

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN TÍCH PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI MỘT SỐ THUỐC GIẢM ĐAU, KHÁNG VIÊM NHÓM NSAID TRỘN LẤN TRONG CHẾ PHẨM ĐÔNG DƯỢC BẰNG LC-MS/MS

Đào Thị Cẩm Minh^{1,2}, Thái Khoa Bảo Châu^{1,2}, Trần Hữu Dũng¹

Phạm Thị Thanh Hà², Nguyễn Thị Kiều Anh²

(1) Trường Đại học Y Dược – Đại học Huế

(2) Trường Đại học Dược Hà Nội

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Thuốc giảm đau, kháng viêm NSAID là nhóm thuốc phổ biến thường được trộn trái phép vào chế phẩm đông dược, nhất là trong các chế phẩm điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp và đã gây ra rất nhiều độc tính, tai biến cho người bệnh. **Mục tiêu:** Xây dựng quy trình định lượng đồng thời paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS và ứng dụng phương pháp được xây dựng để kiểm tra chất lượng một số chế phẩm đông dược. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu trắng dựa trên bài thuốc cổ truyền “Độc hoạt kí sinh thang”. Xây dựng phương pháp phân tích và thẩm định theo hướng dẫn của AOAC và ICH. **Kết quả:** Phương pháp LC-MS/MS sử dụng kỹ thuật ion hóa phun điện tử ESI với chế độ bắn phá ion dương định lượng đồng thời paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen trộn lẫn trong chế phẩm đông dược đã được xây dựng. Phương pháp có tính đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện thấp (0,076 - 0,5ng/ml), hệ số tương quan $r > 0,995$; độ lặp lại đáp ứng yêu cầu của AOAC. **Kết luận:** Đã xây dựng phương pháp phân tích đồng thời paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen có thể trộn trái phép trong chế phẩm đông dược; ứng dụng phương pháp phát hiện 3 mẫu dương tính với paracetamol, indomethacin trong 30 mẫu đông dược trên thị trường.

Từ khóa: paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, chế phẩm đông dược, LC-MS/MS.

Abstract

DETERMINATION OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ADULTERATED IN HERBAL MEDICINES BY LC – MS/MS

Dao Thi Cam Minh^{1,2}, Thai Khoa Bao Chau^{1,2}, Tran Huu Dung¹

Pham Thi Thanh Ha², Nguyen Thi Kieu Anh²

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy – Hue University

(2) Ha Noi University of Pharmacy

Background: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs commonly adulterated in herbal medicines, especially in products used in the treatment and supportive treatment of osteoarthritis, have caused a lot of toxicities, catastrophes for the sick. **Objectives:** Determination paracetamol, piroxicam, indomethacin and ketoprofen adulterated in herbal medicines by LC-MS/MS; applied methods in real herbal preparations. **Materials and methods:** Blank matrix is based on a traditional remedy (Vietnam Pharmacopeia IV). The analytical method is developed and validated in accordance with AOAC and ICH guidelines. **Results:** The simple and rapid extraction method gives high extraction efficiency (over 85%). LC-MS condition using Electrospray Ionization technique with positive mode separated 4 substances clearly with good peak shapes and relatively short retention time, a low detection limit (0.076-0.5ng/ml), correlation coefficients $r > 0.995$; Repeatability meets AOAC requirements. **Conclusions:** Developed a method for the simultaneous analysis of paracetamol, piroxicam, indomethacin, and ketoprofen that can be mixed illegally in herbal medicines. Detected 3 positive samples with paracetamol, indomethacin in herbal medicinal products on the market.

