

QĐ-BYT ngày 19 tháng 7 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế).

5. Hán Mạnh Hưng (2018), "Phân tích sử dụng thuốc và đánh giá kỹ thuật sử dụng các dạng bào chế đặc biệt của thuốc điều trị ĐTĐ typ 2 tại Khoa Khám bệnh - Bệnh viện Quân y 105", *Luận án Chuyên khoa 2, Trường Đại học Dược Hà Nội*.

6. Trần Ngọc Phương (2017), "Khảo sát kiến thức về sử dụng insulin và thực hành sử dụng bút tiêm insulin ở bệnh nhân đái tháo đường điều trị ngoại trú tại Bệnh viện Nội tiết Trung ương", *Luận án Thạc sỹ Dược, Đại học Dược Hà Nội*.

7. Bahendeka Silver, Kaushik Ramaiya, Swai Andrew Babu, Otieno Fredrick, Bajaj Sarita, Kalra Sanjay, Bavuma Charlotte M, Karigire Claudine (2019), "EADSG guidelines: Insulin storage and optimisation of injection technique in diabetes management", *Diabetes Therapy*, 10(2), pp. 341-366.

8. Blanco M, Hernández MT, Strauss KW, Amaya M (2013), "Prevalence and risk factors of lipohypertrophy in insulin-injecting patients with diabetes", *Diabetes & Metabolism*, 39(5), pp. 445-453.

9. Canada diabete Association (2012), *FIT Forum for Injection Technique Canada. Recommendations for Best Practice Injection Technique*.

10. De Coninck Carina, Frid Anders, Gaspar Ruth, Hicks Debbie, Hirsch Larry, Kreugel Gillian, Liersch Jutta, Letondeur Corinne, SAUVANET Jean-Pierre, Tubiana Nadia (2010), "Results and analysis of the 2008–2009 insulin injection technique questionnaire survey", *Journal of Diabetes*, 2(3), pp. 168-179.

11. Federation International Diabetes (2017), *IDF diabetes atlas eighth edition 2017*.

12. Forough Aida Sefidani, Esfahani Parsa Riazzi (2017), "Impact of pharmacist intervention on appropriate insulin pen use in older patients with type 2 diabetes mellitus in a rural area in Iran", *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 6(2), pp. 114.

13. Frid Anders H, Hirsch Laurence J, Menchior Astrid R, Morel Didier R, Strauss Kenneth W (2016), "Worldwide injection technique questionnaire study: population parameters and injection practices", *Mayo Clinic Proceedings, Elsevier*, pp. 1212-1223.

14. Fukuda, M. et al (2015), "Survey of Hypoglycemia in elderly people with type 2 diabetes mellitus in Japan", *J. Clin. Med. Res.*, 7(12), pp. 967-978.

15. Gradel Anna Katrina Jógvansdóttir, Porsgaard Trine, Lykkesfeldt Jens, Seested Torben, Gram-Nielsen Sanne, Kristensen Niels Rode, Refsgaard HHF (2018), "Factors affecting the absorption of subcutaneously administered insulin: Effect on variability", *Journal of Diabetes Re16.Jasper* (2014), "Knowledge of insulin use and its determinants among Nigerian insulin requiring diabetes patients", *J. Diabetes Metab Disord U. S*, 13(1), pp. 10.

17. Siegel Jane D, Rhinehart Emily, Jackson Marguerite, Chiarello Linda, Committee Health Care Infection Control Practices Advisory (2007), "2007 guideline for isolation precautions: Preventing transmission of infectious agents in health care settings", *American Journal of Infection Control*, 35(10), pp. S65.

18. Fitzgerald James T, Funnell Martha M, Hess George E, Barr Patricia A, Anderson Robert M, Hiss Roland G, Davis Wayne K (1998), "The reliability and validity of a brief diabetes knowledge test", *Diabetes Care*, 21(5), pp. 706-710.

(Ngày nhận bài: 20/7/2020 - Ngày phản biện: 25/9/2020 - Ngày duyệt đăng: 29/9/2020)

Xây dựng quy trình phân tích đồng thời sáu hợp chất giảm glucose huyết nguy tạo trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng bằng phương pháp HPLC-PDA

Phan Trần Như Nguyệt, Nguyễn Đức Tuấn*

Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

*E-mail: ductuan@ump.edu.vn

Summary

An HPLC method was proposed to simultaneous determination of metformin, phenformin, glipizide, gliclazide, glibenclamide and glimepiride illegally added to traditional herbal medicines and food supplements as supported regime for diabetes mellitus. The above-mentioned chemical hypoglycemic agents are extracted by methanol, filtered by a membrane with pore size of 0.45 μm , and quantitatively determined by HPLC-PDA. The chromatographic conditions are as follows: InertSustain C18 column (250 x 4.6 mm; 5.0 μm), mixture of acetonitrile and 0.03% phosphoric acid as mobile phase in a gradient mode, detection wavelength at 230 nm, column temperature at 30°C, flow rate of 1.0 ml/minute, and injection volume of 10 μl . The HPLC method was validated basing on the guidelines of ICH and AOAC.

