Furtos A., Waldron K.C. (2014), "A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products", *Journal of Chromatography A*, 1343, pp. 143–151.
67. Lee E.S., Lee J.H., Han K.M., Kim J.W., Hwang I.S., Cho S., Kim J., Soon Y.H. (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.
68. Lee J.H., Kim N.S., Han K.M., Sung H.K., Sooyeul C., Woo S.K. (2013), "Monitoring by LC-MS/MS of 48 compounds of sildenafil, tadalafil, vardenafil and their analogues in illicit health food products in the Korean market advertised as enhancing male sexual performance", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(11), pp. 1849-1857.
69. Lee J.H., Park H.N., Park S., Lee Y-M., Kang H. (2019), "Development of a specific fragment pattern-based quadrupole-Orbitrap mass spectrometry method to screen adulterated products of phosphodiesterase-5 inhibitors and their analogues", *Science & Justice*, 59(4), pp. 433–441.
70. Li R.K., Bo T., Liu H.W., Li K. (2002), "Determination of sildenafil in medicines for erectile dysfunction by capillary electrophoresis", *Chinese journal of Chromatography*, 20(4), pp. 335-337.
71. Li Y., Xue F., Wang Y., Xue Y., Sun C.J. (2011), "Simultaneous Determination of Seven Adulterants in Functional Foods by High-Performance Capillary Electrophoresis", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 39(11), pp. 1716–1720.

72. Lović J., Trišović N., Antanasijević J., Nikolić N.D., Stevanović S., Mijin D., Vuković D., Mladenović A., Petrović S., Ivić M.A. (2016), "Electrochemical determination of sildenafil citrate as standard, in tablets and spiked with human serum at gold and cystein modified gold electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, pp. 103-107.
73. Luppino F.S., de Wit L.M., Bouvy P.F., Stijnen T., Cuijpers P., Penninx B.W.J.H., Zitman F.G. (2010), "Overweight, Obesity, and Depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies", *Archives of General Psychiatry*, 67(3), pp. 220-229.
74. Ma J., Pawar R.S., Grundel E. (2017), "Validation of an LC-MS/MS method for analysis of anti-diabetic drugs in botanical dietary supplements labeled for blood sugar management", *Drug Testing and Analysis*, 10(3), pp. 609-617.
75. Mahgoub H., Youssef R.M., Korany M.A., Khamis E.F., Kamal M.F. (2013), "Development and validation of spectrophotometric and HPTLC methods for simultaneous determination of rosiglitazone maleate and metformin hydrochloride in the presence of interfering matrix excipients", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(9), pp. 1190–1198.
76. Makarov A. (2000), "Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis", *Analytical Chemistry*, 72(6), pp. 1156–1162.
77. Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K., Horning S. (2006), "Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer", *Analytical Chemistry*, 78(7), pp. 2113–2120.
78. Makarov A., Scigelova M. (2010), "Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1217(25), pp. 3938–3945.
79. Maluf D.F., Farago P.V., Pedroso C.F., Pontarolo R., Barreira S.M.W. (2007), "Validation of an Analytical Method for Determination of Sibutramine

- Hydrochloride Monohydrate in Capsules by Uv-Vis Spectrophotometry", *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(6), pp. 909-912.
80. Manuel Cidras (2015), "Body Mass Exponential Index: An Age-Independent Anthropometric Nutritional Assessment", *Open Access Library Journal*, 2, pp. 1-8.
 81. Mathon C., Ankli A., Reich E., Bieri S., Christen P. (2014), "Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry", *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(1), pp. 15–20.
 82. Mcgwin G. (2010), "Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Use and Hearing Impairment", *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 136(5), pp. 488-492.
 83. Mirzajani R., Karimi S. (2018), "Preparation of γ -Fe₂O₃ /hydroxyapatite/Cu(II) magnetic nanocomposite and its application for electrochemical detection of metformin in urine and pharmaceutical samples", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 270, pp. 405–416.
 84. Morton I.K., Hall J.M. (2012), "Concise Dictionary of Pharmacological Agents: Properties and Synonyms", *Springer Science & Business Media*, pp. 218-219.
 85. Murray K.K., Boyd R.K., Eberlin M.N., Langley G.J., Liang L., Naito Y. (2013), "Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)", *Pure and Applied Chemistry*, 85(7), pp. 1515–1609.
 86. Muschietti L., Redko F., Ulloa J. (2020), "Adulteration of selected dietary supplements and their detection methods", *Drug Testing and Analysis*, 12, pp. 861-886.
 87. Nelson D.L., Gehlert D.R. (2006), "Central Nervous System Biogenic Amine Targets for Control of Appetite and Energy Expenditure", *Endocrine*, 29(1), pp. 49–60.

88. Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R.C. (2008), *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, Second Edition, McGraw Hill Professional, New York.
89. Nguyen V.T., Manh T.D., Duyen V.T., Binh N.T.M., Duong D.V., Tu N.T.T., Toan T.T.T., Nhiem D.N., Son L.L., Nhan D.Q., Quyen N.D.V., Hoa D.T.N, Khieu D.Q. (2022), "Differential Pulse Voltammetric Determination of Sildenafil Using Nano-Iron Oxides Modified Electrode", *Journal of Nanoparticle Research*, 24(145), pp. 1-7.
90. Niessen W.M.A. (2006), *Liquid chromatography mass spectrometry*, 3th, 3th Edition, Taylor and Francis, Florida.
91. Nisoli E., Carruba M.O. (2000), "An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action", *Obesity Reviews*, 1(2), pp. 127–139.
92. Notarnicola M., Celentano V., Gavriilidis P., Abdi B., Beghdadi N., Sommacale D., Angelis N., Brunetti F., Coccolini F. (2020), "PDE-5i Management of Erectile Dysfunction After Rectal Surgery: A Systematic Review Focusing on Treatment Efficacy", *American Journal of Men's Health*, 14(5), pp. 1-11.
93. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. (2016), "Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature", *BMC Medicine*, 14(1), pp. 1-11.
94. Onal A. (2009), "Spectrophotometric and HPLC determinations of anti-diabetic drugs, rosiglitazone maleate and metformin hydrochloride, in pure form and in pharmaceutical preparations", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), pp. 4998-5005.
95. Phattanawasin P., Sotanaphun U., Sukwattanasinit T., Akkarawaranthorn J., Kitchaiya S. (2012), "Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method", *Forensic Science International*, 219(1), pp. 96-100.

96. Porrà R., Quaglia M.G., Fanali S. (1995), "Determination of fenfluramine enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis", *Chromatographia*, 41(7), pp. 383–388.
97. Pourtaheri E., Taher M.A., Ali G.A.M., Agarwal S., Gupta V.K. (2019), "Electrochemical detection of gliclazide and glibenclamide on ZnIn₂S₄ nanoparticles-modified carbon ionic liquid electrode", *Journal of Molecular Liquids*, 289, pp. 1-7.
98. Rajh-Vidal D.T., Augelli M.A., Luciodo-Lago C. (2013), "Determination of sildenafil and vardenafil by capillary zone electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection", *Analytical Methods*, 5(8), pp. 2041-2045.
99. Ren Y., Wu C., Zhang J. (2012), "Simultaneous screening and determination of 18 illegal adulterants in herbal medicines and health foods for male sexual potency by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry", *Journal of separation science*, 35(21), pp. 2847–2857.
100. Rocha T., Amaral J.S., Oliveira M.B.P.P. (2015), "Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), pp. 43-62.
101. Roerig J.L., Steffen K.J., Mitchell J.E., Zunker C. (2010), "Laxative Abuse: epidemiology, diagnosis and management", *Drugs*, 70(12), pp. 1487–1503.
102. Roha S.H., Kanga Y.P., Parka S., Huha Y., Leeb J., Parka J.H., Kima D., Kwona S.W. (2011), "Determination of tadalafil and N-desmethylsibutramine in health and dietary supplements using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF/MS)", *Food Additives and Contaminants*, 28(11), pp. 1475–1482.
103. Roopa K.P., Keshavamurthy K., Mahesh B., Veena K.P., Shankara B.S., Basavaiah K. (2022), "Determination of Vardenafil in Pure and Dosage Forms by Spectrophotometry", *Journal of Applied Spectroscopy* 89, pp. 809–818.

104. Saichanapan J., Promsuwan K., Limbut W. (2020), "Adsorption and determination of sibutramine in illegal slimming product using porous graphene ink-modified electrode", *Talanta*, 212, pp. 1-9.
105. Sakur A.A., Affas S. (2017), "Validated spectrophotometric method to determine vardenafil and sildenafil in pharmaceutical forms using potassium iodide and potassium iodate", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(10), pp. 65-69.
106. Salem W.A., Elkady E.F., Fouad M.A., Abdul-Azim M.M. (2021), "Analysis of Metformin and Five Gliptins in Counterfeit Herbal Products: Designs of Experiment Screening and Optimization", *Journal of AOAC International*, 104(6), pp. 1667-1680.
107. Song J.Z., Chen H.F., Tian S.J., Sun Z.P. (1998), "Determination of metformin in plasma by capillary electrophoresis using field-amplified sample stacking technique", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708(1), pp. 277–283.
108. Sukhanova A.M., Perova I.B., Rodionova G.M. (2020), "Development and Validation of Sibutramine Determination in Drug Products by Capillary Electrophoresis", *Drug development & registration*, 9(4), pp. 141-145.
109. Suthar A.P., Dubey S.A., Patel S.R. (2009), "A Validated Specific Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for the estimation of Sibutramine Hydrochloride Monohydrate in bulk drug and capsule dosage forms", *International Journal of ChemTech Research Coden*, 1(4), pp. 793-801.
110. Suvi K., Belma M., Pouya S., Paraskevi S., Hong S., Lorenzo P., Phil R. (2019), *IDF Diabetes atlas*, Ninth edition, International diabetes federation, New York.
111. Tan P., Liu L., Wei S., Tang Z., Yang L., Wei Q. (2017), "The Effect of Oral Phosphodiesterase-5 Inhibitors on Sperm Parameters: A Meta-analysis and Systematic Review", *Urology*, 105, pp. 54–61.

112. Tucker J., Fischer T., Upjohn L., Mazzer D., Kumar M. (2018), "Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated With US Food and Drug Administration Warnings", *JAMA Network Open*, 1(6), pp. 1-11.
113. U.S. Food & Drug Administration (2024), *Health Fraud Product Database*, accessed at 10:00 on April 04th, 2024 at website <https://www.fda.gov/consumers/health-fraud-scams/health-fraud-product-database>.
114. Wisner D. (2012), "Martindale: The Complete Drug Reference", *Journal of the Medical Library Association*, 100(1), pp. 75-76.
115. Wisnu A., Sudewi S., Lolo W. A. (2017), "Analisis Bahan Kimia Obat Sibutramin Hidroklorida Pada Jamu Pelangsing Yang Beredar Di Kota Manado", *Jurnal Ilmiah Pharmacon*, 6(4), pp. 75-81.
116. Walsh M.I., El-Enany N., Saad S. (2010), "A New Spectrophotometric Method for Determination of Phenylpropanolamine HCl in its Pharmaceutical Formulations via Reaction with 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone", *International Journal of Biomedical Science*, 6(2), pp. 150-157.
117. Wang D., Man R., Shu M., Liu H., Gao Y., Luan F. (2016), "Detection of sibutramine and phenolphthalein in functional foods using capillary electrophoresis", *Analytical Methods*, 8(3), pp. 621-626.
118. Wang M., Zhang Y., Li Q.M. (2008), "Assay of Phenformin Hydrochloride in Pharmaceutics by Coupling with Sodium Nitroprusside", *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55(6), pp. 1351-1356.
119. Weintraub M. (1992), "Long-term weight control: the National Heart, Lung, and Blood Institute funded multimodal intervention study", *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 51(5), pp. 581-585.
120. Wiley W.C., McLaren I.H. (1955), "Time - of - Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution", *Review of Scientific Instruments*, 26(12), pp. 1150-1157.

121. Yamamoto S., Sumioka S., Fujioka M., Mikami E., Miyamoto K. (2011), "A Study on Detection of Drugs in Slimming Health Foods Using GC-MS/MS", *Food Hygiene and Safety Science*, 52(6), pp. 363–369.
122. Yang X., Xu Z., Zhang C., Cai Z., Zhang J. (2017), "Metformin, beyond an insulin sensitizer, targeting heart and pancreatic β cells", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(8), pp. 1984–1990.
123. Yardımcı C., Özalp N. (2005), "Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis", *Analytica Chimica Acta*, 549(2), pp. 88–95.
124. Yu Z., Wei Q., Fan Q., Wan C. (2010), "A simple and convenient method for simultaneous determination of four major species of illegal additives in slimming health food", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(4), pp. 452–461.

MỤC LỤC PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Danh mục chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu.....	1
Phụ lục 2. Thông tin của mẫu thu thập trong nghiên cứu	4
Phụ lục 3. Sắc kí đồ chất phân tích nhóm PDE-5i bằng LC-MS/MS	5
Phụ lục 4. Kết quả của phương pháp LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân.....	45
Phụ lục 5. Kết quả của phương pháp LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiêu đường	55

Phụ lục 1. Danh mục chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Bảng PL 1. Danh mục chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên chất	Hãng cung cấp	Code	Số lô	Độ tinh khiết (%)
Nhóm chất hỗ trợ chức năng sinh lý					
1.	2-Hydroxypropyl nortadalafil	TRC	1353020-85-5	1-HPA-25-1	98,0
2.	Acetaminotadalafil	TRC	A161250	7-APD-82-1	97,0
3.	Acetil acid	TRC	C177990	1-WJS-22-3	97,0
4.	Acetildenafil	TRC	A161600	2-ACH-50-1	98,0
5.	Acetylvardenafil	TRC	V098015	1-WJS-172-3	98,0
6.	Aminotadalafil	LGC	C10227200	832386	99,4
7.	Avanafil	TRC	A794670	8-GHZ-5-1	98,0
8.	Benzamidenafil	TRC	X500000	4-ZCA-137-2	90,0
9.	Benzylsildenafil	TRC	M225935	1-JMS-111-1	98,0
10.	Carbodenafil	LGC	DRE-C11002000	1207185	99,1
11.	Chlorodenafil	TRC	C365535	3-PKB-26-3	98,0
12.	Chloropretadalafil	LGC	DRE-C11502100	1406246	99,8
13.	Cyclopentylafil	TRC	DRE-C11833595	1303627	96,0
14.	Depiperazino-thiosildenafil	TRC	E892530	2-CGF-101-4	96,0
15.	Descarbonsildenafil	TRC	DRE-C16946550	1121671	99,3
16.	Desmethyl fondenafil	TRC	D292430	2-CGF-94-3	98,0
17.	Dimethylacetildenafil	TRC	D282120	19-PSB-16-2	98,0
18.	Dimethylsildenafil	TRC	LGCFOR0254.08	1005107	99,9
19.	Gendenafil	TRC	G349960	11-DPM-169-3	96,1
20.	Homosildenafil	Biosynth carb0syth	FE23841	FE238411801	99,5
21.	Hydroxyacetildenafil	TRC	H739940	1-TEK-52-2	98,0
22.	Hydroxychlorodenafil	TRC	H825115	3-PKB-33-1	98,0
23.	Hydroxyhomosildenafil	TRC	H942840	1-ARD-37-2	97,0
24.	Hydroxythio-homosildenafil	TRC	H963150	1-WBZ-11-3	98,0

TT	Tên chất	Hãng cung cấp	Code	Số lô	Độ tinh khiết (%)
25.	Hydroxythiovardenafil	TRC	H963400	1-JSC-92-2	98,0
26.	Hydroxyvardenafil	TRC	H995300	1-ARD-6-3	98,0
27.	Imidazosagatriazinone	TRC	E892725	1-ALB-8-1	95,0
28.	Isosildenafil	TRC	I900800	9-SBT-86-1	98,0
29.	MDLenafil carbonate	TRC	L469300	13-KSS-45-2	96,0
30.	Mirodenafil	LGC	C15271500	1359158	99,1
31.	Mutaprodenafil	TRC	TRC-M820000	16-VKU-117-6	98,0
32.	N-Desethylvardenafil	TRC	D289950	3-JQW-50-2	97,0
33.	N-Desmethylsildenafil	TRC	D292205	4-ARD-152-1	98,0
34.	N-Octylnortadalafil	TRC	O241350	1-HPA-15-4	96,0
35.	Nitrodenafil	TRC	N493770	7-GJF-128-1	98,0
36.	Noracetildenafil	TRC	N660500	1-AMR-21-1	98,0
37.	Norneosildenafil	TRC	N824300	1-GAB-99-4	98,0
38.	Norneovardenafil	TRC	N824500	3-LXS-59-2	96,0
39.	Nortadalafil	LGC	C15651900	1296838	95,0
40.	O-desethyl-o-propyl sildenafil	TRC	D289605	1-URV-77-1	98,0
41.	Piperazonifil	TRC	P480470	1-ZIW-178-1	95,0
42.	Piperiacetildenafil	TRC	P481480	4-APK-41-1	98,0
43.	Propoxyphenyl aildenafil	TRC	D289495	1-PRB-41-2	98,0
44.	Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil	TRC	P831600	4-LIJ-133-4	98,7
45.	Propoxyphenylthio-hydroxyhomosildenafil	TRC	P831635	3-KHI-18-2	99,5
46.	Pseudovardenafil	TRC	P839615	1-GAT-28-4	98,0
47.	Sildenafil	TRC	S435001	15-ABY-7-1-PFZ	98,0
48.	Sildenafil N-oxide	TRC	S435035	1-LUH-175-4	99,5
49.	Tadalafil	TRC	T004500	3-SXG-103-1	96,0
50.	Thioaildenafil	TRC	T344365	1-JMS-114-1	98,0

TT	Tên chất	Hãng cung cấp	Code	Số lô	Độ tinh khiết (%)
51.	Thiohomosildenafil	TRC	T344470	4-TVP-157-11	98,0
52.	Udenafil	TRC	U250500	1-CWA-163-2	96,0
53.	Vardenafil	TRC	V098002	9-SWZ-36-1	98,0
<i>Nhóm chất hỗ trợ giảm cân</i>					
54.	Sibutramine hydrochloride	TRC	S422500	1-DXX-80-1	98,0
55.	Desmethylsibutramine	TRC	D292171	11-MJK-58-2	98,0
56.	Didesmethylsibutramine	TRC	D441165	1-THT-94-4	98,0
57.	Fenfluramine hydrochloride	LGC	LGCFOR0608.00	1075687	99,6
58.	Phenylpropanolamine hydrochloride	Mikromo 1	MM0656.00-0250	G1016222	99,7
59.	Loperamid hydrochloride	LGC	LGCFOR0025.00	18718	99,7
<i>Nhóm chất hỗ trợ tiêu đường</i>					
60.	Metformin hydrochloride	LGC	LGCFOR0056.00	1245687	99,1
61.	Phenformin hydrochloride	LGC	LGCFOR1574.00	44038	98,8
62.	Buformin hydrochloride	LGC	DRE-C10831000	1376215	99,1
63.	Glibenclamide	LGC	DRE-C14025000	G1304029	99,2
64.	Gliclazide	LGC	DRE-C14025500	G1260428	99,9