Keywords: Paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen, herbal medicines, LC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đã từ lâu các loại thuốc đông dược và thực phẩm chức năng có nguồn gốc từ đông dược ngày càng được sử dụng rộng rãi trên thị trường trong nước và trên toàn thế giới. Tuy nhiên gần đây có nhiều báo cáo cho thấy một số thuốc và thực phẩm chức năng có nguồn gốc đông dược đã được làm giả mạo bằng cách trộn thêm các tân dược nhằm cải thiện tác dụng và rút ngắn thời gian điều trị. Trong đó nhóm thuốc giảm đau kháng viêm NSAID là nhóm thuốc phổ biến hay được phát hiện trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược dùng điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp. Tại Việt Nam, liên tục có các báo cáo công bố về việc phát hiện tân dược giảm đau, kháng viêm NSAID trong chế phẩm đông dược. Năm 2001, Nguyễn Thị Lâm và cộng sự đã phát hiện mẫu thuốc ban nóng ho của hãng Việt Nam Đông Dược có chứa paracetamol [1]. Năm 2009, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương phát hiện thuốc Giải Biểu Hoàn của một lương y ở Bắc Giang và thuốc Chỉ Thống của một lương y ở Bắc Ninh có trộn paracetamol, một số mẫu thuốc đông dược điều trị gút cũng bị phát hiện có paracetamol và indomethacin [3]. Dùng các chế phẩm đông dược có trộn lẫn tân dược nhóm NSAID với liều lớn và kéo dài rất nguy hiểm cho người bệnh với các biến chứng và tác dụng phụ nguy hiểm như buồn nôn, nôn, xuất huyết dạ dày, phản ứng da nghiêm trọng, rối loạn huyết học, suy thượng thận... [7]. Vì vậy, công tác kiểm tra phát hiện các loại tân dược trộn trái phép vào thuốc đông dược là việc làm rất cấp thiết và cần thiết, nhằm đảm bảo an toàn tính mạng cho người bệnh.

Trên thế giới đã có một số công bố về các phương pháp định tính, định lượng và phát hiện được rất nhiều các tân dược được trộn lẫn trong thuốc đông dược, thực phẩm chức năng rất hiện đại và cho độ chính xác cao như LC-MS/MS, HPTLC, LC-UV, NMR và LC-NMR [16]. Trong đó, LC-MS/MS là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, phù hợp với nền mẫu phức tạp như chế phẩm đông dược. Tuy nhiên, hiện nay sự pha trộn các thuốc giảm đau, kháng viêm NSAID vào đông dược ngày một phức tạp và tinh vi. Có thể một chế phẩm đông dược nhưng được pha trộn với một hay nhiều tân dược khác nhau, hay sự pha trộn tân dược với hàm lượng rất nhỏ trong một lượng thuốc đông dược rất lớn gây khó khăn rất nhiều cho công tác kiểm tra chất lượng. Do vậy, việc xây dựng một phương pháp kiểm nghiệm có thể xác định đồng thời nhiều tân dược pha trộn trái phép trong thuốc đông dược với nồng độ rất thấp rất có ý nghĩa thời sự và cấp bách để góp phần vào công tác kiểm tra phát hiện các chất cấm trộn lẫn trong

thuốc đông dược trên thị trường trong nước nhằm góp phần bảo vệ sức khỏe cho nhân dân. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu chúng tôi thực hiện đề tài này với các mục tiêu:

- *Xây dựng qui trình định tính, định lượng paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp LC-MS/MS.*

- *Ứng dụng phương pháp LC/MS để kiểm tra phát hiện một số chất cấm trộn lẫn trong thuốc đông dược trên thị trường trong nước.*

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu, thiết bị

Các chất chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc TW gồm Paracetamol (100,04%); Piroxicam (99,49%); Ketoprofen (99,54%); Indomethacin (99,7%). Các hóa chất dung môi thí nghiệm và triển khai trên LC - MS/MS đều đạt tiêu chuẩn ĐDVN IV và LCMS.

Máy sắc ký lỏng khối phổ BRUKER EVOQ Qube – Mỹ; Cột sắc ký Ultra II C18 (100mm x 2,1 mm; 1,9 μ m) – Mỹ.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

- *Mẫu trắng:* Được xây dựng dựa trên bài thuốc cổ truyền Độc hoạt kí sinh thang trong ĐDVN IV, gồm độc hoạt, phòng phong, tang ký sinh, tể tân, tần giao, đương quy, đẳng sâm, phục linh, ngư tử, đỗ trọng, quế chi, sinh địa, bạch thược, cam thảo, phụ tử chế được xay mịn, cân lấy từng loại theo tỉ lệ trong bài thuốc, đồng nhất mẫu.