The validation results prove the proposed method is reliable and practicable. The method was applied to control 10 available traditional herbal medicines and food supplements in Tay Ninh province. As the results, nine registered samples do not contain the above-mentioned chemical hypoglycemic agents, and one sample without registration is detected containing phenformin as an illegal adulterant.

Keywords: Metformin, phenformin, glipizide, gliclazide, glibenclamide, glimepiride, herbal medicines, food supplements.

Đặt vấn đề

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới, bệnh đái tháo đường là một bệnh mạn tính có thể dẫn đến tổn hại nghiêm trọng cho cơ thể; Theo kết quả điều tra tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh đái tháo đường ở người trưởng thành từ 18 - 69 tuổi là 4,1%, trong đó chỉ có 28,9% người mắc bệnh đái tháo đường được kiểm soát và theo dõi điều trị, có nghĩa là hầu hết người mắc bệnh này (hơn 70%) không được điều trị [1]. Trong số đó có những người bệnh chọn điều trị theo các phương thuốc gia truyền và có nhiều trường hợp nguy hiểm đến tính mạng, thậm chí gây tử vong đã xảy ra do các thuốc đó bị pha trộn trái phép các dược chất điều trị đái tháo đường.

Hiện nay, việc kiểm tra sự pha trộn các dược chất trong thực phẩm chức năng (TPCN) và thuốc dược liệu điều trị đái tháo đường vẫn chưa được kiểm soát chặt chẽ, quy trình xác định sự pha trộn các dược chất này chưa có trong Dược điển Việt Nam hiện hành. Trên thế giới cũng như trong nước đã có một số công trình nghiên cứu quy trình định lượng đơn lẻ hay phối hợp các dược chất điều trị đái tháo đường pha trộn trong thuốc dược liệu và TPCN [2-8]. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào trong nước công bố quy trình phân tích đồng thời một số dược chất thường được dùng để điều trị bệnh đái tháo đường như metformin, glibenclamid, gliclazid, glimepirid, glipizid, ... nguy cơ tạo trong thuốc dược liệu và TPCN bằng phương pháp **HPLC-PDA**. Với những lý do trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm làm cơ sở để các Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm thành phố/ tỉnh kiểm tra sự pha trộn trái phép các dược chất này, đảm bảo người bệnh được sử dụng thuốc và TPCN có chất lượng, an toàn và hiệu quả.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Metformin, phenformin, glibenclamid, gliclazid, glimepirid và glipizid nguy cơ tạo trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh nhân đái tháo đường.

Chất chuẩn đối chiếu, hóa chất, dung môi, trang thiết bị

Chất chuẩn đối chiếu

Metformin hydroclorid (MET), số kiểm soát (SKS) QT168 070319, hàm lượng tính trên nguyên trạng 99,9%; gliclazid (GLC), SKS QT 137 080818, hàm lượng 99,8% và glimepirid (GLM), SKS QT173 070519, hàm lượng 99,7% được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh; glibenclamid (GLB), SKS 0103129, hàm lượng 99,7% và glipizid (GLP), SKS 0107207, hàm lượng 99,31% do Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương cung cấp; phenformin hydroclorid (PHEN), lô P7045, hàm lượng 97% của hãng Sigma Aldrich.

Hóa chất, dung môi

Methanol và acetonitril đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Aceton, methanol và acid phosphoric đạt tiêu chuẩn phân tích.

Trang thiết bị

Tất cả các thiết bị và dụng cụ phân tích đã được hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm: hệ thống **HPLC-PDA**, cân phân tích, máy lắc, bể rửa siêu âm; các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, pipet có độ chính xác phù hợp.

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch mẫu giả lập

Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu giả lập vào cốc có mỏ 50 ml, thêm khoảng 15 ml methanol, lắc đều, siêu âm 20 phút, để nguội, lọc qua giấy lọc vào bình định mức 50 ml, chiết lặp lại lần 2 với 15 ml methanol, pha loãng tới định mức bằng cùng dung môi. Hút chính xác 1 ml dung dịch thu được, cho vào bình định mức 10 ml, thêm methanol đến vạch, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch chuẩn

Cân chính xác khoảng 20,0 mg từng chất chuẩn MET, PHEN, GLP, GLC, GLB và GLM vào các bình định mức 20 ml, thêm 15 ml methanol, siêu âm 20 phút, để nguội, thêm methanol đến vạch, lắc đều, thu được các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 1000 µg/ml. Từ các dung dịch chuẩn gốc này sẽ pha các dung dịch chuẩn có nồng độ thích hợp tùy vào mục đích phân tích.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp

Cân chính xác khoảng 20,0 mg từng chất chuẩn

MET, PHEN, GLP, GLC, GLB và GLM vào bình định mức 20 ml, thêm 15 ml methanol, siêu âm 20 phút, để nguội, thêm methanol đến vạch, lắc đều, thu được hỗn hợp chuẩn gốc có nồng độ từng chất khoảng 1000 µg/ml. Từ hỗn hợp chuẩn gốc sẽ pha thành các hỗn hợp chuẩn có nồng độ thích hợp tùy vào mục đích phân tích.