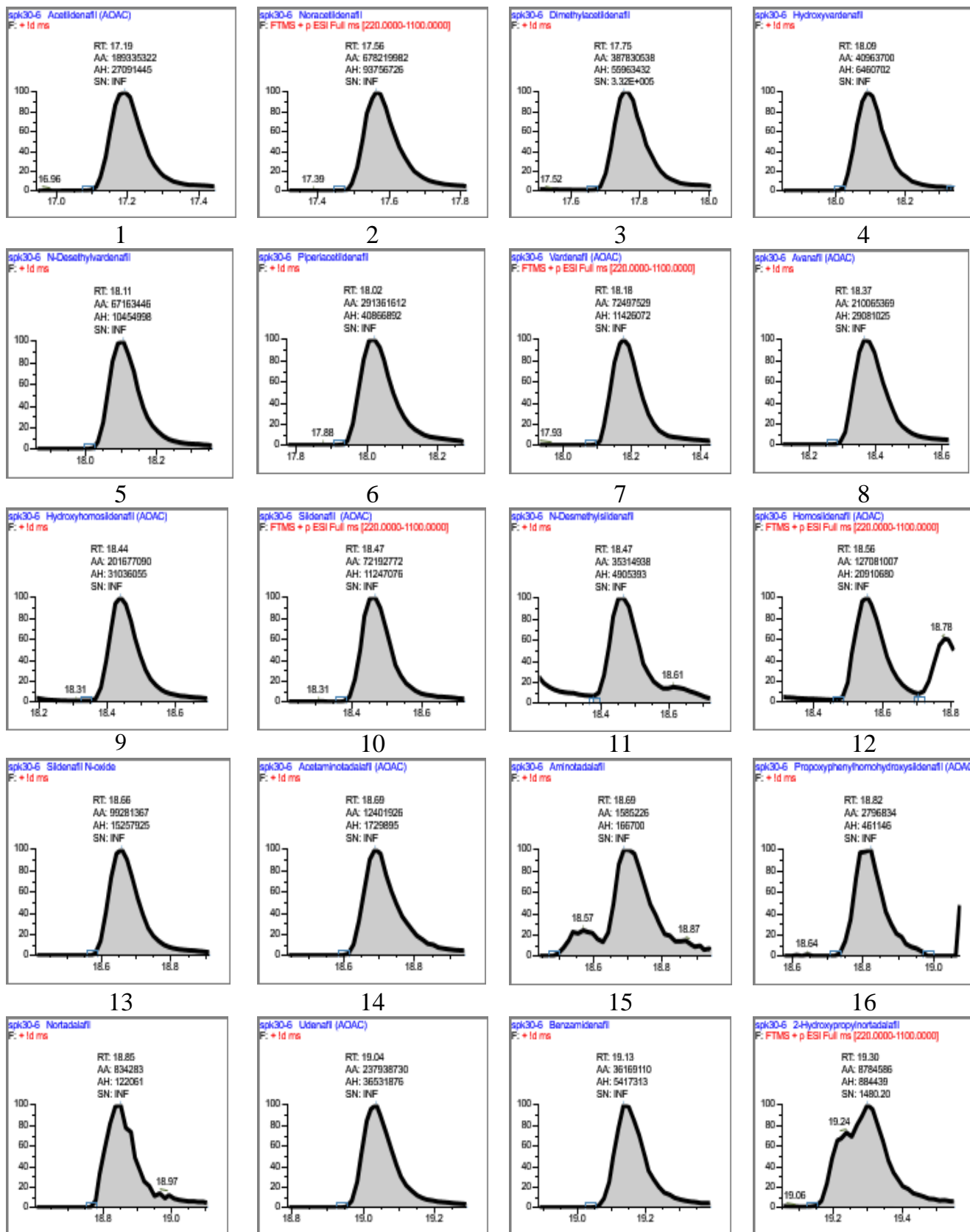
Ghi chú: TRC: Toronto reseach chemicals

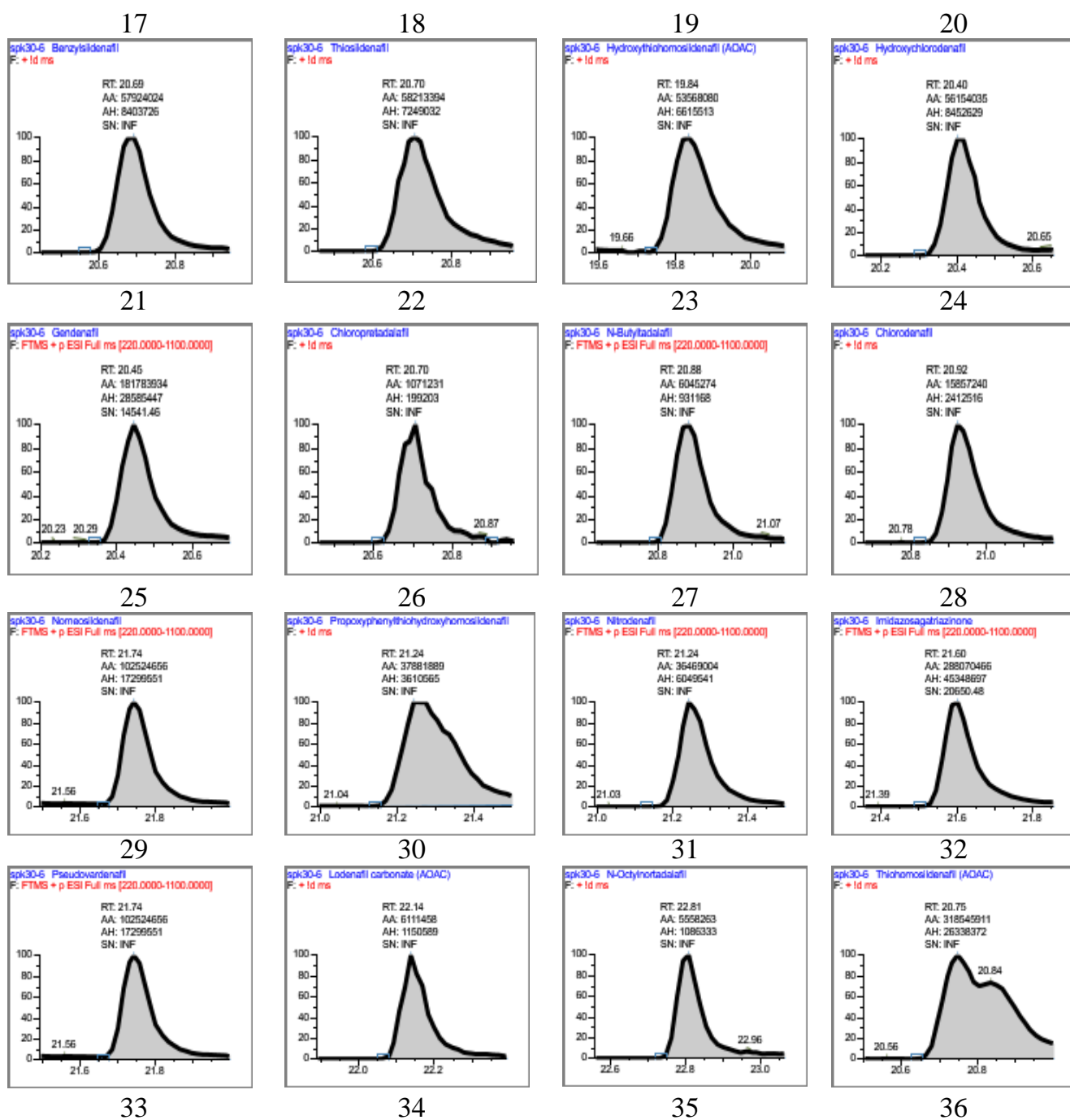
Phụ lục 2. Thông tin của mẫu thu thập trong nghiên cứu

Bảng PL 2. Mã hóa mẫu thu thập trong nghiên cứu

Nhóm chất phân tích	Tổng số mẫu	TT	Mã mẫu	Dạng bào chế
Chất hỗ trợ chức năng sinh lý	92	1	SL.01 - SL.31	Dạng nang cứng
		2	SL.32 - SL.62	Dạng nang mềm
		3	SL.63 - SL.92	Dạng bột dược liệu
Chất hỗ trợ giảm cân	30	1	GC.01 - GC.10	Dạng nang cứng
		2	GC.11 - GC.20	Dạng nang mềm
		3	GC.21 - GC.30	Trà giảm cân
Chất hỗ trợ tiểu đường	30	1	TĐ.01 - TĐ.10	Dạng nang cứng
		2	TĐ.11 - TĐ.20	Dạng nang mềm
		3	TĐ.21 - TĐ.30	Dạng lỏng

Phụ lục 3. Sắc kí đồ chất phân tích nhóm PDE-5i bằng LC-MS/MS





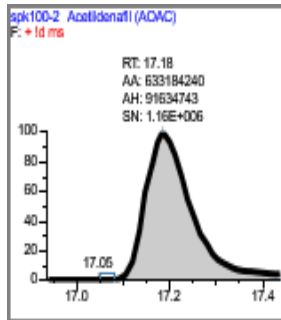
Hình PL 3.1. Một số sắc ký đồ thẩm định tại nồng độ 30 ng/mL của các chất:

- | | | |
|--------------------------|---|---|
| 1: Acetildenafil | 13: Sildenafil N-oxide | 25: Gendenafil |
| 2: Noracetildenafil | 14: Acetaminotadafil | 26: Chloropretadafil |
| 3: Dimethylacetildenafil | 15: Aminotadafil | 27: N-Butyladafil |
| 4: Hydroxyvardanafil | 16: Propoxyphenyl-
homohydroxysildenafil | 28: Chlorodanafil |
| 5: N-Desethylvardanafil | 17: Nortadafil | 29: Norneosildenafil |
| 6: Piperiacetildenafil | 18: Udenafil | 30: Propoxyphenylthio-
hydroxyhomosildenafil |

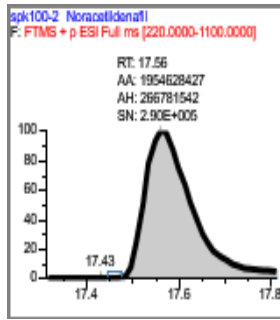
- 7: Vardenafil
- 8: Avanafil
- 9: Hydroxyhomosildenafil
- 10: Sildenafil
- 11: N-Desmethylsildenafil
- 12: Homosildenafil

- 19: Benzamidenafil
- 20: 2-Hydroxypropyl nortadalafil
- 21: Benzylsildenafil
- 22: Thioaildenafil
- 23: Hydroxythio-homosildenafil
- 24: Hydroxychlorodenafil

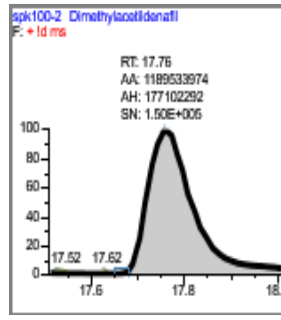
- 31: Nitrodenafil
- 32: Imidazosagatriazinone
- 33: Pseudovardenafil
- 34: Lodenafil carbonate
- 35: N-Octylnortadalafil
- 36: Thiohomosildenafil



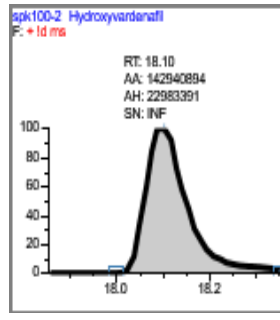
1



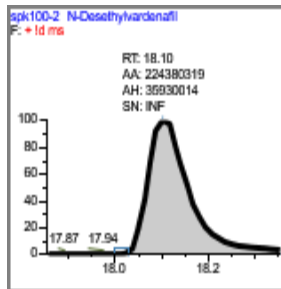
2



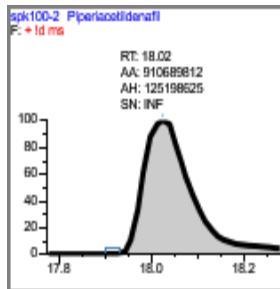
3



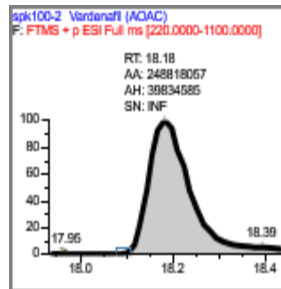
4



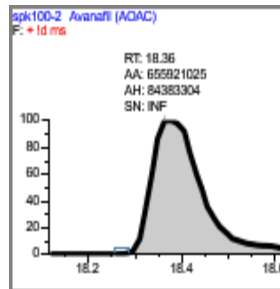
5



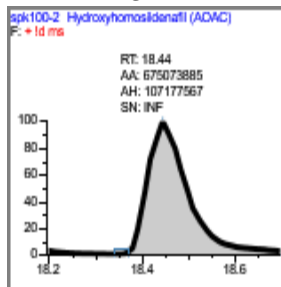
6



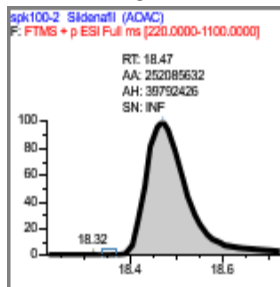
7



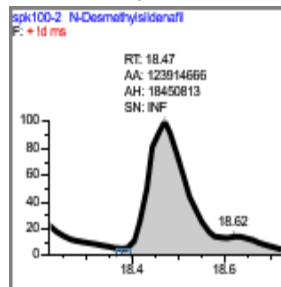
8



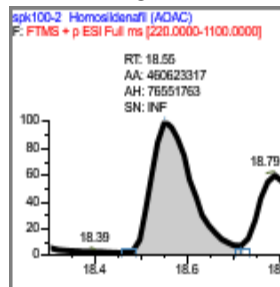
9



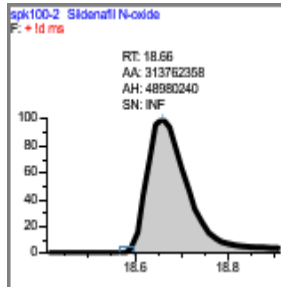
10



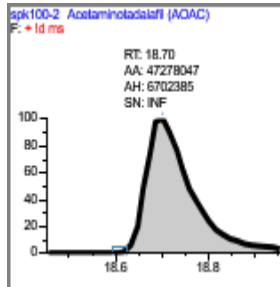
11



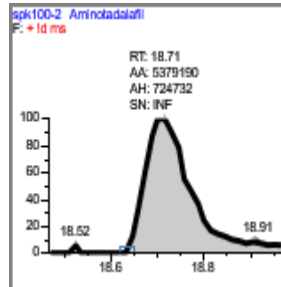
12



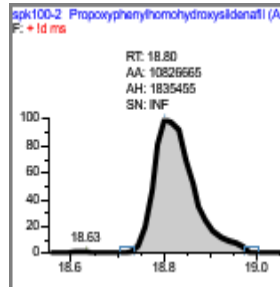
13



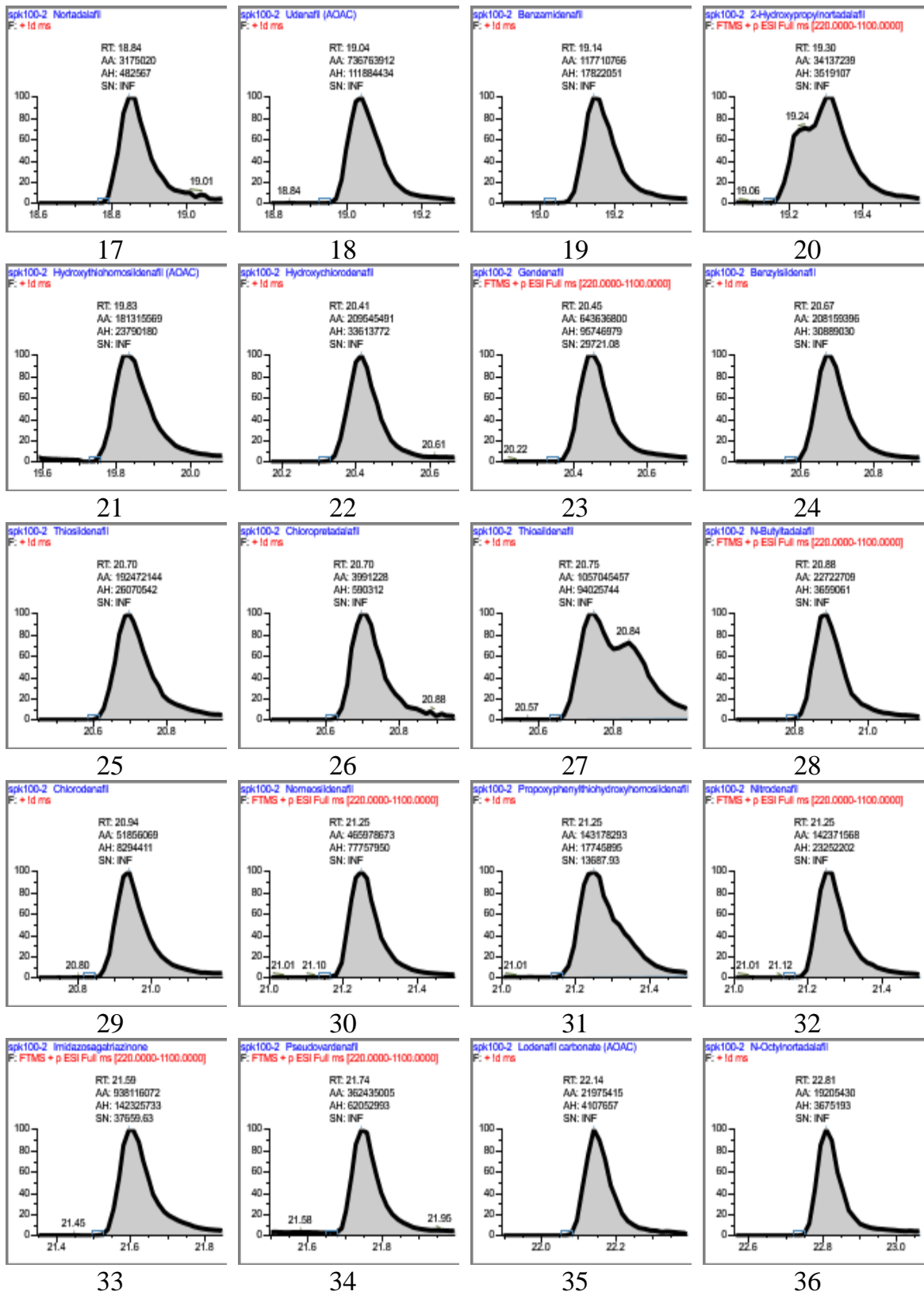
14



15

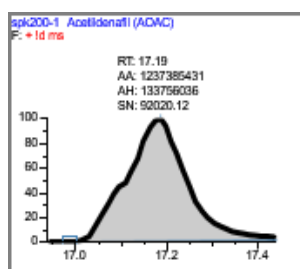


16

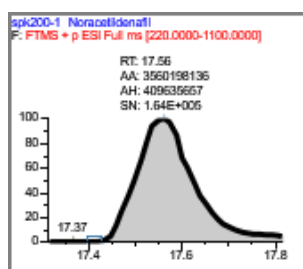


Hình PL 3.2. Một số sắc ký đồ thẩm định tại nồng độ 100 ng/mL của các chất sau:

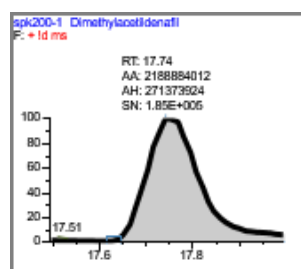
- | | | |
|---------------------------|---|---|
| 1: Acetildenafil | 13: Sildenafil N-oxide | 25: Gendenafil |
| 2: Noracetildenafil | 14: Acetaminotadalafil | 26: Chloropretadalafil |
| 3: Dimethylacetildenafil | 15: Aminotadalafil | 27: N-Butyladalafil |
| 4: Hydroxyvarndenafil | 16: Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil | 28: Chlorodenafil |
| 5: N-Desethylvarndenafil | 17: Nortadalafil | 29: Norneosildenafil |
| 6: Piperiacetildenafil | 18: Udenafil | 30: Propoxyphenylthio-hydroxyhomosildenafil |
| 7: Vardenafil | 19: Benzamidenafil | 31: Nitrodenafil |
| 8: Avanafil | 20: 2-Hydroxypropyl nortadalafil | 32: Imidazosagatriazinone |
| 9: Hydroxyhomosildenafil | 21: Benzylsildenafil | 33: Pseudovardenafil |
| 10: Sildenafil | 22: Thioaildenafil | 34: Lodenafil carbonate |
| 11: N-Desmethylsildenafil | 23: Hydroxythio-homosildenafil | 35: N-Octylnortadalafil |
| 12: Homosildenafil | 24: Hydroxychlorodenafil | 36: Thiohomosildenafil |