- *Mẫu thử:* Các chế phẩm đông dược dạng viên nén, viên nang, viên hoàn, thuốc bột điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp, giảm đau trên thị trường Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị các dung dịch

- *Dung dịch chuẩn gốc:* Cân và pha paracetamol, piroxicam, ketoprofen và indomethacin trong dung môi methanol:H₂O (50:50) thu được dung dịch chuẩn mỗi chất nồng độ 1 mg/ml. Tiến hành pha loãng thành các dung dịch chuẩn gốc đơn có nồng độ 4000 ng/ml.

- *Dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp:* Trộn 4 dung dịch chuẩn gốc đơn trên với thể tích bằng nhau tạo thành dung dịch hỗn hợp nồng độ 1000 ng/ml.

2.3.2. Phương pháp xử lý mẫu

Qui trình xử lý gồm: đồng nhất mẫu, cân chính xác khoảng 0,5g mẫu. Thêm 20ml ether dầu hỏa, lắc xoay 5 phút, ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó gạn, sấy khô. Thêm 25ml methanol, lắc xoay 5 phút, siêu âm 10 phút, ly tâm 6000 vòng/phút

trong 10 phút, sau đó lọc lấy phần dịch phân tích trên LC - MS/MS.

2.3.3. Điều kiện LC – MS

- Khảo sát điều kiện khối phổ: khảo sát điều kiện thông số máy khối phổ xác định các mảnh mẹ, các mảnh con đặc trưng của paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen.

- Khảo sát điều kiện sắc ký: tách được đồng thời 4 chất trên nền chế phẩm đông dược mẫu trắng có pha trộn đồng thời paracetamol, piroxicam, indomethacin, ketoprofen.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Phương pháp xử lý mẫu

Tiến hành thay đổi các dung môi loại tạp, dung môi chiết, chúng tôi lựa chọn được phương pháp xử lý mẫu như mục 2.3.2. Theo các nghiên cứu trước đây, các mẫu đông dược phân tích bằng phương pháp LC/MS thường được xử lý bằng phương pháp chiết trực tiếp, không có các bước làm sạch tạp dược liệu. Đối với các dạng viên nang, viên nén, bột, mẫu được nghiền nhỏ và làm đồng nhất, chiết hoạt chất với dung môi (methanol, acetonitril) hoặc hỗn

hợp dung môi với H₂O, sau đó ly tâm, lọc và pha loãng, với chế phẩm ở dạng lỏng đơn giản chỉ cần pha loãng với dung môi [1],[2],[5],[9],[10]. Trong đề tài này, chúng tôi đã xây dựng quy trình xử lý mẫu thêm bước loại bớt tạp dược liệu bằng ether dầu hỏa trước khi chiết bằng methanol. Phương pháp chiết tiến hành đơn giản, nhanh chóng, cho hiệu suất chiết tương đối cao (trên 85%) đồng thời vẫn làm sạch được mẫu, góp phần giúp nghiên cứu đạt giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp.

3.2. Chọn điều kiện sắc ký

Sử dụng các dung dịch chuẩn đơn nồng độ 4000 ng/ml tiêm không qua cột vào hệ thống MS để xác định ion mẹ, ion con định lượng và ion con định tính đối với mỗi chất. Năng lượng bắn phá phân mảnh ion (CE) được tối ưu hóa tự động theo thiết bị khối phổ. Từ đó chúng tôi có các điều kiện khối phổ như Bảng 1 và Bảng 2. Phương pháp đạt yêu cầu theo quy định của Châu Âu (2002/657/EC) khi có ít nhất 4 điểm IP (1 ion mẹ và 2 ion con định tính và định lượng) [6]. Thay đổi các thông số sắc ký lỏng, chúng tôi lựa chọn được điều kiện sắc ký lỏng tách 4 chất phân tích với pic gọn cân đối, tách rõ ràng, thời gian lưu tương đối ngắn.