Dung dịch thử giả lập

Cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu giả lập vào cốc có mỏ 50 ml, thêm lần lượt từng chất chuẩn để thu được các mẫu thử giả lập có nồng độ các chất phân tích khác nhau. Sau đó thêm khoảng 15 ml methanol, lắc đều, siêu âm 20 phút, để nguội, lọc qua giấy lọc vào bình định mức 50 ml, chiết lặp lại lần 2 với 15 ml methanol, pha loãng tới định mức bằng cùng dung môi. Hút chính xác 1 ml dung dịch thu được, cho vào bình định mức 10 ml, thêm methanol đến vạch, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch thử

Nghiền mẫu thử thành bột mịn, trộn đều, cân chính xác khoảng 0,5 g bột mẫu thử vào cốc có mỏ 50 ml, thêm khoảng 15 ml methanol, lắc đều, siêu âm 20 phút, để nguội, lọc qua giấy lọc vào bình định mức 50 ml, chiết lặp lại lần 2 với 15 ml methanol, pha loãng tới định mức bằng cùng dung môi. Hút chính xác 1 ml dung dịch thu được, cho vào bình định mức 10 ml, thêm methanol đến vạch, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Mẫu trắng: Methanol.

Phương pháp nghiên cứu

Để biết được các thành phần dược liệu thường được sử dụng trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng được sử dụng cho bệnh nhân đái tháo đường trên địa bàn tỉnh Tây Ninh, cần phải tiến hành thu thập các thuốc dược liệu đã được cấp số đăng ký và TPCN đã có quy chuẩn kỹ thuật hoặc có bản công bố phù hợp quy định an toàn thực phẩm hiện đang lưu hành.

Tiến hành thống kê các thành phần dược liệu và tần suất xuất hiện trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng, từ đó sẽ đề xuất danh mục các dược liệu thường được sử dụng. Danh mục này sẽ là cơ sở để tạo mẫu giả lập trong phòng thí nghiệm và xây dựng quy trình phân tích các hợp chất giảm glucose huyết nguy tạo trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng.

Dựa vào cấu trúc của các chất phân tích có nhóm chức phân cực, hấp thụ ánh sáng trong vùng tử ngoại và tham khảo một số tài liệu có liên quan [2, 4, 5, 8], kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo **HPLC-PDA** với đầu dò dãy diod quang được lựa chọn

để xây dựng quy trình phân tích các hợp chất giảm glucose huyết. Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký ảnh hưởng đến hiệu quả tách của phương pháp như: pha động và nồng độ acid phosphoric, chương trình rửa giải gradient, nhiệt độ cột; các điều kiện ảnh hưởng đến hiệu suất chiết như: dung môi chiết, phương pháp chiết, số lần chiết và thời gian chiết. Sau khi tìm được điều kiện sắc ký và điều kiện chiết thích hợp, tiến hành thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của ICH [9] và AOAC [10] bao gồm khảo sát tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, tính tuyến tính và miền giá trị, hiệu suất chiết, độ đúng và độ chính xác, độ ổn định và độ thô. Quy trình sau khi được thẩm định sẽ được ứng dụng để kiểm tra các hợp chất giảm glucose huyết nguy tạo trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường trên địa bàn tỉnh Tây Ninh.

Kết quả nghiên cứu

Tạo mẫu giả lập

Các kết quả điều tra cho thấy mỗi thuốc dược liệu hoặc thực phẩm chức năng có khoảng 10 thành phần dược liệu, được bào chế dưới dạng viên nang có khối lượng khoảng 500 mg và hoàn cứng với khối lượng mỗi gói khoảng 5 g. Các dược liệu có tần suất xuất hiện trên 2% được lựa chọn để tạo mẫu giả lập.

Mẫu giả lập bao gồm 14 thành phần dược liệu và khối lượng của mỗi dược liệu được tính dựa vào tần suất xuất hiện trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng (bảng 1).