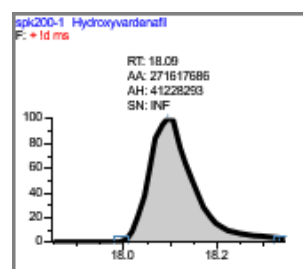
1



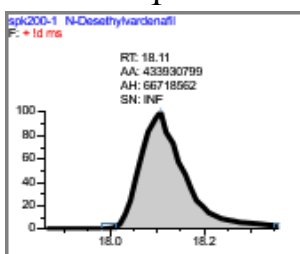
2



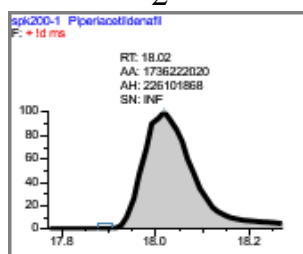
3



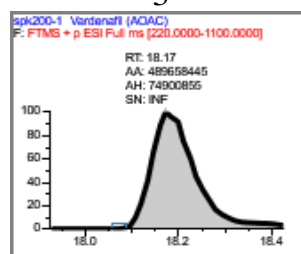
4



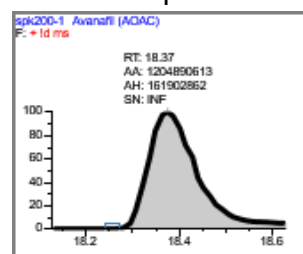
5



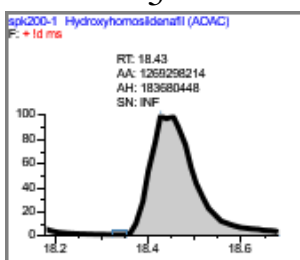
6



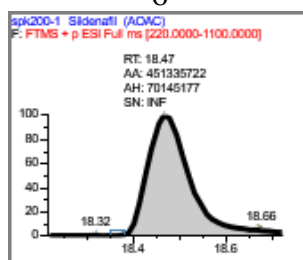
7



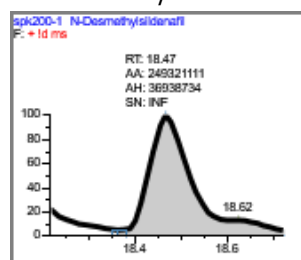
8



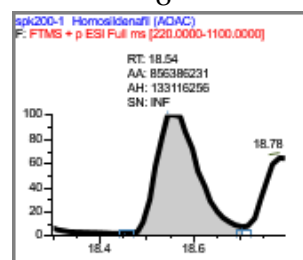
9



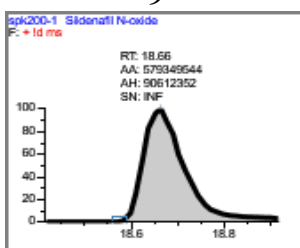
10



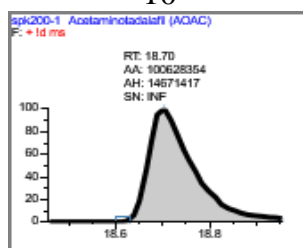
11



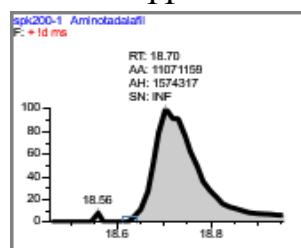
12



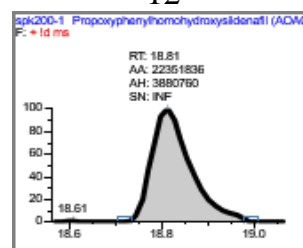
13



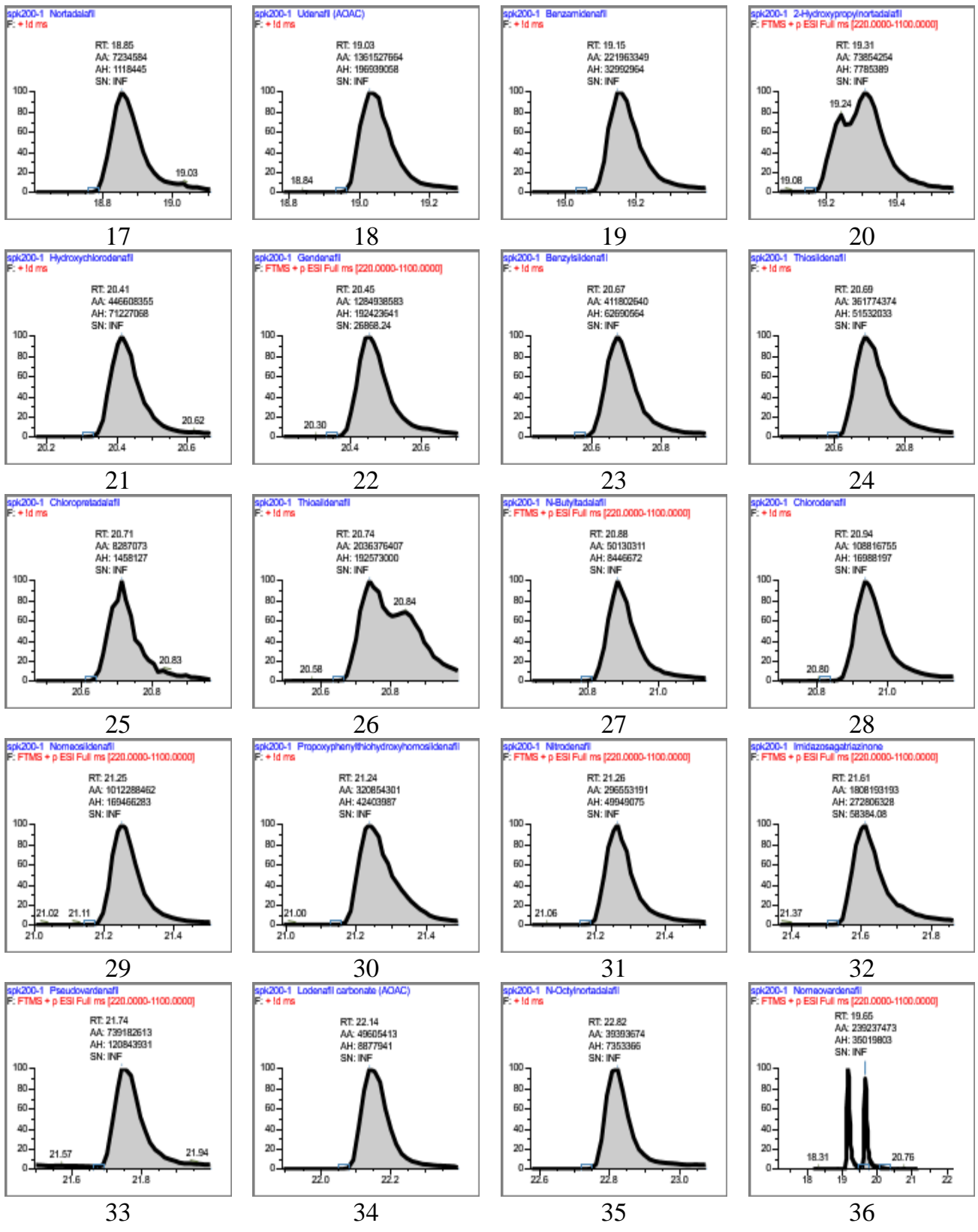
14



15



16



Hình PL 3.3. Một số sắc ký đồ thẩm định tại nồng độ 200 ng/mL của các chất sau:

- | | | |
|---------------------------|---|---|
| 1: Acetildenafil | 13: Sildenafil N-oxide | 25: Gendenafil |
| 2: Noracetildenafil | 14: Acetaminotaladafil | 26: Chloropretadalafil |
| 3: Dimethylacetildenafil | 15: Aminotaladafil | 27: N-Butyladalafil |
| 4: Hydroxyvardenafil | 16: Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil | 28: Chlorodenafil |
| 5: N-Desethylvardenafil | 17: Nortadalafil | 29: Norneosildenafil |
| 6: Piperiacetildenafil | 18: Udenafil | 30: Propoxyphenylthio-hydroxyhomosildenafil |
| 7: Vardenafil | 19: Benzamidenafil | 31: Nitrodenafil |
| 8: Avanafil | 20: 2-Hydroxypropyl nortadalafil | 32: Imidazosagatriazinone |
| 9: Hydroxyhomosildenafil | 21: Benzylsildenafil | 33: Pseudovardenafil |
| 10: Sildenafil | 22: Thioaildenafil | 34: Lodenafil carbonate |
| 11: N-Desmethylsildenafil | 23: Hydroxythio-homosildenafil | 35: N-Octylnortadalafil |
| 12: Homosildenafil | 24: Hydroxychlorodenafil | 36: Thiohomosildenafil |

Bảng PL 3.1. Độ lặp lại và độ thu hồi của 2-Hydroxypropyl nortadalafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/mL)	R%	RSD _r %	C (µg/mL)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,4	94,6	11,8	33,0	110	8,16
spk-30-2	24,4	81,2		30,6	102	
spk-30-3	30,6	102		32,7	109	
spk-30-4	32,4	108		32,1	107	
spk-30-5	24,6	82,1		27,0	90,0	
spk-30-6	26,3	87,5		28,2	94,0	
spk100-1	103	103	9,54	90,2	90,2	7,48
spk100-2	80,0	80,0		82,8	82,8	
spk100-3	80,4	80,4		93,9	93,9	
spk100-4	87,4	87,4		92,2	92,2	
spk100-5	91,0	91,0		103,4	103	
spk100-6	89,8	89,8		88,2	88,2	
spk200-1	185	92,7	7,74	202	101	10,4
spk200-2	188	93,9		218	109	
spk200-3	190	95,1		180	90,0	
spk200-4	218	109		216	108	
spk200-5	216	108		182	91,0	
spk200-6	187	93,5		170	85,0	

Bảng PL 3.2. Độ lặp lại và độ thu hồi của Acetaminotadalafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	26,1	87,1	2,81	32,4	108	10,6
spk-30-2	25,6	85,3		27,8	92,8	
spk-30-3	27,2	90,8		24,7	82,4	
spk-30-4	25,3	84,3		25,1	83,6	
spk-30-5	26,8	89,3		25,9	86,3	
spk-30-6	25,9	86,4		29,0	96,5	
spk100-1	87,7	87,7	4,12	88,2	88,2	3,61
spk100-2	84,8	84,8		82,1	82,1	
spk100-3	93,2	93,2		81,4	81,4	
spk100-4	92,7	92,7		86,6	86,6	
spk100-5	93,4	93,4		87,1	87,1	
spk100-6	93,7	93,7		88,4	88,4	
spk200-1	177	88,5	9,51	187	93,6	8,70
spk200-2	179	89,4		169	84,5	
spk200-3	164	82,0		174	86,9	
spk200-4	180	90,0		210	105	
spk200-5	216	108		198	99,0	
spk200-6	188	93,9		204	102	

Bảng PL 3.3. Độ lặp lại và độ thu hồi của Acetil acid

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	25,3	84,2	5,64	32,7	109	6,54
spk-30-2	25,1	83,6		31,5	105	
spk-30-3	27,2	90,6		29,3	97,8	
spk-30-4	25,6	85,2		32,1	107	
spk-30-5	28,9	96,4		28,4	94,8	
spk-30-6	27,2	90,5		28,1	93,6	
spk100-1	86,0	86,0	6,87	107	107	10,4
spk100-2	87,1	87,1		81,5	81,5	
spk100-3	81,6	81,6		85,4	85,4	
spk100-4	89,5	89,5		86,3	86,3	
spk100-5	88,9	88,9		85,4	85,4	
spk100-6	99,9	99,9		94,8	94,8	
spk200-1	196	98,1	10,2	175	87,3	9,05
spk200-2	163	81,7		200	99,9	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk200-3	218	109		160	80,2	
spk200-4	202	101		202	101	
spk200-5	192	96,0		194	96,9	
spk200-6	218	109		200	100	

Bảng PL 3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi của Acetildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	25,5	84,9	11,0	29,7	99,0	8,29
spk-30-2	24,2	80,6		27,2	90,7	
spk-30-3	27,5	91,7		32,7	109	
spk-30-4	29,7	98,9		29,1	96,9	
spk-30-5	32,7	109		31,8	106	
spk-30-6	26,9	89,8		26,5	88,4	
spk100-1	103	103	4,19	107	107	9,76
spk100-2	99,5	99,5		89,0	89,0	
spk100-3	100	100		91,2	91,2	
spk100-4	103	103		87,3	87,3	
spk100-5	91,9	91,9		85,4	85,4	
spk100-6	102	102		104	104	
spk200-1	185	92,7	7,54	202	101	7,21
spk200-2	197	98,6		218	109	
spk200-3	202	101		193	96,4	
spk200-4	204	102		214	107	
spk200-5	192	96,0		182	91,2	
spk200-6	165	82,5		218	109	

Bảng PL 3.5. Độ lặp lại và độ thu hồi của Acetylvardenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,3	101	8,28	31,8	106	8,26
spk-30-2	24,9	83,0		27,2	90,5	
spk-30-3	25,2	84,1		32,7	109	
spk-30-4	29,6	98,7		27,7	92,2	
spk-30-5	26,8	89,4		32,4	108	
spk-30-6	28,7	95,7		28,95	96,5	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk100-1	83,9	83,9	3,97	94,9	94,9	7,40
spk100-2	86,8	86,8		85,9	85,9	
spk100-3	89,7	89,7		82,7	82,7	
spk100-4	94,5	94,5		81,4	81,4	
spk100-5	89,9	89,9		92,8	92,8	
spk100-6	89,2	89,2		96,8	96,8	
spk200-1	182	91,2	11,0	179	89,3	5,51
spk200-2	164	81,8		183	91,6	
spk200-3	163	81,6		190	94,9	
spk200-4	212	106		200	100	
spk200-5	204	102		202	101	
spk200-6	196	97,9		204	102	

Bảng PL 3.6. Độ lặp lại và độ thu hồi của Aminotadalafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	8,38	28,3	94,3	7,03
spk-30-2	25,6	85,4		24,1	80,2	
spk-30-3	28,1	93,6		25,1	83,7	
spk-30-4	29,5	98,3		26,4	87,9	
spk-30-5	32,4	108		27,5	91,8	
spk-30-6	28,5	95,1		28,9	96,3	
spk100-1	106	106	9,07	88,0	88,0	8,54
spk100-2	92,7	92,7		98,7	98,7	
spk100-3	108	108		107	107	
spk100-4	85,9	85,9		102	102	
spk100-5	97,3	97,3		92,0	92,0	
spk100-6	107	107		110	110	
spk200-1	186	92,9	10,8	197	98,5	8,86
spk200-2	166	83,1		172	86,2	
spk200-3	164	82,0		214	107	
spk200-4	160	80,1		180	90,1	
spk200-5	168	83,9		202	101	
spk200-6	210	105		174	87,2	

Bảng PL 3.7. Độ lặp lại và độ thu hồi của Avanafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/mL}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	29,8	99,3	11,7	31,2	104	9,32
spk-30-2	24,1	80,4		24,3	80,9	
spk-30-3	26,6	88,7		31,2	104	
spk-30-4	28,5	95,0		30,3	101	
spk-30-5	32,4	108		27,8	92,6	
spk-30-6	33,0	110		28,0	93,3	
spk100-1	98,2	98,2	7,26	104	104	11,9
spk100-2	96,5	96,5		90,8	90,8	
spk100-3	86,8	86,8		80,6	80,6	
spk100-4	97,8	97,8		84,7	84,7	
spk100-5	96,1	96,1		90,3	90,3	
spk100-6	109	109		109	109	
spk200-1	171	85,6	8,03	178	89,0	3,45
spk200-2	185	92,5		179	89,5	
spk200-3	180	89,9		174,4	87,2	
spk200-4	195	97,5		188,8	94,4	
spk200-5	212	106		187,4	93,7	
spk200-6	204	102		188,6	94,3	

Bảng PL 3.8. Độ lặp lại và độ thu hồi của Benzamidenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	25,3	84,4	4,74	28,5	95,1	3,86
spk-30-2	27,5	91,5		26,3	87,7	
spk-30-3	25,0	83,2		27,1	90,2	
spk-30-4	27,7	92,2		26,5	88,3	
spk-30-5	28,0	93,2		27,5	91,6	
spk-30-6	26,6	88,8		28,9	96,3	
spk100-1	100	100	6,85	93,2	93,2	8,53
spk100-2	92,6	92,6		89,1	89,1	
spk100-3	92,9	92,9		86,1	86,1	
spk100-4	93,7	93,7		102	102	
spk100-5	84,5	84,5		108	108	
spk100-6	103	103		97,1	97,1	
spk200-1	200	100	8,40	202	101	9,47

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk200-2	170	85,2		175	87,5	
spk200-3	173	86,6		176	88,1	
spk200-4	193	96,3		168	84,2	
spk200-5	160	80,0		193	96,3	
spk200-6	187	93,7		214	107	

Bảng PL 3.9. Độ lặp lại và độ thu hồi của Benzylsildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	33	110	11,5	29,5	98,3	5,94
spk-30-2	27,3	90,9		28,1	93,8	
spk-30-3	26,2	87,2		31,8	106	
spk-30-4	26,4	88,1		28,6	95,4	
spk-30-5	26,2	87,3		28,9	96,3	
spk-30-6	32,7	109		32,4	108	
spk100-1	91,6	91,6	2,92	93,2	93,2	6,22
spk100-2	98,8	98,8		80,3	80,3	
spk100-3	92,2	92,2		84,5	84,5	
spk100-4	96,2	96,2		94,7	94,7	
spk100-5	92,8	92,8		88,3	88,3	
spk100-6	94,8	94,8		91,5	91,5	
spk200-1	184	91,8	8,79	167	83,7	6,63
spk200-2	167	83,3		190	95,0	
spk200-3	179	89,3		164	82,2	
spk200-4	208	104		180	89,9	
spk200-5	174	86,8		184	91,9	
spk200-6	202	101		162	80,9	

Bảng PL 3.10. Độ lặp lại và độ thu hồi của Carbodenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	27,0	89,9	8,70	24,3	81,1	5,43
spk-30-2	28,2	93,9		24,9	83,0	
spk-30-3	26,3	87,6		27,1	90,3	
spk-30-4	30,3	101		26,1	87,1	
spk-30-5	33,0	110		26,3	87,6	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-6	27,7	92,2		28,2	94,1	
spk100-1	98,0	98,0	8,02	88,6	88,6	7,33
spk100-2	99,3	99,3		93,4	93,4	
spk100-3	98,8	98,8		100	100	
spk100-4	107	107		109	109	
spk100-5	83,5	83,5		95,2	95,2	
spk100-6	102	102		102	102	
spk200-1	175	87,3	10,4	193	96,5	7,11
spk200-2	171	85,6		218	109	
spk200-3	197	98,3		185	92,5	
spk200-4	217	109		181	90,5	
spk200-5	166	83,1		191	95,3	
spk200-6	193	96,5		206	103	

Bảng PL 3.11. Độ lặp lại và độ thu hồi của Chlorodenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	27,5	91,5	4,40	27,9	93,1	6,06
spk-30-2	30,6	102		29,5	98,2	
spk-30-3	30,0	100		28,7	95,8	
spk-30-4	28,1	93,5		32,7	109	
spk-30-5	27,8	92,8		31,5	105	
spk-30-6	29,0	96,7		29,1	97,1	
spk100-1	84,5	84,5	11,3	95,2	95,2	7,73
spk100-2	85,2	85,2		90,4	90,4	
spk100-3	97,5	97,5		107	107	
spk100-4	81,5	81,5		98,2	98,2	
spk100-5	108	108		110	110	
spk100-6	100	99,6		107	107	
spk200-1	182	91,2	6,25	179	89,4	6,60
spk200-2	197	98,6		162	80,8	
spk200-3	202	101		196	98,0	
spk200-4	212	106		184	91,8	
spk200-5	183	91,7		174	87,0	
spk200-6	185	92,3		188	94,0	