Bảng 1. Các thông số máy khối phổ MS

Thông số (đơn vị)	Giá trị tối ưu
Điện áp đầu phun	3500
Khí chần	20psi
Nhiệt độ nóng (°C)	250
Khí ion hóa 1	40psi
Nhiệt độ ion hóa (°C)	300
Khí ion hóa 2	50psi
CID gas	Ar 1.5mTorr

Bảng 2. Điều kiện MS của paracetamol, piroxicam, ketoprofen và indomethacin

Tên chất	Ion mẹ	Ion con	CE (eV)	Tỉ lệ (%)
Paracetamol	152,1	110,1	13	74
		93,2	20	26
Piroxicam	332,1	95,2	15	63
		121,1	19	37
Ketoprofen	255,1	209	10	58
		105,1	19	42
Indomethacin	358,1	139	16	75
		111,1	42	25

Qua kết quả khảo sát, nhóm nghiên cứu đã chọn điều kiện sắc ký và khối phổ gồm: thể tích tiêm: 2µl; tốc độ dòng: 0,3 ml/phút; các điều kiện khối phổ theo Bảng 1 và Bảng 2; thời gian: 8 phút; pha động gồm acid formic 0,1% trong nước (A) và acetonitril (B); tỉ lệ pha động: gradient (0 phút, 30% B; 5 phút, 80% B; 6 phút, 80% B; 6,5 phút, 30% B; 8 phút, 30% B).

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ phù hợp của hệ thống

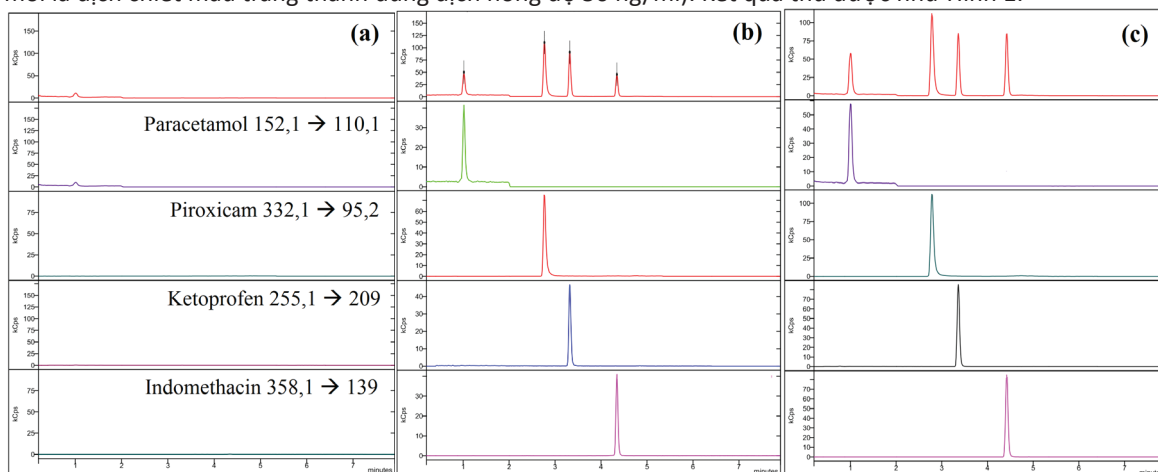
Tiêm lặp lại sáu lần dung dịch chuẩn hỗn hợp 50 ng/ml vào hệ thống LC-MS/MS. Kết quả phân tích (Bảng 3) cho thấy hệ số biến thiên (RSD) của thời gian lưu thấp (< 1%) và RSD của diện tích pic dao động trong khoảng 1,51 - 7,03% tùy mỗi chất. Như vậy hệ thống đáp ứng yêu cầu theo AOAC 2016, ICH 2005 (RSD < 15% với mức nồng độ ≤ 100ppb) [4],[8].

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống LC-MS/MS

Hoạt chất	Paracetamol		Piroxicam		Ketoprofen		Indomethacin	
	t_R (phút)	S_{pic} (Cps)	t_R (phút)	S_{pic} (Cps)	t_R (phút)	S_{pic} (Cps)	t_R (phút)	S_{pic} (Cps)
L1	1,02	261385	2,80	574407	3,38	317490	4,43	345937
L2	1,01	264940	2,80	584155	3,39	319830	4,45	335064
L3	1,03	265613	2,79	579943	3,37	330282	4,44	338439
L4	1,03	269278	2,80	582515	3,40	325909	4,45	334591
L5	1,02	272659	2,81	594967	3,39	332863	4,44	327089
L6	1,02	269740	2,83	685242	3,39	321233	4,44	336126
TB	1,02	267269,17	2,81	600204,83	3,387	324601,17	4,442	336207,67
RSD	0,74	1,51	0,42	7,031	0,20	1,884	0,169	1,818

3.3.2. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá thông qua kết quả phân tích mẫu trắng (xử lý theo quy trình xử lý mẫu), mẫu chuẩn (từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng với dung môi là methanol:H₂O (50:50) thành dung dịch 50 ng/ml) và mẫu trắng thêm chuẩn (từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng với dung môi là dịch chiết mẫu trắng thành dung dịch nồng độ 50 ng/ml). Kết quả thu được như Hình 1.



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

Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trùng với thời gian của 4 chất phân tích. Trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, các pic xuất hiện trùng thời gian lưu với mẫu trắng thêm chuẩn, các pic đều có hình dạng đẹp, cân đối. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu.

Kết quả trên cho thấy phương pháp LC/MS là phương pháp phù hợp trong việc phân tích trên nền mẫu có nhiều thành phần như mẫu đông được. Trên các dạng nền mẫu đông được khác nhau như

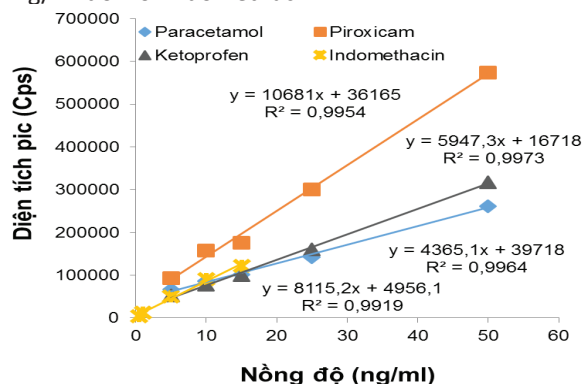
hoàn cứng, viên nén, viên nang, thuốc bột chứa các thành phần dược liệu và tá dược phức tạp, đa dạng, khác nhau về cả tỉ lệ và thành phần giữa các nhà sản xuất, các phương pháp sắc ký thông thường như TLC, HPLC, HPTLC có thể gặp phải khó khăn trong việc phân biệt giữa chất phân tích và nền mẫu. Nếu chỉ dựa vào kết quả TLC bằng cách so sánh tương quan quãng đường dịch chuyển với chất chuẩn thì có thể dẫn đến kết quả dương tính giả, phát hiện được nhiều mẫu dương tính hơn so với thực tế vì có