Bảng PL 3.12. Độ lặp lại và độ thu hồi của Chloropretadalafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,6	102	10,6	27,8	92,7	7,36
spk-30-2	29,8	99,2		30,6	102	
spk-30-3	28,1	93,5		29,0	96,7	
spk-30-4	32,1	107		31,2	104	
spk-30-5	25,4	84,7		26,9	89,7	
spk-30-6	24,5	81,5		32,7	109	
spk100-1	84,5	84,5	8,74	105	105	6,79
spk100-2	88,3	88,3		98,2	98,2	
spk100-3	103	103		104	104	
spk100-4	81,5	81,5		91,5	91,5	
spk100-5	94,0	94,0		88,4	88,4	
spk100-6	96,0	96,0		99,1	99,1	
spk200-1	167	83,7	8,48	188	94,2	8,19
spk200-2	200	100		171	85,6	
spk200-3	191	95,6		206	103	
spk200-4	192	95,9		192	95,8	
spk200-5	218	109		218	109	
spk200-6	200	99,8		199	99,5	

Bảng PL 3.13. Độ lặp lại và độ thu hồi của Cyclopentylnafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	33,0	110	5,28	24,9	82,9	8,55
spk-30-2	30,3	101		24,1	80,2	
spk-30-3	29,0	96,7		25,9	86,3	
spk-30-4	29,4	98,1		24,8	82,5	
spk-30-5	32,1	107		29,5	98,2	
spk-30-6	29,6	98,6		28,7	95,6	
spk100-1	107	107	8,22	99,6	99,6	5,75
spk100-2	92,6	92,6		103	103	
spk100-3	102	102		94,5	94,5	
spk100-4	87,6	87,6		90,7	90,7	
spk100-5	91,7	91,7		102	102	
spk100-6	105	105		106	106	
spk200-1	206	103	7,03	183	91,4	12,4

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-2	204	102		210	105	
spk200-3	197	98,4		162	80,9	
spk200-4	208	104		220	110	
spk200-5	176	88,0		214	107	
spk200-6	181	90,3		174	87,1	

Bảng PL 3.14. Độ lặp lại và độ thu hồi của Depiperazino-thiosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	10,5	25,5	85,1	5,34
spk-30-2	31,8	106		24,0	80,1	
spk-30-3	28,53	95,1		28,2	94,1	
spk-30-4	29,37	97,9		25,4	84,7	
spk-30-5	25,71	85,7		26,3	87,8	
spk-30-6	24,45	81,5		26,3	87,7	
spk100-1	95,4	95,4	5,41	110	110	6,74
spk100-2	105	105		109	109	
spk100-3	96,3	96,3		108	108	
spk100-4	93,7	93,7		104	104	
spk100-5	95,9	95,9		94,4	94,4	
spk100-6	106	106		95,3	95,3	
spk200-1	220	110	6,08	198	99,0	5,51
spk200-2	214	107		190	94,8	
spk200-3	188	93,8		206	103	
spk200-4	218	109		214	107	
spk200-5	202	101		208	104	
spk200-6	200	99,9		186	92,9	

Bảng PL 3.15. Độ lặp lại và độ thu hồi của Descarbonsildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	32,1	107	10,9	24,7	82,2	5,98
spk-30-2	26,6	88,7		27,1	90,4	
spk-30-3	30,3	101		28,2	94,1	
spk-30-4	24,5	81,5		29,0	96,8	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-5	32,7	109	8,80	28,7	95,7	9,08
spk-30-6	29,8	99,3		26,6	88,5	
spk100-1	102	102		99,8	99,8	
spk100-2	86,5	86,5		100	100	
spk100-3	109	109		107	107	
spk100-4	92,5	92,5		80,6	80,6	
spk100-5	104	104	96,2	96,2		
spk100-6	107	107	98,2	98,2		
spk200-1	204	102	6,73	199	99,7	8,88
spk200-2	190	95,1		170	85,2	
spk200-3	194	96,9		208	104	
spk200-4	175	87,6		218	109	
spk200-5	193	96,5		183	91,3	
spk200-6	214	107		204	102	

Bảng PL 3.16. Độ lặp lại và độ thu hồi của *Desmethyl fondenafil*

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,3	101	7,55	25,1	83,6	7,13
spk-30-2	32,4	108		24,7	82,3	
spk-30-3	29,8	99,2		25,3	84,2	
spk-30-4	30,3	101		24,0	80,1	
spk-30-5	25,7	85,8		28,9	96,2	
spk-30-6	31,2	104		27,4	91,3	
spk100-1	84,5	84,5	7,20	100	100	8,03
spk100-2	97,8	97,8		95,3	95,3	
spk100-3	92,7	92,7		96,0	96,0	
spk100-4	87,4	87,4		109	109	
spk100-5	80,9	80,9		89,6	89,6	
spk100-6	94,6	94,6		87,5	87,5	
spk200-1	198	99,2	8,14	163	81,6	4,89
spk200-2	212	106		166	83,1	
spk200-3	204	102		181	90,4	
spk200-4	174	87,1		169	84,3	
spk200-5	204	102		179	89,6	
spk200-6	176	88,0		161	80,5	

Bảng PL 3.17. Độ lặp lại và độ thu hồi của Dimethylacetildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	32,1	107	9,05	24,8	82,8	8,26
spk-30-2	25,7	85,5		27,7	92,2	
spk-30-3	30,0	100		30,6	102	
spk-30-4	27,9	93,1		24,9	83,1	
spk-30-5	25,6	85,2		28,0	93,4	
spk-30-6	27,5	91,8		29,0	96,6	
spk100-1	105	105	11,3	94,1	94,1	9,48
spk100-2	81,8	81,8		86,1	86,1	
spk100-3	84,1	84,1		81,5	81,5	
spk100-4	103	103		104	104	
spk100-5	92,4	92,4		102	102	
spk100-6	83,0	83,0		98,2	98,2	
spk200-1	210	105	8,78	214	107	7,44
spk200-2	204	102		206	103	
spk200-3	190	95,0		184	92,2	
spk200-4	208	104		183	91,7	
spk200-5	180	90,1		194	97,2	
spk200-6	168	83,9		218	109	

Bảng PL 3.18. Độ lặp lại và độ thu hồi của Dimethylsildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,7	95,5	5,65	26,9	89,6	4,96
spk-30-2	32,4	108		29,6	98,8	
spk-30-3	29,5	98,2		30,3	101	
spk-30-4	32,7	109		26,9	89,6	
spk-30-5	29,2	97,2		28,4	94,7	
spk-30-6	30,3	101		28,0	93,4	
spk100-1	94,2	94,2	6,80	108	108	5,55
spk100-2	91,5	91,5		110	110	
spk100-3	81,6	81,6		98,5	98,5	
spk100-4	100	100		107	107	
spk100-5	92,5	92,5		97,2	97,2	
spk100-6	87,7	87,7		98,5	98,5	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk200-1	202	101	6,08	199	100	3,72
spk200-2	183	91,7		192	96,0	
spk200-3	194	97,2		200	100	
spk200-4	210	105		194	97,1	
spk200-5	216	108		202	101	
spk200-6	192	95,8		182	91,1	

Bảng PL 3.19. Độ lặp lại và độ thu hồi của Gildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,6	95,2	4,93	26,7	88,9	4,75
spk-30-2	30,3	101		27,2	90,7	
spk-30-3	29,0	96,7		25,9	86,3	
spk-30-4	29,4	98,1		27,8	92,8	
spk-30-5	32,7	109		29,5	98,2	
spk-30-6	29,6	98,6		28,7	95,6	
spk100-1	107	107	8,22	85,3	85,3	10,3
spk100-2	92,6	92,6		106	106	
spk100-3	102	102		95,1	95,1	
spk100-4	87,6	87,6		97,9	97,9	
spk100-5	91,7	91,7		85,5	85,5	
spk100-6	105	105		81,1	81,1	
spk200-1	206	103	7,03	191	95,4	4,56
spk200-2	204	102		190	95,1	
spk200-3	197	98,4		193	96,3	
spk200-4	208	104		202	101	
spk200-5	176	88,0		190	95,0	
spk200-6	181	90,3		212	106	

Bảng PL 3.20. Độ lặp lại và độ thu hồi của Homosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	10,5	25,53	85,1	5,34
spk-30-2	31,8	106		24,03	80,1	
spk-30-3	28,5	95,1		28,23	94,1	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-4	29,4	97,9		25,41	84,7	
spk-30-5	25,7	85,7		26,34	87,8	
spk-30-6	24,5	81,5		26,31	87,7	
spk100-1	95,4	95,4	4,68	110	110	7,06
spk100-2	95,5	95,5		109	109	
spk100-3	96,3	96,3		95,8	95,8	
spk100-4	103	103		104	104	
spk100-5	95,9	95,9		94,4	94,4	
spk100-6	106	106		95,3	95,3	
spk200-1	220	110	11,8	198	99,0	5,51
spk200-2	214	107		190	94,8	
spk200-3	177	88,3		206	103	
spk200-4	218	109		214	107	
spk200-5	164	81,9		208	104	
spk200-6	200	99,9		185,8	92,9	

Bảng PL 3.21. Độ lặp lại và độ thu hồi của Hydroxyacetildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	32,1	107	8,19	24,7	82,2	8,49
spk-30-2	26,6	88,6		27,1	90,4	
spk-30-3	30,3	101		27,0	90,1	
spk-30-4	27,5	91,5		29,0	96,8	
spk-30-5	32,7	109		31,5	105	
spk-30-6	29,8	99,3		26,6	88,5	
spk100-1	102	102	10,2	99,8	99,8	9,26
spk100-2	96,2	96,2		90,1	90,1	
spk100-3	109	109		107	107	
spk100-4	82,4	82,4		86,6	86,6	
spk100-5	94,7	94,7		106	106	
spk100-6	109	109		108	108	
spk200-1	204	102	6,73	199	99,5	8,47
spk200-2	190	95,1		210	105	
spk200-3	194	96,9		168	84,2	
spk200-4	175	87,6		180	89,9	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-5	193	96,5		182	91,2	
spk200-6	214	107		204	102	

Bảng PL 3.22. Độ lặp lại và độ thu hồi của Hydroxychlorodenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,3	101	7,55	25,1	83,6	9,73
spk-30-2	32,4	108		30,9	103	
spk-30-3	29,8	99,2		25,3	84,2	
spk-30-4	30,3	101		24,0	80,1	
spk-30-5	25,7	85,8		28,9	96,2	
spk-30-6	31,2	104		27,4	91,3	
spk100-1	94,5	94,5	8,91	100	100	8,03
spk100-2	97,8	97,8		95,3	95,3	
spk100-3	92,7	92,7		96	96,0	
spk100-4	107	107		109	109	
spk100-5	80,9	80,9		89,6	89,6	
spk100-6	94,6	94,6		87,5	87,5	
spk200-1	198	99,2	8,14	163	81,6	9,67
spk200-2	212	106		166	83,1	
spk200-3	204	102		181	90,4	
spk200-4	174	87,1		169	84,3	
spk200-5	204	102		179	89,6	
spk200-6	176	88,0		210	105	

Bảng PL 3.23. Độ lặp lại và độ thu hồi của Hydroxyhomosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	32,1	107	8,57	24,8	82,8	9,75
spk-30-2	25,7	85,5		27,7	92,2	
spk-30-3	30,0	100		24,8	82,6	
spk-30-4	28,1	93,7		27,9	93,1	
spk-30-5	28,7	95,7		28,0	93,4	
spk-30-6	26,0	86,7		32,1	107	
spk100-1	105	105	11,3	94,5	94,5	9,17

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk100-2	81,8	81,8		106	106	
spk100-3	84,1	84,1		81,6	81,6	
spk100-4	103	103		104	104	
spk100-5	92,4	92,4		92,7	92,7	
spk100-6	83,0	83,0		98,2	98,2	
spk200-1	191	95,7		214	107	
spk200-2	204	102	167	83,6		
spk200-3	190	95,0	204	102		
spk200-4	208	104	183	91,7		
spk200-5	180	90,1	214	107		
spk200-6	168	83,9	198	99,2		

Bảng PL 3.24. Độ lặp lại và độ thu hồi của Hydroxythio-homosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	7,32	26,9	89,6	4,96
spk-30-2	30,3	101		29,6	98,8	
spk-30-3	29,5	98,2		30,3	101	
spk-30-4	32,7	109		26,9	89,6	
spk-30-5	26,4	87,9		28,4	94,7	
spk-30-6	29,0	96,8		28,0	93,4	
spk100-1	94,2	94,2	5,59	108	108	6,45
spk100-2	91,5	91,5		90,9	90,9	
spk100-3	94,2	94,2		98,5	98,5	
spk100-4	100	100		107	107	
spk100-5	102	102		97,2	97,2	
spk100-6	87,7	87,7		98,5	98,5	
spk200-1	202	101	6,11	199	99,5	4,12
spk200-2	183	91,6		192	96,0	
spk200-3	194	97,2		200	100	
spk200-4	210	105		194	97,1	
spk200-5	216	108		183	91,6	
spk200-6	192	95,8		181	90,6	

Bảng PL 3.25. Độ lặp lại và độ thu hồi của Hydroxythiovardenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	32,4	108	7,87	24,1	80,3	8,66
spk-30-2	29,3	97,5		30,3	101	
spk-30-3	25,9	86,3		27,1	90,4	
spk-30-4	28,0	93,2		29,0	96,5	
spk-30-5	31,2	104		26,4	88,1	
spk-30-6	29,3	97,7		25,1	83,5	
spk100-1	107	107	8,21	97,9	97,9	8,52
spk100-2	99,1	99,1		109	109	
spk100-3	101	101		94,7	94,7	
spk100-4	97,2	97,2		95,9	95,9	
spk100-5	83,9	83,9		101	101	
spk100-6	92,1	92,1		83,8	83,8	
spk200-1	188	94,2	10,6	167	83,3	6,33
spk200-2	172	85,9		162	81,1	
spk200-3	183	91,5		166	82,9	
spk200-4	214	107		175	87,3	
spk200-5	164	82,1		193	96,3	
spk200-6	210	105		174	87,0	

Bảng PL 3.26. Độ lặp lại và độ thu hồi của Hydroxyvardenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	25,9	86,3	6,28	28,4	94,6	5,81
spk-30-2	28,7	95,6		27,5	91,5	
spk-30-3	30,3	101		29,0	96,5	
spk-30-4	26,6	88,7		28,7	95,8	
spk-30-5	26,0	86,6		32,4	108	
spk-30-6	27,7	92,2		29,7	98,9	
spk100-1	88,5	88,5	5,88	103	103	9,16
spk100-2	87,1	87,1		109	109	
spk100-3	101	101		99,6	99,6	
spk100-4	90,9	90,9		86,2	86,2	
spk100-5	92,5	92,5		92,5	92,5	
spk100-6	98,1	98,1		88,7	88,7	
spk200-1	172	85,9	7,87	176	88,2	7,63

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-2	216	108		206	103	
spk200-3	194	96,9		197	98,7	
spk200-4	204	102		186	93,0	
spk200-5	200	100		171	85,7	
spk200-6	185	92,7		204	102	

Bảng PL 3.27. Độ lặp lại và độ thu hồi của Imidazosagatriazinone

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,8	106	8,70	26,16	87,2	10,1
spk-30-2	27,66	92,2		28,89	96,3	
spk-30-3	32,7	109		31,8	106	
spk-30-4	27,45	91,5		25,05	83,5	
spk-30-5	26,58	88,6		27,87	92,9	
spk-30-6	30,6	102		32,1	107	
spk100-1	90,2	90,2	5,44	97,3	97,3	9,39
spk100-2	96,4	96,4		101	101	
spk100-3	92,8	92,8		81,5	81,5	
spk100-4	84,8	84,8		96,3	96,3	
spk100-5	83,4	83,4		105	105	
spk100-6	89,1	89,1		86,6	86,6	
spk200-1	162	81,0	11,7	208	104	4,57
spk200-2	212	106		198	99,2	
spk200-3	180	90,2		186	93,2	
spk200-4	173	86,4		200	100	
spk200-5	174	87,1		184	92,2	
spk200-6	214	107		193	96,4	

Bảng PL 3.28. Độ lặp lại và độ thu hồi của MDLenafil carbonate

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	29,1	97,0	6,80	27,0	90,1	2,89
spk-30-2	32,1	107		27,1	90,2	
spk-30-3	27,2	90,5		27,7	92,4	
spk-30-4	27,6	92,0		27,6	92,0	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-5	31,5	105	4,26	28,6	95,2	6,42
spk-30-6	29,9	100		26,2	87,4	
spk100-1	92,9	92,9		92,6	92,6	
spk100-2	92,8	92,8		97,4	97,4	
spk100-3	87,5	87,5		108	108	
spk100-4	86,8	86,8		94,0	94,0	
spk100-5	86,7	86,7	90,5	90,5		
spk100-6	83,4	83,4	95,6	95,6		
spk200-1	182	91,1	5,84	165	82,4	8,78
spk200-2	187	93,6		179	89,5	
spk200-3	200	100		208	104	
spk200-4	212	106		204	102	
spk200-5	197	98,7		190	94,9	
spk200-6	208	104		202	101	

Bảng PL 3.29. Độ lặp lại và độ thu hồi của Isosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	7,55	24,4	81,4	11,7
spk-30-2	31,5	105		29,0	96,5	
spk-30-3	29,7	98,9		32,1	107	
spk-30-4	31,8	106		26,6	88,6	
spk-30-5	26,8	89,3		30,9	103	
spk-30-6	27,3	90,9		24,5	81,5	
spk100-1	96,9	96,9	7,21	106	106	9,49
spk100-2	81,7	81,7		81,7	81,7	
spk100-3	97,0	97,0		101	101	
spk100-4	86,2	86,2		90,6	90,6	
spk100-5	97,1	97,1		98,7	98,7	
spk100-6	94,6	94,6		104	104	
spk200-1	210	105	9,42	200	100	6,01
spk200-2	164	82,1		193	96,4	
spk200-3	193	96,3		186	92,8	
spk200-4	216	108		197	98,7	
spk200-5	202	101		208	104	
spk200-6	208	104		220	110	

Bảng PL 3.30. Độ lặp lại và độ thu hồi của Mirodenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	5,68	27,8	92,6	7,36
spk-30-2	28,9	96,4		26,7	89,1	
spk-30-3	30,0	100		27,8	92,7	
spk-30-4	27,0	89,9		32,4	108	
spk-30-5	29,0	96,5		27,5	91,6	
spk-30-6	31,2	104		27,2	90,7	
spk100-1	96,1	96,1	5,81	107	107	8,38
spk100-2	95,7	95,7		83,7	83,7	
spk100-3	104	104		101	101	
spk100-4	90,0	90,0		96,8	96,8	
spk100-5	105	105		92,7	92,7	
spk100-6	96,1	96,1		92,4	92,4	
spk200-1	177	88,5	10,3	183	91,6	6,20
spk200-2	210	105		188	93,9	
spk200-3	195	97,6		194	97,1	
spk200-4	162	81,2		161	80,7	
spk200-5	208	104		188	94,0	
spk200-6	210	105		186	92,8	

Bảng PL 3.31. Độ lặp lại và độ thu hồi của Mutaprodenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	29,4	97,9	5,33	25,2	83,9	7,33
spk-30-2	30,0	100		29,8	99,3	
spk-30-3	27,1	90,2		26,3	87,6	
spk-30-4	26,7	89,0		26,0	86,5	
spk-30-5	30,3	101		24,9	83,1	
spk-30-6	28,1	93,8		28,6	95,3	
spk100-1	94,3	94,3	9,08	99,5	99,5	7,57
spk100-2	85,2	85,2		104	104	
spk100-3	81,2	81,2		108	108	
spk100-4	98,6	98,6		85,8	85,8	
spk100-5	80,6	80,6		102	102	
spk100-6	97,1	97,1		99,7	99,7	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-1	212	106	7,60	212	106	12,6
spk200-2	218	109		189	94,3	
spk200-3	199	99,4		169	84,3	
spk200-4	220	110		162	80,8	
spk200-5	179	89,7		220	110	
spk200-6	197	98,3		177	88,6	