thể là vết dược liệu trùng với chuẩn. Đối với HPLC và HPTLC, tiến hành so sánh thời gian lưu, quét phổ và chồng phổ với chất chuẩn sẽ cho kết quả chính xác hơn. Tuy nhiên việc tách hoàn toàn chất phân tích ra khỏi nền mẫu đông dược phức tạp vẫn còn rất khó khăn. Điều này dẫn đến khi chồng phổ, một số chất có cùng thời gian lưu và cực đại hấp thụ tại các bước sóng như chất chuẩn nhưng hình dạng pic không hoàn toàn trùng khớp (hệ số match không đạt). Trong trường hợp này, nếu không xác định là dương tính thì có thể bị bỏ qua các mẫu có trộn trái phép (âm tính giả) còn nếu xác định là dương tính thì kết luận không có độ chính xác cao, kết quả định lượng sẽ bị sai do đã định lượng thêm cả thành phần dược liệu vào [1],[2]. Vì vậy, đề tài chúng tôi xây dựng phương pháp LC/MS nhằm khắc phục các khó khăn trên, với ưu điểm vượt trội về độ nhạy và độ đặc hiệu, phương pháp có khả năng loại bỏ sự ảnh hưởng của nền mẫu dược liệu phức tạp, thích hợp với hầu hết các nền chế phẩm đông dược trên thị trường và cho kết quả chính xác hơn.

3.3.3. Khoảng tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp pha loãng thành dãy chuẩn hỗn hợp các chất nồng độ từ 0,5 - 50 ng/ml bằng methanol:H₂O (50:50). Xây dựng đường biểu diễn sự phụ thuộc giữa tỷ lệ diện tích pic các chất với nồng độ các chất được thể hiện trong Hình 2. Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến

tính giữa nồng độ và diện tích pic ($r > 0,995$) trong khoảng nồng độ 5 – 50 ng/ml đối với paracetamol, piroxicam, ketoprofen và khoảng nồng độ 0,5 – 15 ng/ml đối với indomethacin.



Hình 2. Đường chuẩn tuyến tính của paracetamol, piroxicam, ketoprofen và indomethacin

3.3.4. Độ đúng

Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng theo quy trình chiết đã xây dựng, thêm chuẩn ở 3 nồng độ 5 ng/ml, 25 ng/ml và 50 ng/ml, mỗi nồng độ tiến hành phân tích trên 3 lần. Kết quả ở Bảng 4 thể hiện tỷ lệ thu hồi của 4 chất phân tích dao động trong khoảng từ 85,07 - 109,13%, cho thấy phương pháp được xây dựng cho độ thu hồi đáp ứng theo yêu cầu của AOAC 2016 (trong khoảng 80,0 - 110,0% ở nồng độ 100ppb) [4].

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Nồng độ	Paracetamol		Piroxicam		Ketoprofen		Indomethacin	
	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)
LQC (5 ppb)	5,30	106,00	5,05	101,00	4,65	93,00	4,17	83,40
	5,27	105,40	5,21	104,20	4,81	96,20	4,34	86,80
	5,41	108,20	5,35	107,00	4,72	94,40	4,25	85,00
TB		106,53		104,07		94,53		85,07
RSD (%)		1,38		2,88		1,70		2,00
MQC (25 ppb)	25,43	101,72	26,48	105,92	23,82	95,28	22,95	91,80
	24,75	99,00	25,98	103,92	22,51	90,04	23,57	94,28
	25,33	101,32	27,03	108,12	23,64	94,56	24,32	97,28
TB		100,68		105,99		93,29		94,45
RSD (%)		1,46		1,98		3,04		2,91
HQC (50 ppb)	56,07	112,14	52,43	104,86	48,16	96,32	44,55	89,10
	56,65	113,30	50,93	101,86	49,21	98,42	46,48	92,96
	50,98	101,96	50,90	101,80	49,41	98,82	45,84	91,68
TB		109,13		102,84		97,85		91,25
RSD (%)		5,72		1,70		1,37		2,15

3.3.5. Độ lặp lại

Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng theo quy trình chiết đã xây dựng, thêm chuẩn ở nồng độ 50 ng/ml, phân tích lặp lại 6 lần. Kết quả phân tích (Bảng 5) thể hiện giá trị lặp lại của 4 chất phân tích có RSD nằm trong khoảng 2,38 - 4,37%, cho thấy phương pháp đã xây dựng cho độ lặp lại đáp ứng theo yêu cầu của AOAC 2016 và 2002/657/EC (RSD < 15% ở nồng độ 100ppb) [4],[6].