Bảng PL 3.32. Độ lặp lại và độ thu hồi của N-Desethylvaridenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	6,75	26,1	87,2	7,57
spk-30-2	31,2	104		25,5	85,2	
spk-30-3	29,6	98,7		25,6	85,6	
spk-30-4	30,9	103		29,8	99,3	
spk-30-5	26,4	87,9		30,1	100	
spk-30-6	28,3	94,3		26,5	88,5	
spk100-1	80,9	80,9	8,95	99,7	99,7	9,54
spk100-2	94,0	94,0		95,2	95,2	
spk100-3	92,1	92,1		99,9	99,9	
spk100-4	88,8	88,8		106	106	
spk100-5	84,2	84,2		80,9	80,9	
spk100-6	104	104		88,3	88,3	
spk200-1	191	95,7	4,67	164	81,8	10,5
spk200-2	194	97,2		187	93,3	
spk200-3	197	98,3		164	82,1	
spk200-4	177	88,7		216	108	
spk200-5	202	101		186	93,2	
spk200-6	184	92,0		191	95,4	

Bảng PL 3.33. Độ lặp lại và độ thu hồi của N-Desmethylsildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,5	94,9	4,67	30,6	102	6,66
spk-30-2	29,3	97,5		27,9	93,2	
spk-30-3	30,9	103		29,8	99,4	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-4	30,3	101		26,1	87,0	
spk-30-5	27,2	90,8		28,0	93,3	
spk-30-6	30,3	101		31,2	104	
spk100-1	102	102	7,81	81	81,0	10,4
spk100-2	90,7	90,7		108	108	
spk100-3	103	103		101	101	
spk100-4	104	104		110	110	
spk100-5	95	95,0		97,5	97,5	
spk100-6	85,5	85,5		102	102	
spk200-1	206	103	5,15	189	94,3	9,93
spk200-2	197	98,6		195	97,6	
spk200-3	180	89,8		186	93,1	
spk200-4	188	93,8		167	83,4	
spk200-5	198	99,0		160	80,1	
spk200-6	204	102		210	105	

Bảng PL 3.34. Độ lặp lại và độ thu hồi của N-Octylmortalafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	29,4	98,1	10,3	30,3	101	5,84
spk-30-2	30,0	100		28,7	95,8	
spk-30-3	31,8	106		26,2	87,4	
spk-30-4	24,2	80,7		28,1	93,7	
spk-30-5	27,6	92,1		26,8	89,3	
spk-30-6	32,4	108		26,3	87,5	
spk100-1	97,4	97,4	9,62	101	101	7,40
spk100-2	103	103		104	104	
spk100-3	81,6	81,6		89,6	89,6	
spk100-4	108	108		92,4	92,4	
spk100-5	97,7	97,7		109	109	
spk100-6	106	106		103	103	
spk200-1	202	101	10,3	187	93,3	5,41
spk200-2	172	86,0		199	99,5	
spk200-3	197	98,7		174	87,0	
spk200-4	210	105		189	94,7	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-5	161	80,4		199	99,7	
spk200-6	178	88,8		180	89,9	

Bảng PL 3.35. Độ lặp lại và độ thu hồi của Nitrodenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,4	94,6	6,89	25,9	86,4	7,73
spk-30-2	32,4	108		29,2	97,2	
spk-30-3	30,6	102		26,4	87,9	
spk-30-4	30,0	100		24,4	81,3	
spk-30-5	26,7	89,1		29,9	99,7	
spk-30-6	28,2	93,9		28,2	94,0	
spk100-1	86,5	86,5	9,19	102	102	5,25
spk100-2	101	101		99,4	99,4	
spk100-3	92,2	92,2		99,8	99,8	
spk100-4	104	104		100	100	
spk100-5	98,2	98,2		96,2	96,2	
spk100-6	81,9	81,9		87,8	87,8	
spk200-1	194	96,8	3,43	202	101	7,23
spk200-2	200	100		162	81,1	
spk200-3	202	101		192	96,2	
spk200-4	192	96,0		194	96,8	
spk200-5	192	95,9		190	95,1	
spk200-6	183	91,7		192	96,1	

Bảng PL 3.36. Độ lặp lại và độ thu hồi của Noracetildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	29,5	98,3	3,94	28,1	93,6	10,8
spk-30-2	29,2	97,3		24,4	81,4	
spk-30-3	30,6	102		25,1	83,8	
spk-30-4	29,5	98,2		29,6	98,5	
spk-30-5	29,0	96,7		24,6	82,1	
spk-30-6	27,1	90,3		31,5	105	
spk100-1	87,0	87,0	7,07	96,2	96,2	7,86

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk100-2	101	101		105	105	
spk100-3	88,3	88,3		93,5	93,5	
spk100-4	84,5	84,5		96,6	96,6	
spk100-5	84,5	84,5		88,2	88,2	
spk100-6	92,9	92,9		83,7	83,7	
spk200-1	214	107		200	100	
spk200-2	180	90,0	196	98,2		
spk200-3	172	85,9	162	80,8		
spk200-4	210	105	194	97,1		
spk200-5	188	93,9	176	88,2		
spk200-6	199	99,6	180	89,8		

Bảng PL 3.37. Độ lặp lại và độ thu hồi của Norneosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	33,0	110	5,65	32,1	107	7,74
spk-30-2	32,4	108		29,8	99,2	
spk-30-3	29,5	98,4		30,6	102	
spk-30-4	31,5	105		25,5	85,0	
spk-30-5	28,5	95,1		29,9	99,5	
spk-30-6	32,1	107		28,2	93,9	
spk100-1	108	108	9,17	108	108	11,9
spk100-2	104	104		109	109	
spk100-3	108	108		99,5	99,5	
spk100-4	99,6	99,6		81,4	81,4	
spk100-5	85,4	85,4		90,0	90,0	
spk100-6	92,2	92,2		87,5	87,5	
spk200-1	212	106	9,23	193	96,7	6,49
spk200-2	204	102		199	99,7	
spk200-3	194	96,9		208	104	
spk200-4	198	99,2		172	86,0	
spk200-5	168	84,1		185	92,6	
spk200-6	172	85,9		197	98,4	

Bảng PL 3.38. Độ lặp lại và độ thu hồi của Norneovardenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,9	103	10,3	26,9	89,6	8,94
spk-30-2	26,3	87,8		24,6	82,0	
spk-30-3	24,2	80,5		29,5	98,4	
spk-30-4	31,5	105		31,8	106	
spk-30-5	29,4	98,1		26,8	89,2	
spk-30-6	26,6	88,8		27,7	92,4	
spk100-1	81,2	81,2	9,11	103	103	6,80
spk100-2	105	105		86,8	86,8	
spk100-3	97,1	97,1		95,7	95,7	
spk100-4	90,2	90,2		100	100	
spk100-5	102	102		106	106	
spk100-6	92,6	92,6		98,8	98,8	
spk200-1	202	101	6,68	169	84,3	4,94
spk200-2	179	89,4		178	89,2	
spk200-3	199	99,4		186	93,2	
spk200-4	216	108		176	88,1	
spk200-5	186	92,8		194	97,2	
spk200-6	193	96,7		178	89,2	

Bảng PL 3.39. Độ lặp lại và độ thu hồi của Nortadalaflil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,8	106	5,63	26,8	89,3	5,20
spk-30-2	29,3	97,5		25,5	85,1	
spk-30-3	29,8	99,3		27,4	91,4	
spk-30-4	27,1	90,2		24,6	82,0	
spk-30-5	28,9	96,4		24,2	80,5	
spk-30-6	27,9	93,0		26,9	89,8	
spk100-1	105	105	7,54	101	101	6,18
spk100-2	84,9	84,9		108	108	
spk100-3	92,1	92,1		98,8	98,8	
spk100-4	99,1	99,1		98,1	98,1	
spk100-5	98,9	98,9		95,2	95,2	
spk100-6	102	102		89,7	89,7	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk200-1	193	96,6	6,81	206	103	9,22
spk200-2	181	90,5		184	92,0	
spk200-3	176	88,2		164	81,8	
spk200-4	194	97,0		212	106	
spk200-5	214	107		192	96,2	
spk200-6	193	96,6		204	102	

Bảng PL 3.40. Độ lặp lại và độ thu hồi của O-desethyl-o-propyl sildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,2	94,1	9,83	24,5	81,6	6,59
spk-30-2	31,2	104		26,9	89,7	
spk-30-3	24,7	82,3		28,5	95,0	
spk-30-4	24,5	81,8		26,0	86,8	
spk-30-5	29,4	97,9		28,7	95,8	
spk-30-6	26,1	87,1		25,1	83,6	
spk100-1	96,4	96,4	8,12	104	104	6,59
spk100-2	90,3	90,3		100	100	
spk100-3	80,1	80,1		91,8	91,8	
spk100-4	88,3	88,3		92,8	92,8	
spk100-5	101	101		109	109	
spk100-6	96,6	96,6		99,4	99,4	
spk200-1	212	106	4,59	163	81,3	5,26
spk200-2	216	108		171	85,4	
spk200-3	202	101		183	91,6	
spk200-4	214	107		171	85,3	
spk200-5	192	96,2		181	90,3	
spk200-6	199	99,6		161	80,6	

Bảng PL 3.41. Độ lặp lại và độ thu hồi của Piperazonifil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,3	101	7,38	26,9	89,6	6,64
spk-30-2	29,9	99,8		27,0	90,1	
spk-30-3	31,2	104		27,2	90,5	
spk-30-4	31,8	106		30,3	101	
spk-30-5	27,3	91,0		31,2	104	
spk-30-6	26,4	87,9		27,7	92,2	
spk100-1	91,9	91,9	4,87	97,0	97,0	7,49
spk100-2	89,6	89,6		103	103	
spk100-3	98,9	98,9		105	105	
spk100-4	92,4	92,4		101	101	
spk100-5	93,4	93,4		93,5	93,5	
spk100-6	85,3	85,3		85,2	85,2	
spk200-1	216	108	5,55	184	91,9	7,10
spk200-2	194	97,1		199	99,6	
spk200-3	200	100		197	98,5	
spk200-4	220	110		185	92,4	
spk200-5	193	96,4		172	85,9	
spk200-6	202	101		167	83,3	

Bảng PL 3.42. Độ lặp lại và độ thu hồi của Piperiacetildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	31,5	105	7,42	29,6	98,8	7,58
spk-30-2	33,0	110		24,9	83,1	
spk-30-3	27,1	90,3		25,2	84,1	
spk-30-4	27,9	92,9		26,0	86,6	
spk-30-5	29,7	99,0		26,2	87,4	
spk-30-6	30,6	102		29,2	97,3	
spk100-1	92,1	92,1	4,66	84,9	84,9	7,20
spk100-2	84,7	84,7		101	101	
spk100-3	82,9	82,9		100	100	
spk100-4	87,5	87,5		92,3	92,3	
spk100-5	92,0	92,0		104	104	
spk100-6	92,1	92,1		96,1	96,1	
spk200-1	220	110	7,23	173	86,6	6,51

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-2	216	108		191	95,3	
spk200-3	199	99,3		166	83,1	
spk200-4	210	105		165	82,5	
spk200-5	184	91,8		176	87,9	
spk200-6	190	94,9		191	95,6	

Bảng PL 3.43. Độ lặp lại và độ thu hồi của Propoxyphenyl aildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	24,3	80,9	9,24	24,8	82,8	8,44
spk-30-2	31,8	106		30,9	103	
spk-30-3	30,9	103		29,0	96,6	
spk-30-4	30,3	101		28,7	95,5	
spk-30-5	29,9	99,8		28,4	94,5	
spk-30-6	28,3	94,3		25,2	84,0	
spk100-1	82,1	82,1	10,3	106	106	5,98
spk100-2	109	109		99,6	99,6	
spk100-3	104	104		103	103	
spk100-4	89,4	89,4		106	106	
spk100-5	95,6	95,6		89,9	89,9	
spk100-6	102	102		99,4	99,4	
spk200-1	180	89,8	7,63	202	101	6,69
spk200-2	214	107		189	94,5	
spk200-3	204	102		186	93,0	
spk200-4	187	93,3		218	109	
spk200-5	195	97,3		216	108	
spk200-6	176	87,9		210	105	

Bảng PL 3.44. Độ lặp lại và độ thu hồi của Propoxyphenyl-homohydroxysildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	24,9	83,0	8,16	24,8	82,8	8,94
spk-30-2	31,2	104,0		30,9	103	
spk-30-3	30,2	100,7		29,0	96,6	
spk-30-4	30,3	101,0		29,1	97,0	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-5	29,1	97,0		29,2	97,2	
spk-30-6	27,3	91,0		30,9	103	
spk100-1	85,7	85,7	9,01	101	101	3,42
spk100-2	101	101,0		97,6	97,6	
spk100-3	102	102,0		101	101	
spk100-4	84,4	84,4		103	103	
spk100-5	91,3	91,3		98,5	98,5	
spk100-6	89	89,0		98,1	98,1	
spk200-1	183	91,5	5,42	166	82,8	4,54
spk200-2	202	101,0		182	91,0	
spk200-3	186	93,0		185	92,3	
spk200-4	187	93,5		210	105	
spk200-5	191	95,5		189	94,4	
spk200-6	179	89,5		176	87,9	

Bảng PL 3.45. Độ lặp lại và độ thu hồi của Pseudovardenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	32,7	109	8,96	26,5	88,4	3,47
spk-30-2	28,5	94,9		25,7	85,6	
spk-30-3	25,2	84,0		27,5	91,5	
spk-30-4	29,8	99,4		25,9	86,4	
spk-30-5	31,8	106		28,1	93,7	
spk-30-6	29,6	98,7		27,1	90,2	
spk100-1	82,0	82,0	6,16	98,2	98,2	7,06
spk100-2	91,8	91,8		106	106	
spk100-3	84,5	84,5		93,2	93,2	
spk100-4	91,2	91,2		87,4	87,4	
spk100-5	96,2	96,2		96,2	96,2	
spk100-6	94,0	94,0		104	104	
spk200-1	175	87,7	7,66	181	90,6	9,06
spk200-2	218	109		212	106	
spk200-3	200	100		200	100	
spk200-4	202	101		196	98,2	
spk200-5	188	93,8		208	104	
spk200-6	186	93,2		165	82,7	

Bảng PL 3.46. Độ lặp lại và độ thu hồi của Propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,9	103	8,95	30,3	101	11,6
spk-30-2	27,5	91,8		24,0	80,0	
spk-30-3	27,8	92,5		32,7	109	
spk-30-4	31,8	106		25,7	85,5	
spk-30-5	26,4	88,1		30,6	102	
spk-30-6	25,4	84,5		27,4	91,3	
spk100-1	96,9	96,9	7,37	99,6	99,6	8,24
spk100-2	94,7	94,7		107	107	
spk100-3	83,7	83,7		97,4	97,4	
spk100-4	80,5	80,5		97,3	97,3	
spk100-5	84,5	84,5		95,1	95,1	
spk100-6	88,5	88,5		82,6	82,6	
spk200-1	197	98,6	8,87	178	89,1	5,77
spk200-2	218	109		166	82,8	
spk200-3	191	95,6		182	91,0	
spk200-4	176	87,8		185	92,3	
spk200-5	172	85,9		176	87,8	
spk200-6	184	91,9		197	98,5	

Bảng PL 3.47. Độ lặp lại và độ thu hồi của Sildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C (µg/ml)	R%	RSD _r %	C (µg/ml)	R%	RSD _r %
spk-30-1	30,6	102	10,3	26,6	88,6	5,35
spk-30-2	26,6	88,8		29,2	97,2	
spk-30-3	27,7	92,3		30,9	103	
spk-30-4	32,7	109		28,7	95,8	
spk-30-5	25,8	86,1		29,9	99,5	
spk-30-6	25,4	84,7		30,6	102	
spk100-1	94,3	94,3	7,12	105	105	9,04
spk100-2	81,1	81,1		103	103	
spk100-3	92,2	92,2		98,5	98,5	
spk100-4	96,8	96,8		98,1	98,1	
spk100-5	97,1	97,1		90,1	90,1	

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk100-6	100	100		81,8	81,8	
spk200-1	186	93,1	12,4	180	90,0	5,42
spk200-2	214	107		204	102	
spk200-3	165	82,7		191	95,5	
spk200-4	167	83,3		197,6	98,8	
spk200-5	206	103		180,8	90,4	
spk200-6	220	110		202	101	

Bảng PL 3.48. Độ lặp lại và độ thu hồi của Sildenafil N-oxide

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	28,8	96,0	8,46	27,3	90,9	9,57
spk-30-2	24,1	80,2		27,6	92,1	
spk-30-3	28,0	93,2		24,9	82,9	
spk-30-4	29,7	99,0		26,9	89,5	
spk-30-5	30,9	103		28,9	96,2	
spk-30-6	27,1	90,3		32,9	110	
spk100-1	81,9	81,9	6,44	85,3	85,3	6,03
spk100-2	89,9	89,9		99,0	99,0	
spk100-3	85,6	85,6		98,6	98,6	
spk100-4	86,0	86,0		101	101	
spk100-5	88,6	88,6		100	100	
spk100-6	98,6	98,6		98,7	98,7	
spk200-1	214	107	6,51	196	98,1	11,1
spk200-2	218	109		220	110	
spk200-3	199	99,7		162	81,2	
spk200-4	204	102		210	105	
spk200-5	186	93		189	94,4	
spk200-6	188	94		176	87,9	

Bảng PL 3.49. Độ lặp lại và độ thu hồi của Tadalafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	25,2	83,9	10,6	25,9	86,2	10,4
spk-30-2	26,8	89,2		32,4	108	
spk-30-3	31,8	106		26,9	89,5	
spk-30-4	27,6	91,9		30,9	103	
spk-30-5	24,0	80,1		27,5	91,6	
spk-30-6	24,8	82,8		33,0	110	
spk100-1	96,2	96,2	8,26	109	109	7,32
spk100-2	88,5	88,5		110	110	
spk100-3	99,4	99,4		97,4	97,4	
spk100-4	94,4	94,4		102	102	
spk100-5	108	108		96,1	96,1	
spk100-6	86,1	86,1		91,5	91,5	
spk200-1	191	95,4	10,8	177	88,5	7,89
spk200-2	180	90,0		206	103	
spk200-3	163	81,6		194	97,0	
spk200-4	183	91,3		172	86,2	
spk200-5	218	109		204	102	
spk200-6	212	106		177	88,4	

Bảng PL 3.50. Độ lặp lại và độ thu hồi của Thioaildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	25,1	83,5	9,43	30,9	103	5,10
spk-30-2	31,5	105		32,1	107	
spk-30-3	27,8	92,6		29,97	99,9	
spk-30-4	29,7	98,9		27,54	91,8	
spk-30-5	30,9	103		30,6	102	
spk-30-6	32,7	109		29,52	98,4	
spk100-1	83,8	83,8	10,5	105	105	9,87
spk100-2	85,4	85,4		108	108	
spk100-3	99,6	99,6		97,8	97,8	
spk100-4	98,0	98,0		86,6	86,6	
spk100-5	110	110		102	102	
spk100-6	90,7	90,7		85,0	85,0	
spk200-1	197	98,6	4,40	214	107	7,86

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk200-2	187	93,6		195	97,6	
spk200-3	200	100		168	83,8	
spk200-4	204	102		187	93,3	
spk200-5	198	99,1		189	94,3	
spk200-6	214	107		190	95,0	

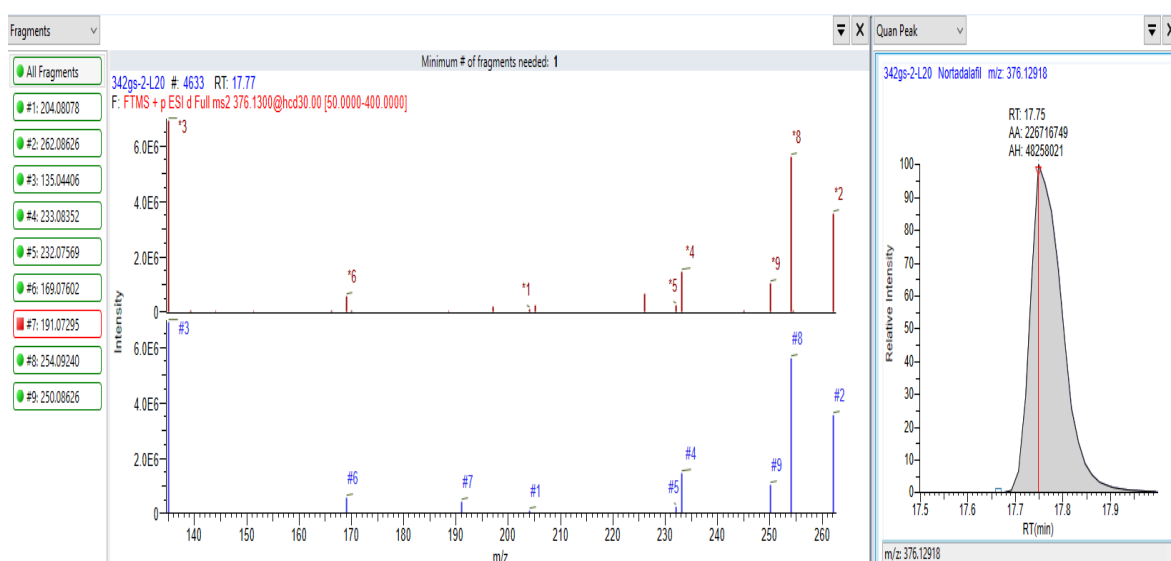
Bảng PL 3.51. Độ lặp lại và độ thu hồi của Thiohomosildenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	24,1	80,2	10,5	32,7	109	9,93
spk-30-2	31,2	104		25,2	83,9	
spk-30-3	26,5	88,2		28,4	94,7	
spk-30-4	27,1	90,2		33,0	110	
spk-30-5	29,3	97,8		28,7	95,5	
spk-30-6	24,1	80,4		29,5	98,4	
spk100-1	89,1	89,1	9,22	105	105	7,18
spk100-2	95,8	95,8		92,3	92,3	
spk100-3	81,9	81,9		101	101	
spk100-4	103	103		107	107	
spk100-5	98,6	98,6		89,7	89,7	
spk100-6	83,6	83,6		94,9	94,9	
spk200-1	214	107	9,38	206	103	7,53
spk200-2	180	90,1		183	91,3	
spk200-3	216	108		181	90,6	
spk200-4	177	88,5		168	84,2	
spk200-5	208	104		187	93,4	
spk200-6	181	90,7		169	84,7	

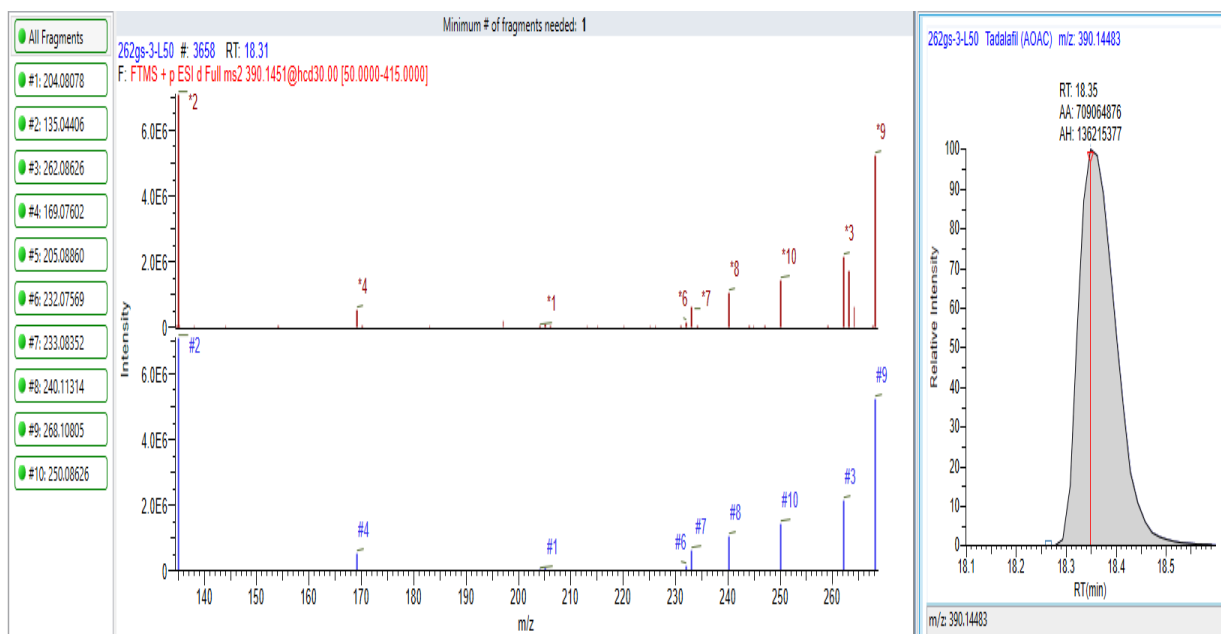
Bảng PL 3.52. Độ lặp lại và độ thu hồi của Udenafil

Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-1	29,9	99,6	5,75	25,7	85,6	8,45
spk-30-2	32,4	108		28,0	93,3	
spk-30-3	27,5	91,6		26,7	89,0	
spk-30-4	29,0	96,5		26,9	89,7	

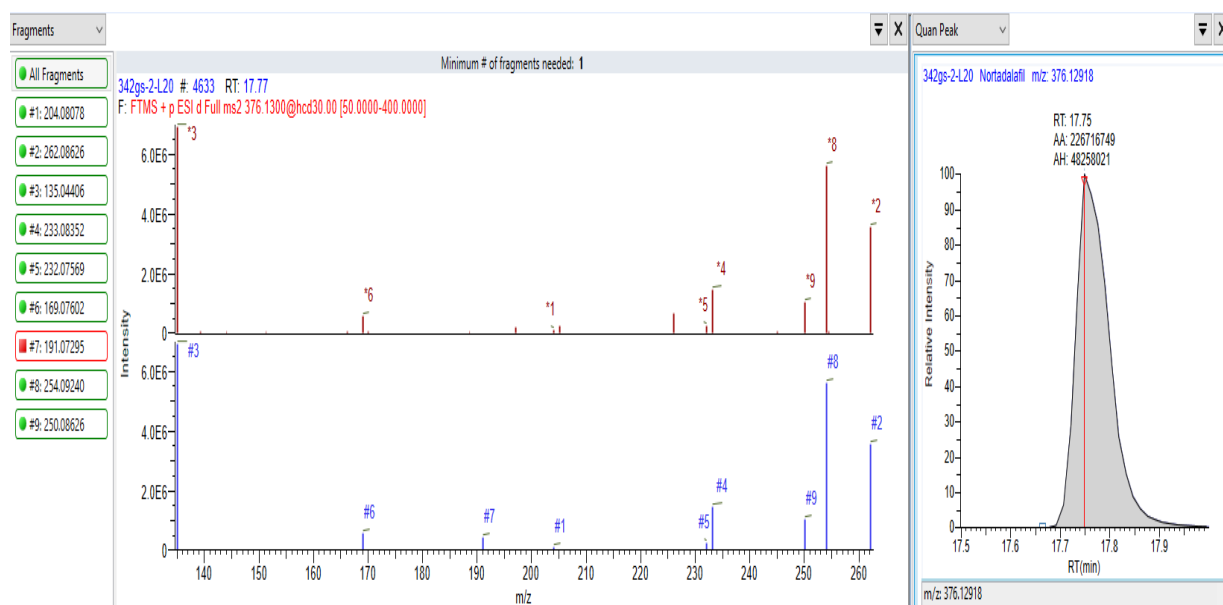
Tên mẫu	Nền viên nang cứng			Nền viên nang mềm		
	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %	C ($\mu\text{g/ml}$)	R%	RSD _r %
spk-30-5	31,2	104	11,6	27,9	93,0	7,46
spk-30-6	30,6	102		32,4	108	
spk100-1	109	109		95,1	95,1	
spk100-2	84,5	84,5		96,7	96,7	
spk100-3	104	104		84,0	84,0	
spk100-4	82,8	82,8		94,3	94,3	
spk100-5	99,7	99,7	83,5	83,5		
spk100-6	106	106	100	100		
spk200-1	200	99,9	9,12	192	96,2	5,95
spk200-2	197	98,5		176	88,1	
spk200-3	216	108		179	89,7	
spk200-4	194	96,9		171	85,3	
spk200-5	166	82,9		168	83,8	
spk200-6	179	89,3		163	81,5	



Hình PL 3.4. Phổ đồ và sắc ký đồ mẫu TPBVSK 18 dương tính với nortadafafil

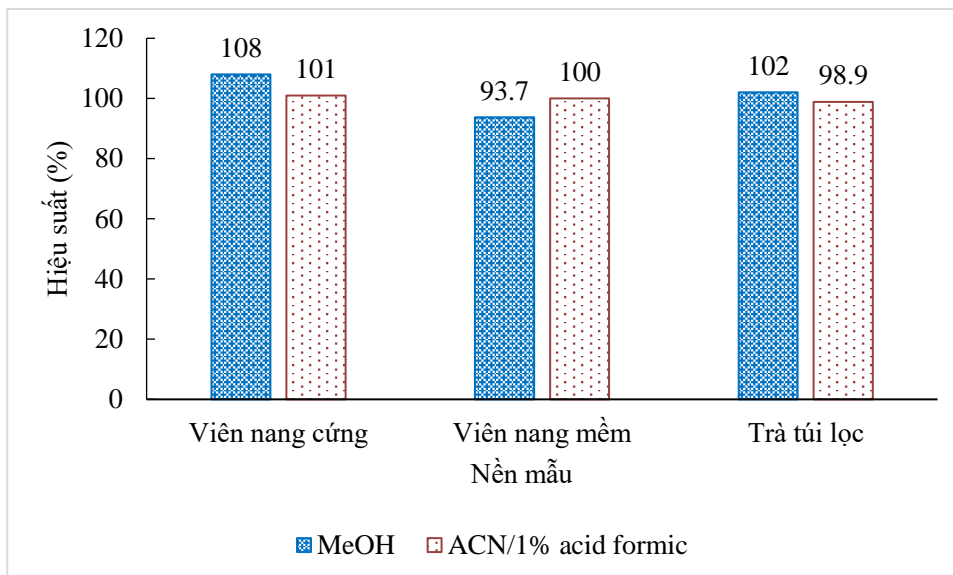


Hình PL 3.5. Phổ đồ và sắc ký đồ mẫu TPBVSK 1 dương tính với tadalafil

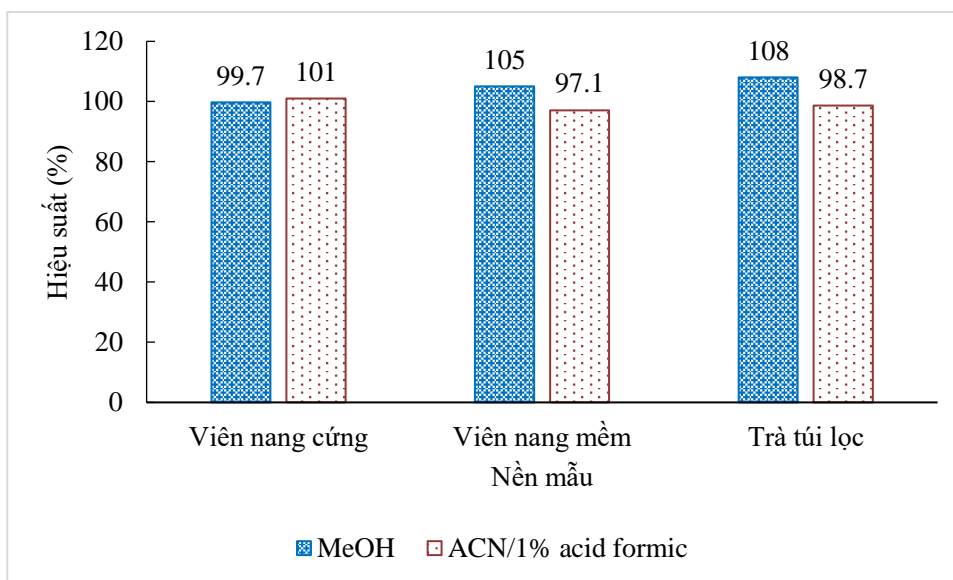


Hình PL 3.6. Phổ đồ và sắc ký đồ mẫu TPBVSK 12 dương tính với nortadafafil

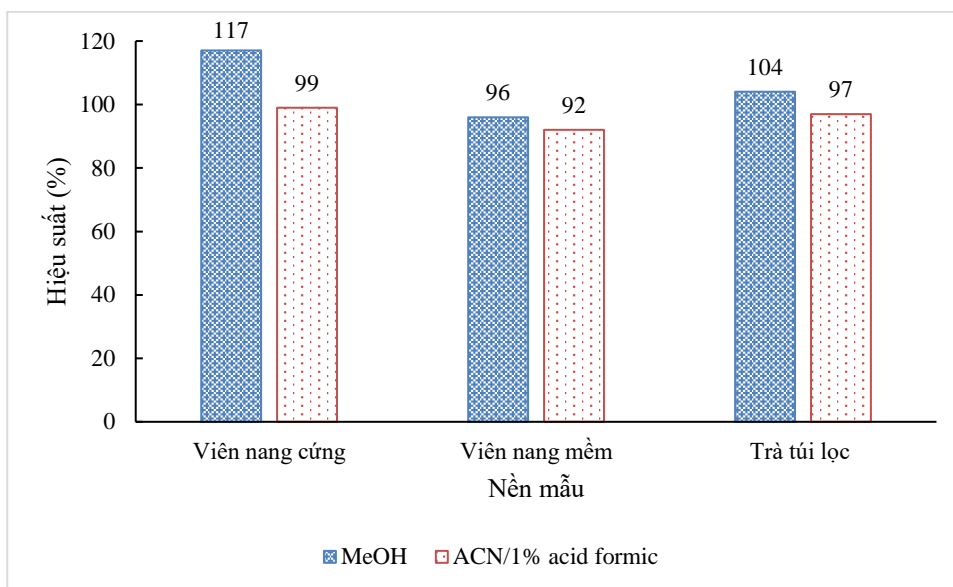
Phụ lục 4. Kết quả của phương pháp LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ giảm cân



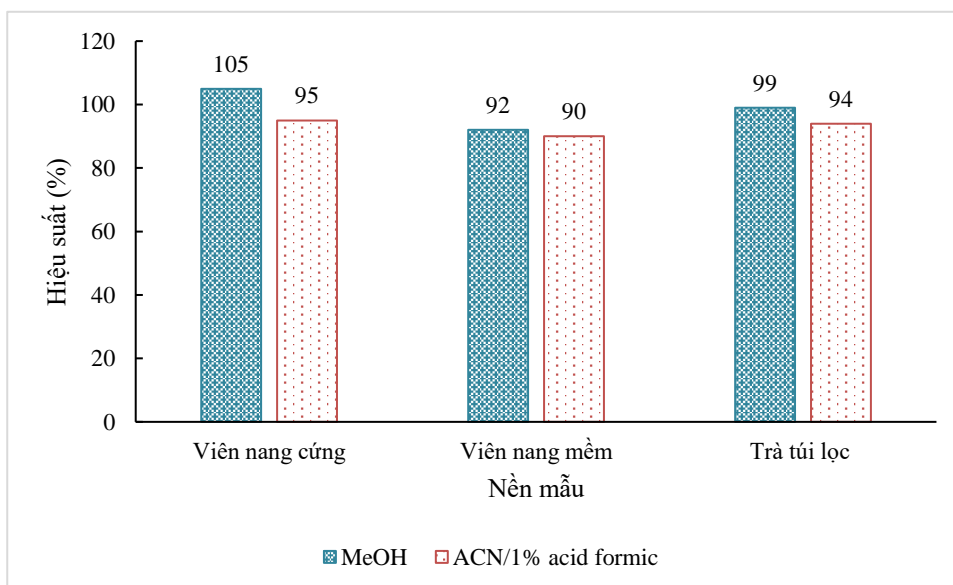
Hình PL 4.1. Độ thu hồi desmethyl sibutramin tại dung môi chiết khác nhau



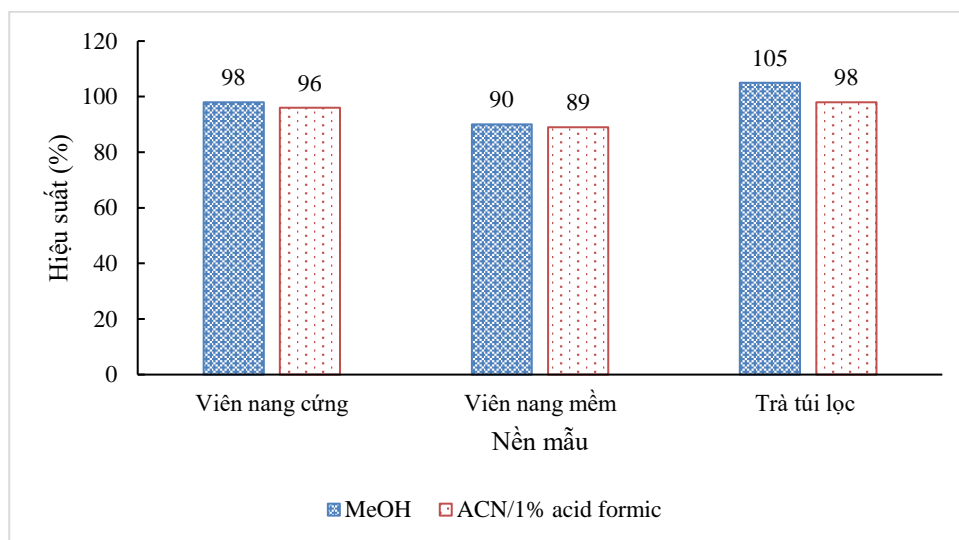
Hình PL 4.2. Độ thu hồi didesmethyl sibutramin tại dung môi chiết khác nhau



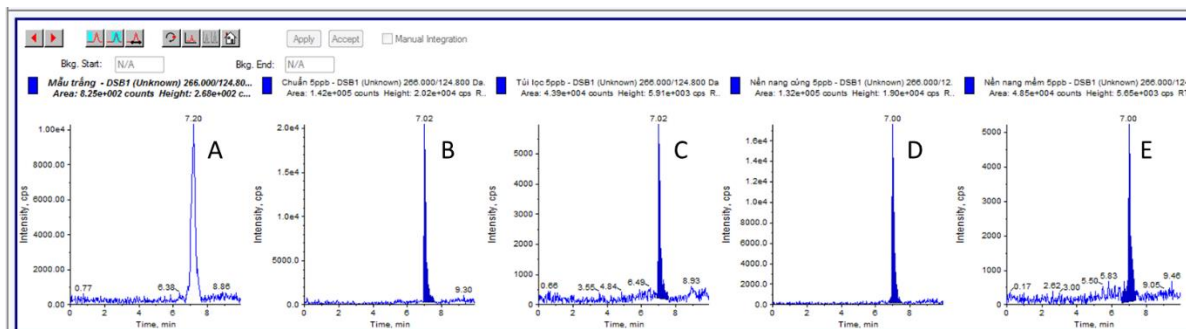
Hình PL 4.3. Độ thu hồi fenfluramin tại dung môi chiết khác nhau