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Paracetamol		Piroxicam		Ketoprofen		Indomethacin	
C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)	C _{tìm lại} (ppb)	Độ thu hồi (%)
51,42	103,84	52,43	104,86	48,16	96,32	44,55	89,11
56,07	112,14	50,93	101,86	49,21	98,43	46,48	92,97
56,65	113,31	50,90	101,79	52,09	104,19	45,84	91,69
50,98	101,96	52,13	104,25	50,26	100,52	45,25	90,50
53,78	107,56	54,24	108,47	49,41	98,81	45,56	91,12
54,80	109,65	52,65	105,29	47,70	95,39	43,06	86,12
TB	107,91	TB	104,43	TB	98,94	TB	90,25
RSD (%)	4,37	RSD (%)	2,38	RSD (%)	3,19	RSD (%)	2,65

3.3.6. LOD và LOQ

Xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp bằng cách phân tích các chất ở nồng độ thấp và xác định giá trị tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N). LOD được xác định tại nồng độ có S/N khoảng bằng 3 và LOQ được xác định ở nồng độ có S/N khoảng bằng 10.

Tiến hành pha loãng dần dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp để xác định giá trị S/N của 4 chất trên sắc ký đồ thu được. Kết quả LOD của 4 chất paracetamol, piroxicam, ketoprofen, indomethacin lần lượt là 0,5 ng/ml; 0,076 ng/ml; 0,152 ng/ml; 0,076 ng/ml và LOQ tương ứng là 1,5 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,5 ng/ml; 0,25 ng/ml.

Hyung Joo Kim và cộng sự (2014) đã xây dựng phương pháp LC/MS với chế độ ESI để phát hiện các chất giảm đau chống viêm không steroid trộn lẫn trong thực phẩm chức năng và thuốc đông dược trên thị trường Hàn Quốc với giới hạn định lượng paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen lần lượt là 100; 20; 25 và 0,5 ng/ml [7]. Với kết quả thu được như trên, chúng tôi đã xây dựng phương pháp LC/MS với giới hạn phát hiện trong khoảng 0,076 - 0,5 ng/ml và giới hạn định lượng trong khoảng 0,25 - 1,5 ng/ml, thấp hơn nhiều lần so với nghiên cứu của Hyung Joo Kim. Trong nghiên cứu của Hyung Joo Kim các mẫu đông dược được xử lý bằng cách chiết siêu âm trực tiếp với dung môi methanol:H₂O (70:30), đây là hỗn hợp dung môi chiết ra rất nhiều thành phần dược liệu trong chế phẩm đông dược. Nhưng nghiên cứu đã không sử dụng bất kì một bước loại tạp nào, việc

đưa dịch chiết chứa nhiều tạp dược liệu vào hệ thống LC/MS đã làm nhiễu đường nền khi phân tích LCMS tăng lên, dẫn tới giảm giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Với phương pháp xử lý mẫu sử dụng ether dầu hỏa loại tạp dược liệu trước khi chiết bằng methanol, mẫu phân tích trong nghiên cứu của chúng tôi được làm sạch hơn nên phương pháp có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp hơn, thích hợp để phát hiện và định lượng các chất paracetamol, piroxicam, ketoprofen và indomethacin dù với lượng rất nhỏ trong chế phẩm đông dược, vốn luôn được pha trộn trái phép một cách cố ý.

3.4. Ứng dụng phương pháp

Để kiểm định độ chính xác và độ nhạy của phương pháp LC-MS/MS được xây dựng, nhóm nghiên cứu đã thu thập và phân tích trên 30 mẫu chế phẩm đông dược dạng viên nén, viên nang, viên hoàn, thuốc bột chỉ định điều trị, hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp trên thị trường. Nhằm giúp cho việc phát hiện các tân dược trộn lẫn trong chế phẩm đông dược được chính xác, với độ tin cậy cao hơn. Ngoài việc dựa vào thời gian lưu và phổ đồ của các chất phân tích như trong các nghiên cứu của tác giả Maciej J. Bogusz [5], Hyung Joo Kim [9], Akash A. Savaliya [10], chúng tôi tiến hành xác định thêm tỉ lệ của hai mảnh ion con đặc trưng bị bắn phá, giúp tăng độ chính xác và tin cậy của phép định tính, khẳng định đúng sự có mặt của các chất trộn lẫn.