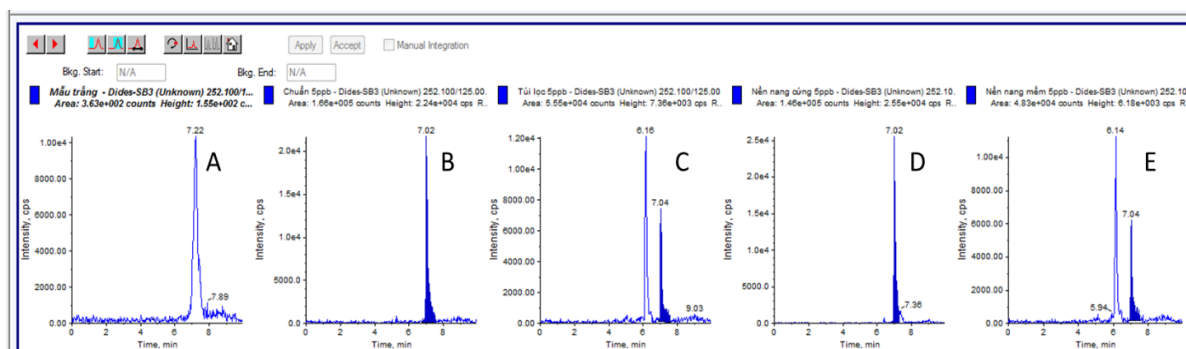
Hình PL 4.4. Độ thu hồi loperamid tại dung môi chiết khác nhau



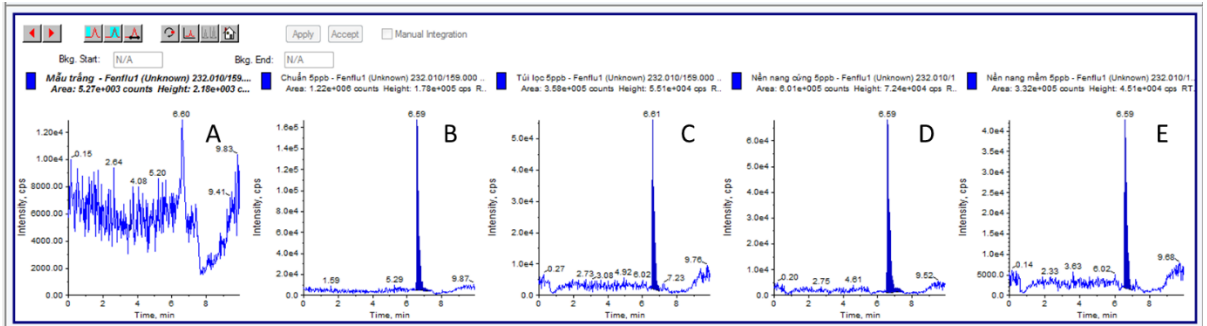
Hình PL 4.5. Độ thu hồi phenylpropanolamin tại dung môi chiết khác nhau



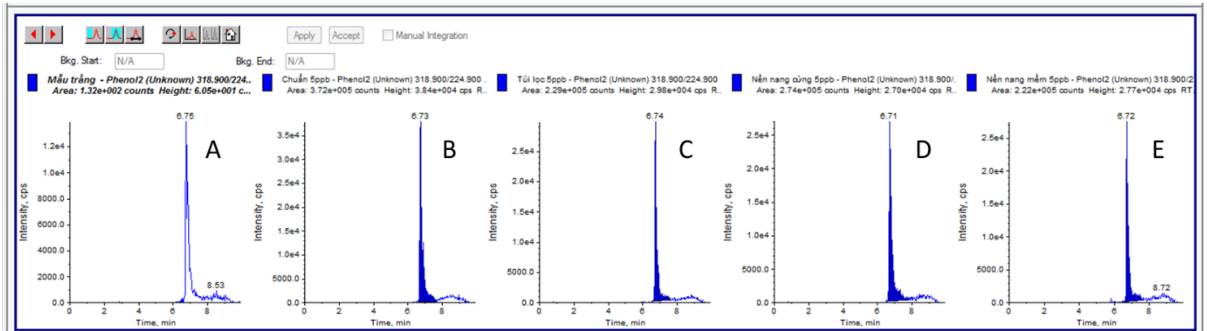
Hình PL 4.6. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn desmethyl sibutramin trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và nền viên nang mềm (E)



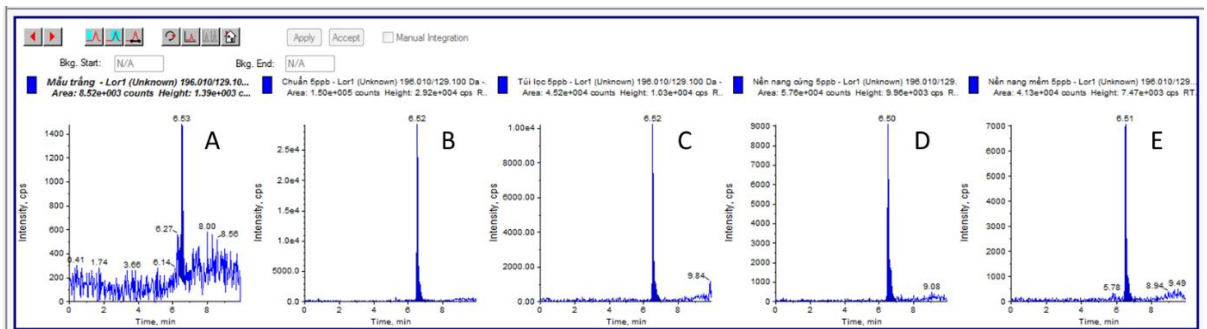
Hình PL 4.7. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn didesmethyl sibutramin trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và nền viên nang mềm (E)



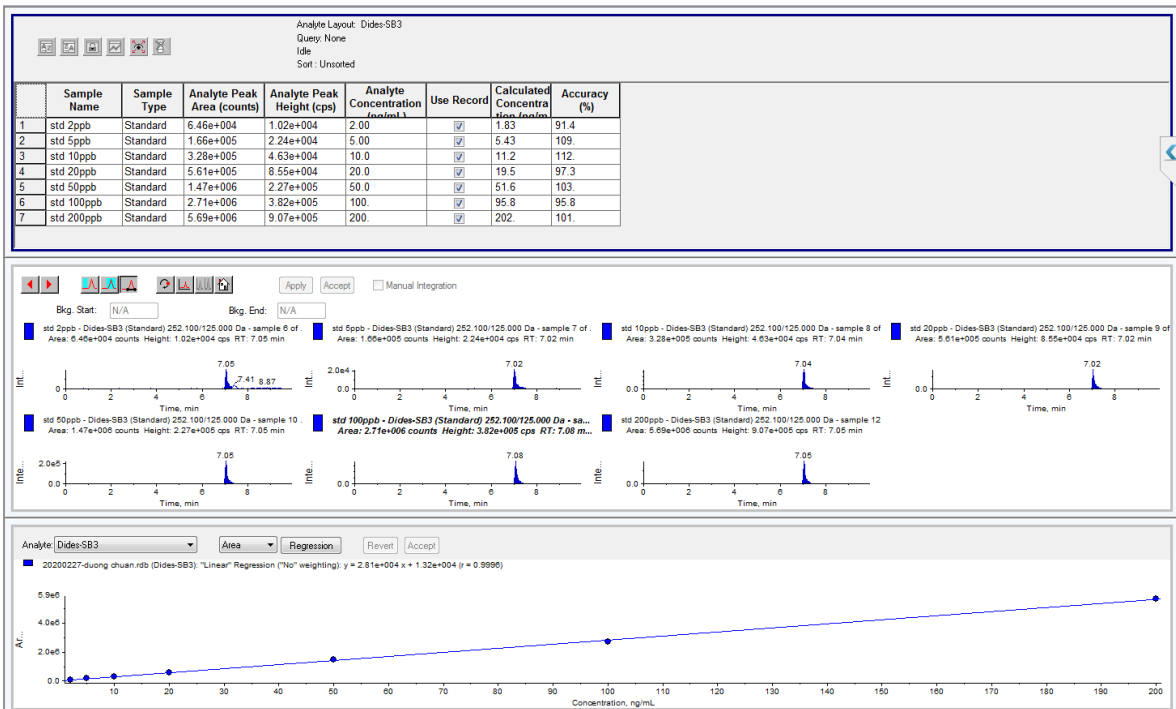
Hình PL 4.8. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn fenfluramin trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và nền viên nang mềm (E)



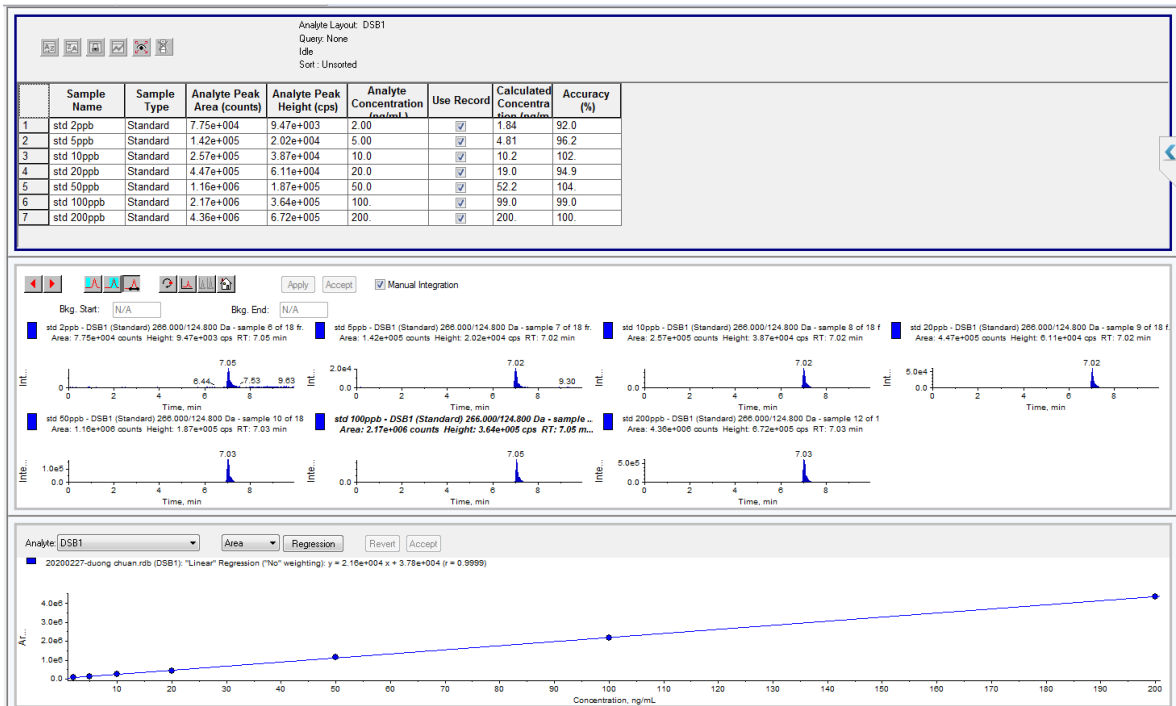
Hình PL 4.9. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn phenylpropanolamin trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và nền viên nang mềm (E)



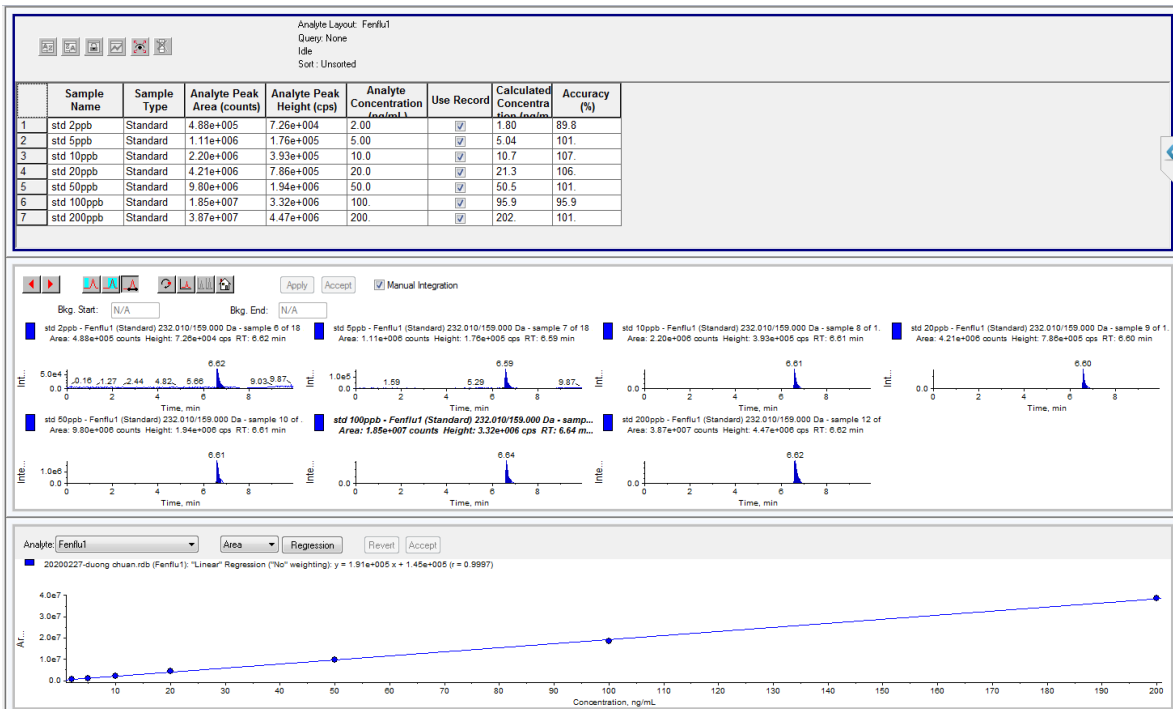
Hình PL 4.10. Sắc đồ mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thêm chuẩn loperamid trên nền mẫu trà giảm cân (C), viên nang cứng (D) và nền viên nang mềm (E)



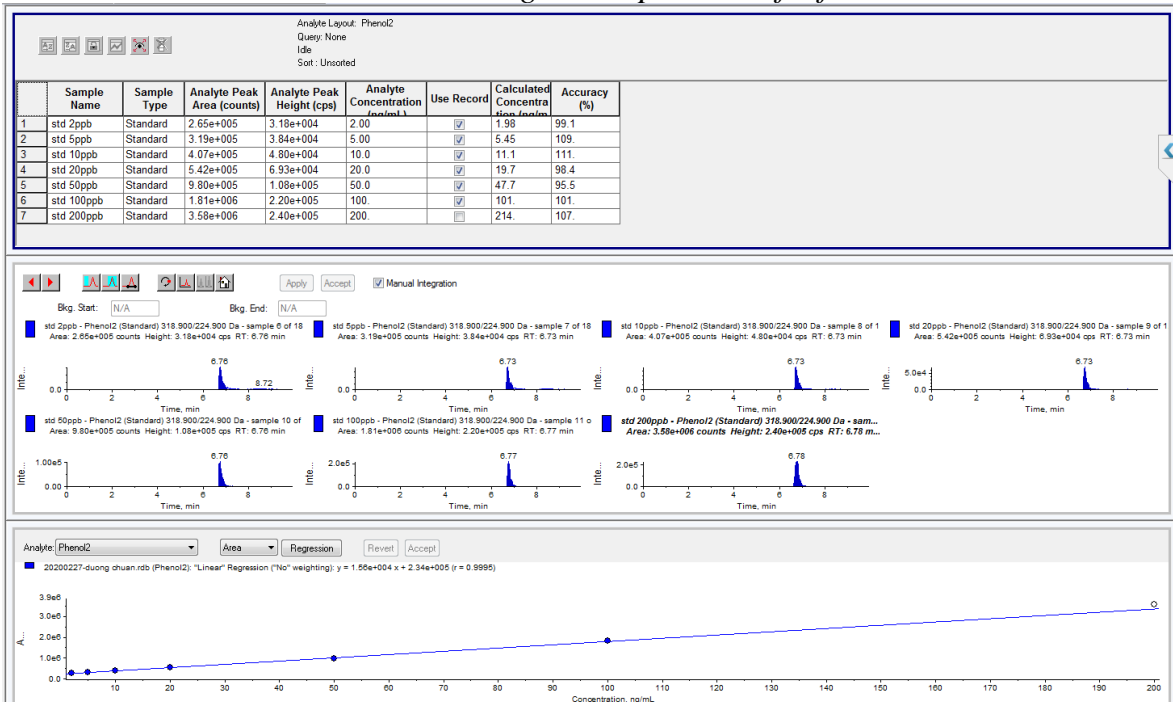
Hình PL 4.11. Đường chuẩn phân tích didesmethylsibutramin



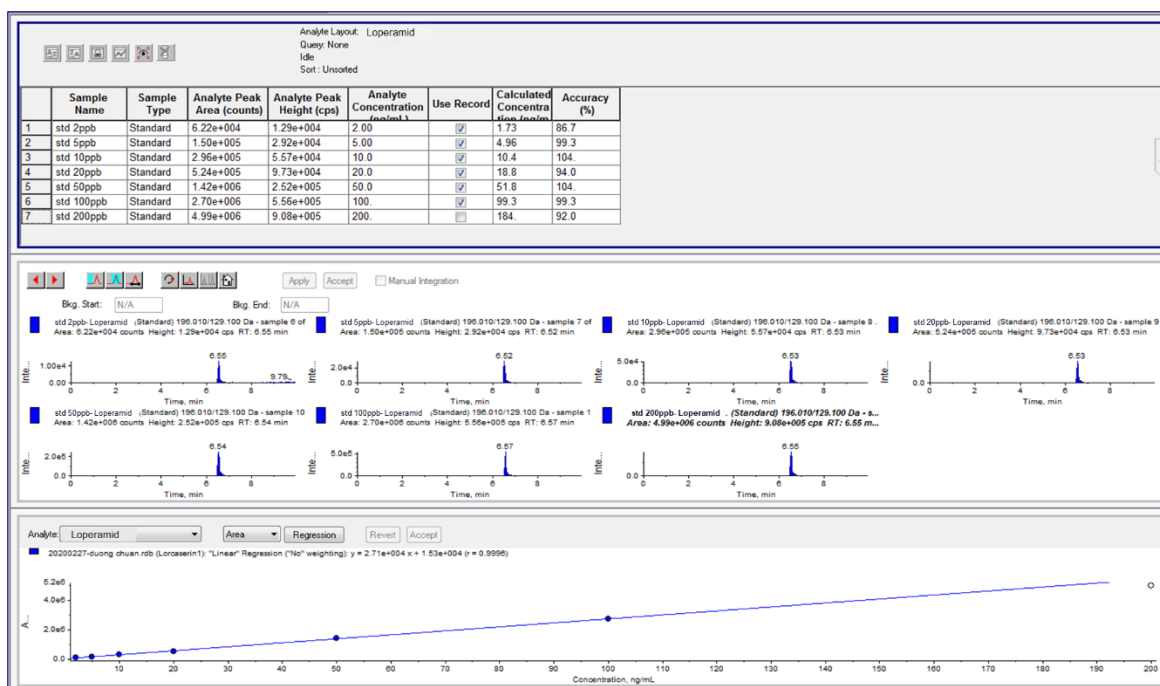
Hình PL 4.12. Đường chuẩn phân tích desmethylsibutramin



Hình PL 4.13. Đường chuẩn phân tích fenfluramin



Hình PL 4.14. Đường chuẩn phân tích phenylpropanolamin



Hình PL 4.15. Đường chuẩn phân tích loperamid

Bảng PL 4.1. Độ lặp lại và độ thu hồi của desmethyisibutramin

Mẫu	2 mg/g		5 mg/g	
	C tính	R%	C tính	R%
1	1,97	98,5	4,35	87,0
2	1,76	87,8	4,06	81,2
3	1,69	84,6	4,18	83,6
4	1,66	83,0	4,26	85,2
5	1,72	86,2	4,18	83,5
6	1,86	93,1	4,36	87,2
TB	88,9		84,6	
SD	0,12		0,11	
RSD	6,59		2,73	

Bảng PL 4.2. Độ lặp lại và độ thu hồi của didesmethylsibutramin

Mẫu	2 mg/g		5 mg/g	
	C tính	R%	C tính	R%
1	1,80	89,8	4,36	87,2
2	1,72	86,1	4,58	91,6
3	1,88	94,0	4,92	98,4
4	1,81	90,5	4,21	84,2
5	1,75	87,6	4,15	83,0
6	1,97	98,3	4,59	91,8
TB	91,0		89,4	
SD	0,09		0,29	
RSD	4,90		6,42	