Ứng dụng phương pháp LC-MS/MS được xây dựng để tiến hành phân tích trên 30 mẫu thuốc đông dược thu thập trên thị trường cả nước. Kết

quả cho thấy không phát hiện mẫu nào dương tính với piroxicam và ketoprofen, trong khi có hai mẫu dương tính với paracetamol (105,1 mg/g và 78,08 mg/g). Đồng thời phát hiện một mẫu dương tính với cả hai chất paracetamol (349 mg/g) và indomethacin (101,5 mg/g). Điều đó đã cho thấy tính ưu việt của phương pháp này trong việc xác định được đồng thời nhiều tân dược trộn lẫn trong một mẫu đồng dược trên cùng một lần phân tích, nhằm đảm bảo kết quả phân tích chính xác, nhanh chóng và tiện lợi.

4. KẾT LUẬN

Như vậy, phương pháp LC-MS/MS được xây dựng có thể phân tích đồng thời paracetamol, piroxicam, indomethacin và ketoprofen có thể trộn trái phép trong chế phẩm đông dược dùng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh về xương khớp. Phương pháp được thực hiện với kỹ thuật xử lý mẫu đơn giản,

dung môi chiết ít độc hại, phương pháp có tính đặc hiệu cao với số điểm IP = 4, có giới hạn phát hiện thấp (0,076 - 0,5 ng/ml), khoảng nồng độ tuyến tính thuộc khoảng 5 – 50 ng/ml đối với paracetamol, piroxicam, ketoprofen và 0,5 – 15 ng/ml đối với indomethacin (với $r > 0,995$); độ lặp lại và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC 2016 (RSD < 15%, độ thu hồi trong khoảng 80,0 - 110,0% ở nồng độ 100ppb).

Kết quả phân tích trên 30 mẫu chế phẩm đông dược đã phát hiện 3 chế phẩm có sự pha trộn trái phép các NSAID. Đây là một kết quả phân tích có ý nghĩa rất lớn về khoa học và giá trị thực tiễn trong công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc, thể hiện tính ưu việt của phương pháp khi trên một lần phân tích có thể xác định được sự có mặt hay không của nhiều tân dược nhóm giảm đau, kháng viêm NSAID trong mẫu chế phẩm đông dược, cho kết quả chính xác, nhanh chóng và tiết kiệm thời gian.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lâm và cộng sự (2001), "Một số kinh nghiệm về việc phát hiện thuốc tân dược trộn trái phép vào thuốc đông dược", *Kỷ yếu các công trình nghiên cứu khoa học 1996-2000, Viện Kiểm nghiệm – Bộ Y tế*, tr.95-98.
2. Đào Thị Cẩm Minh, Nguyễn Thị Hà, Lê Thị Trâm, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh (2016), "Xây dựng phương pháp xác định một số thuốc giảm đau, chống viêm trộn lẫn trong chế phẩm đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 4+5, tr. 91-96.
3. Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Công tác kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc năm 2010, định hướng năm 2011*, Báo cáo hội nghị Kiểm nghiệm.
4. AOAC International (2016), Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC Official Methods of Analysis, pp. 1-18.
5. Bogusz M. J., Hassan H., et al. (2006), "Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2), pp. 554-564.
6. European Commission (2002), Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/

EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities, pp. 8-36.

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

8. International Conference on Harmonisation (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology, ICH harmonised tripartite guideline, pp. 1-13.

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

10. Savaliya A. A., Prasad B., et al. (2009), "Detection and characterization of synthetic steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian ayurvedic/herbal products using LC-MS/TOF", *Drug Testing and Analysis*, 1(8), pp. 372-381.