Bảng PL 4.3. Độ lặp lại và độ thu hồi của fenfluramin

Mẫu	5 mg/g		10 mg/g	
	C tính	R%	C tính	R%
1	4,64	92,7	9,86	98,6
2	5,21	104,2	8,74	87,4
3	4,82	96,5	9,24	92,4
4	5,00	100,0	10,2	102,3
5	5,00	100,0	9,41	94,1
6	5,22	104,3	9,01	90,1
TB	99,6		94,1	
SD	4,49		5,85	
RSD	8,32		7,50	

Bảng PL 4.4. Độ lặp lại và độ thu hồi của loperamid

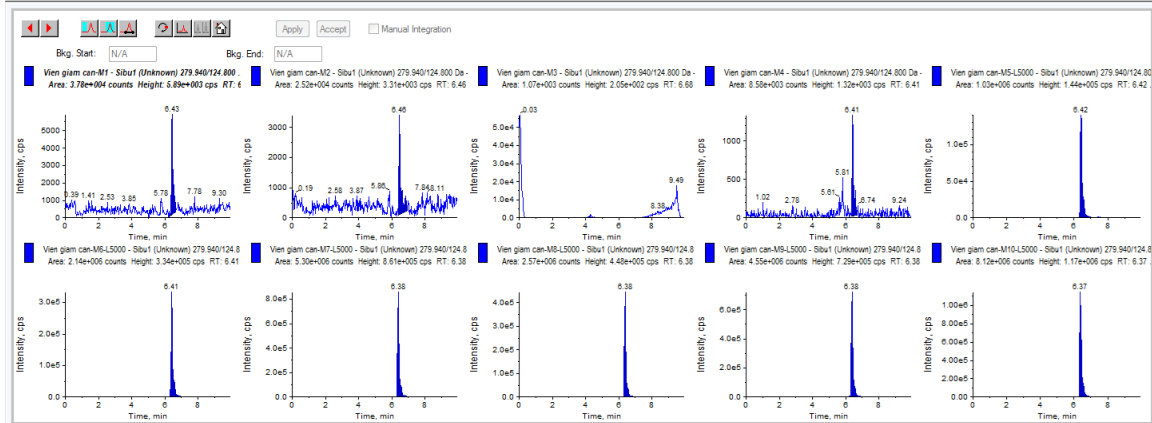
Mẫu	5 mg/g		10 mg/g	
	C tính	R%	C tính	R%
1	5,35	107,0	9,08	90,8
2	5,46	109,1	8,03	80,3
3	5,07	101,4	8,17	81,7
4	5,44	108,7	8,82	88,2
5	5,44	108,7	8,26	82,6
6	5,45	109,0	9,10	91,0
TB	107,3		85,8	
SD	2,79		5,58	
RSD	8,32		7,50	

Bảng PL 4.5. Độ lặp lại và độ thu hồi của phenylpropanolamin

Mẫu	5 mg/g		10 mg/g	
	C tính	R%	C tính	R%
1	4,70	94,00	9,75	97,51
2	5,29	105,70	8,60	86,03
3	4,96	99,28	8,92	89,18
4	4,73	94,61	10,18	101,83
5	5,37	107,50	9,12	91,17
6	5,09	101,85	8,87	88,71
TB	100,5		92,4	
SD	3,45		4,02	
RSD	5,56		6,51	

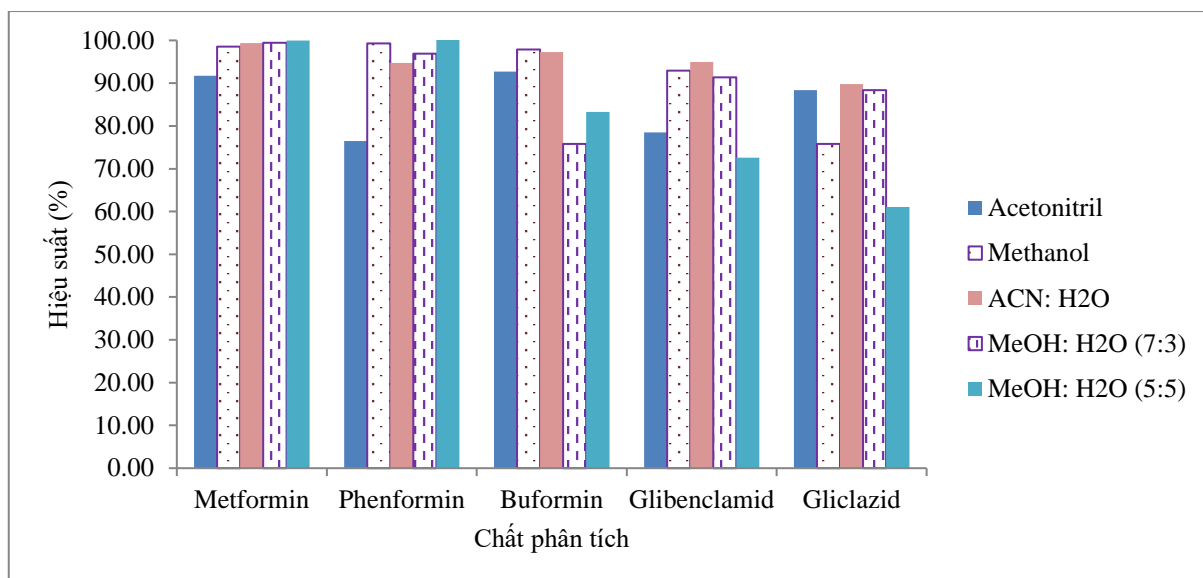
Sat: Unsorted

	Sample Name	Sample ID	Sample Type	File Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration <small>mg/mL</small>	Standard Query Status	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration <small>mg/mL</small>	Accuracy (%)
16	Vien giam can-M1		Unknown	201912	3.78e+004	5.89e+003	N/A	N/A			0.0946	N/A
17	Vien giam can-M2		Unknown	201912	2.52e+004	3.31e+003	N/A	N/A			< 0	N/A
18	Vien giam can-M3		Unknown	201912	1.07e+003	2.05e+002	N/A	N/A			< 0	N/A
19	Vien giam can-M4		Unknown	201912	8.58e+003	1.32e+003	N/A	N/A			< 0	N/A
20	Vien giam can-M5-L5000		Unknown	201912	1.03e+006	1.44e+005	N/A	N/A			8.81	N/A
21	Vien giam can-M6-L5000		Unknown	201912	2.14e+006	3.34e+005	N/A	N/A			18.6	N/A
22	Vien giam can-M7-L5000		Unknown	201912	5.30e+006	8.61e+005	N/A	N/A			46.4	N/A
23	Vien giam can-M8-L5000		Unknown	201912	2.57e+006	4.48e+005	N/A	N/A			22.5	N/A
24	Vien giam can-M9-L5000		Unknown	201912	4.55e+006	7.29e+005	N/A	N/A			39.9	N/A
25	Vien giam can-M10-L5000		Unknown	201912	8.12e+006	1.17e+006	N/A	N/A			71.4	N/A

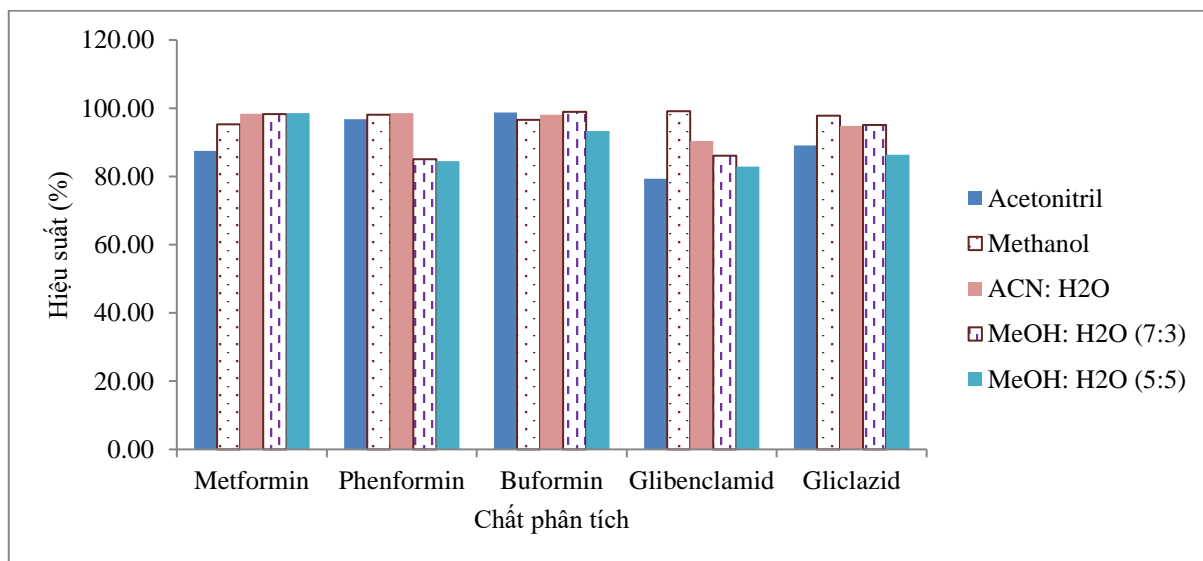


Hình PL 4.16. Sắc ký đồ mẫu TPBVSK dạng viên nang cứng dương tính với sibutramin

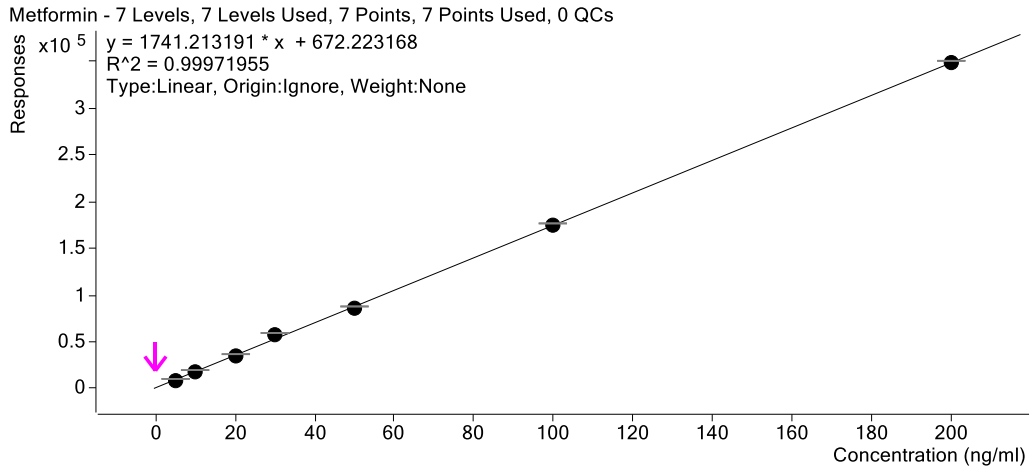
Phụ lục 5. Kết quả của phương pháp LC-MS/MS xác định một số chất cấm trong TPBVSK hỗ trợ tiểu đường



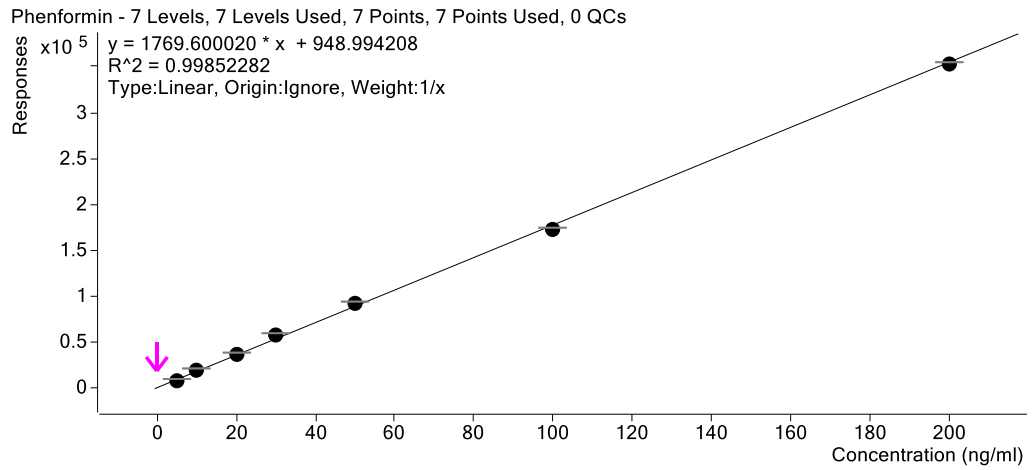
Hình PL 5.1. Độ thu hồi các chất hỗ trợ tiểu đường tại dung môi chiết khác nhau trên mẫu viên nang mềm



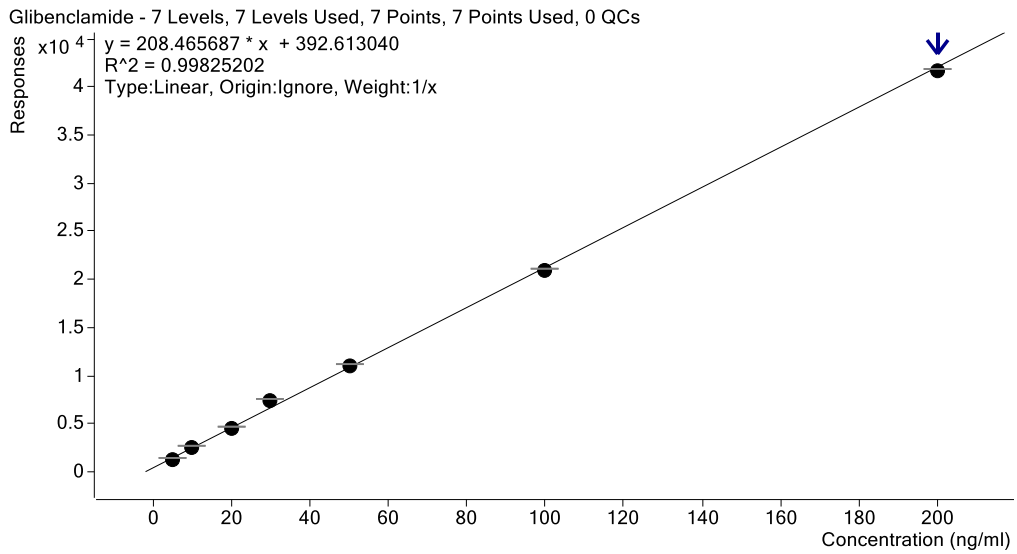
Hình PL 5.2. Độ thu hồi các chất hỗ trợ tiểu đường tại dung môi chiết khác nhau trên mẫu dạng lỏng



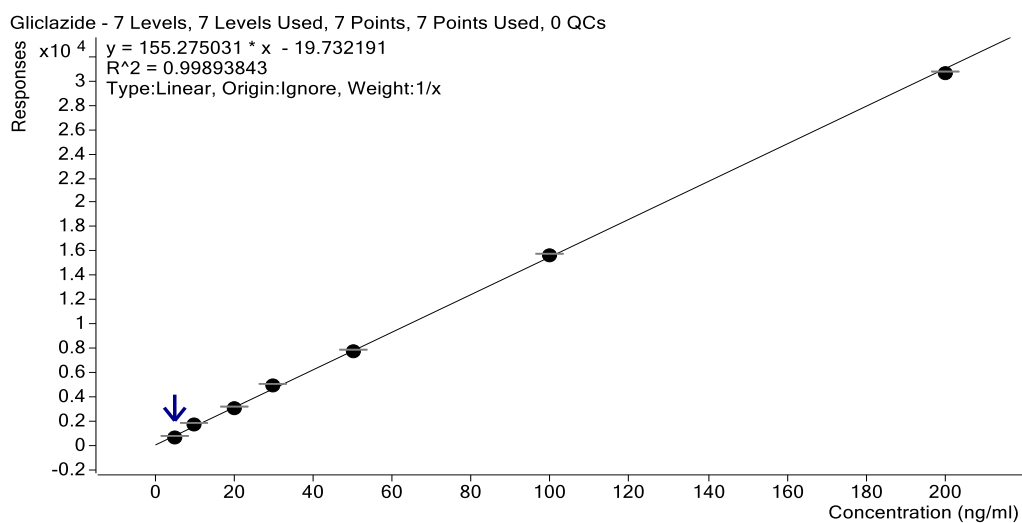
Hình PL 5.3. Đường chuẩn phân tích metformin



Hình PL 5.4. Đường chuẩn phân tích phenformin



Hình PL 5.5. Đường chuẩn phân tích glibenclamid



Hình PL 5.6. Đường chuẩn phân tích gliclazid

Bảng PL 5.1. Độ lặp lại và độ thu hồi của metformin

Mức Mẫu	10 mg/kg		5 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg	
	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Hàm lượng	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%
1	8,98	89,77	4,69	93,78	1,92	96,24	0,85	84,97
2	9,02	90,20	4,66	93,12	1,95	97,49	0,82	82,26
3	9,16	91,56	4,62	92,46	1,83	91,31	0,91	90,74
4	8,49	84,89	4,20	83,92	2,09	104,45	0,90	89,52
5	9,06	90,59	4,62	92,46	1,83	91,43	0,91	90,86
6	8,99	89,94	4,66	93,24	2,05	102,37	0,83	83,21
Độ thu hồi TB (%)	89,49		91,50		97,21		86,93	
SD (%)	2,34		3,75		5,45		3,90	
RSD (%)	2,62		4,10		5,60		4,49	

Bảng PL 5.2. Độ lặp lại và độ thu hồi của phenformin

Mức Mẫu	10 mg/kg		5 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg	
	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Hàm lượng	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%
1	9,38	93,81	5,02	100,33	1,96	97,85	0,97	97,02
2	8,60	85,99	4,68	93,53	1,98	99,15	0,91	91,19
3	8,91	89,08	4,63	92,68	1,76	88,15	1,01	100,97
4	9,88	98,83	4,81	96,12	1,97	98,73	0,96	95,76
5	9,43	94,25	4,89	97,80	1,98	99,15	1,03	102,70
6	9,52	95,19	5,12	102,43	1,94	97,08	1,00	99,74
Độ thu hồi TB (%)	92,86		97,15		96,69		97,90	
SD (%)	4,59		3,81		4,26		4,15	
RSD (%)	4,94		3,92		4,40		4,24	

Bảng PL 5.3. Độ lặp lại và độ thu hồi của glibenclamid

Mức Mẫu	10 mg/kg		5 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg	
	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Hàm lượng	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%
1	10,0	100,1	5,29	105,8	1,81	90,48	0,98	97,58
2	9,34	93,38	4,62	92,40	2,07	103,5	0,84	84,29
3	10,7	106,8	5,23	104,7	1,96	98,23	0,84	83,76
4	9,46	94,63	5,04	100,7	1,94	97,14	1,03	103,0
5	10,5	104,9	4,58	91,60	2,17	108,6	0,84	84,29
6	8,95	89,49	4,95	98,93	1,98	98,84	0,93	92,70
Độ thu hồi TB (%)	98,22		99,03		99,47		90,94	
SD (%)	6,85		6,01		6,13		8,15	
RSD (%)	6,97		6,07		6,16		8,97	

Bảng PL 5.4. Độ lặp lại và độ thu hồi của gliclazid

Mức Mẫu	10 mg/kg		5 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg	
	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Hàm lượng	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%	Hàm lượng	Độ thu hồi (R)%
1	8,48	84,80	4,73	94,65	1,75	87,66	0,88	87,95
2	8,89	88,92	4,34	86,81	1,98	98,85	0,88	88,50
3	9,13	91,26	4,46	89,23	1,83	91,63	0,91	90,59
4	9,70	97,00	4,54	90,78	1,92	96,03	0,87	87,19
5	8,20	82,00	4,47	89,30	1,75	87,59	0,86	86,13
6	8,42	84,24	4,81	96,12	1,83	91,63	1,03	102,57
Độ thu hồi TB (%)	88,04		91,15		92,23		90,49	
SD (%)	5,53		3,55		4,50		6,11	
RSD (%)	6,28		3,89		4,88		6,75	