Bảng 1. Các dược liệu được sử dụng để tạo mẫu giả lập

Stt	Dược liệu	Tên khoa học	Khối lượng (mg)	Tần suất (%)
1	Dây thìa canh	<i>Gymnema sylvestre</i>	88	9,55
2	Mướp đắng	<i>Momordica charantia</i>	60	6,53
3	Giảo cổ lam	<i>Herba Gynostemmae</i>	46	5,03
4	Hoài sơn	<i>Dioscorea persimilis</i>	46	5,03
5	Sinh địa	<i>Rehmannia glutinosa</i>	37	4,02
6	Mạch môn	<i>Ophiopogonis japonicus</i>	32	3,52
7	Ngũ vị tử	<i>Fructus Schisandrae</i>	32	3,52
8	Linh chi	<i>Ganoderma lucidum</i>	28	3,02
9	Thiên hoa phấn	<i>Radix Trichosanthis</i>	28	3,02
10	Đơn bì	<i>Paeonia suffruticosa</i>	23	2,51
11	Hoàng kỳ	<i>Astragalus membranaceus</i>	23	2,51
12	Câu kỷ tử	<i>Fructus Lycii</i>	19	2,01
13	Quế chi	<i>Cortex Cinnamomi</i>	19	2,01
14	Sơn thù	<i>Cornus officinalis</i>	19	2,01
	Tổng cộng		500	

Khảo sát điều kiện sắc ký

Bảng 2, 3 và 4 lần lượt tóm tắt kết quả khảo sát pha động và nồng độ acid phosphoric; chương trình rửa giải gradient và nhiệt độ cột sắc ký khi tiến hành

sắc ký dung dịch thử giả lập với nồng độ các chất phân tích là 100 µg/ml (khảo sát pha động) và 50 µg/ml (khảo sát chương trình rửa giải gradient và nhiệt độ cột).

Bảng 2. Kết quả khảo sát hệ dung môi pha động và nồng độ acid phosphoric

Điều kiện sắc ký cố định	Pha động	Nồng độ acid	Thời gian sắc ký (phút)	Độ phân giải giữa MET và PHEN	Hệ số bất đối	Độ tinh khiết pic
Cột inertSustain C18 (250 x 4,6 mm; 5,0 µm); tốc độ dòng: 1 ml/phút; thể tích tiêm: 10 µL; bước sóng phát hiện: 230 nm; nhiệt độ cột: 30°C	MeOH - H ₃ PO ₄ (50:50)	0,10%		Sáu được chất nhưng chỉ xuất hiện 2 pic		
		0,10%	20	2,8	1,9	Đạt
	AcN - H ₃ PO ₄ (50:50)	0,03%	20	2,3	1,4	Đạt
		0,01%	20	2,3	1,7	Đạt

Nhận xét: Với hệ dung môi MeOH - H₃PO₄ 0,10%, sắc ký đồ chỉ xuất hiện 2 pic. Với hệ dung môi AcN - H₃PO₄ 0,10% sắc ký đồ có đầy đủ 6 pic nên được lựa chọn để tiếp tục khảo sát nồng độ H₃PO₄. Với nồng độ 0,03%, các pic tách hoàn toàn với độ phân giải

thấp nhất giữa MET và PHEN là 2,3; hệ số bất đối đạt yêu cầu (0,8-1,5) và pic đạt độ tinh khiết theo phổ **UV-Vis** nên nồng độ H₃PO₄ 0,03% được lựa chọn. Ngoài ra, pH pha động khoảng 2,6 phù hợp với cột sắc ký sử dụng.

Bảng 3. Kết quả khảo sát chương trình rửa giải gradient

Chương trình gradient (AcN - H ₃ PO ₄ 0,03%)	Độ phân giải	Hệ số bất đối	Độ tinh khiết pic
Gradient 1: 0'(30:70), 5'(30:70), 7'(50:50), 15'(70:30), 20'(70:30), 25'(30:70), 35'(30:70)	1,57	1,7	Đạt
Gradient 2: 0'(20:80), 5'(20:80), 7'(50:50), 15'(70:30), 20'(70:30), 25'(20:80), 35'(20:80)	1,55	1,4	Đạt
Gradient 3: 0'(5:95), 3'(5:95), 10'(80:20), 15'(80:20), 20'(35:65), 25'(5:95), 35'(5:95)	1,16	1,3	Không đạt
Gradient 4: 0'(5:95), 3'(5:95), 10'(60:40), 15'(60:40), 26'(75:25), 28'(5:95), 35'(5:95)	1,64	1,2	Đạt

Nhận xét: Với chương trình rửa giải gradient 3, các pic không đạt độ tinh khiết và độ phân giải; với chương trình rửa giải gradient 1, hệ số bất đối không đạt; với chương trình rửa giải gradient 4, hệ số

bất đối và độ phân giải tốt hơn so với chương trình rửa giải gradient 2. Vì vậy, chương trình rửa giải gradient 4 được lựa chọn.

Bảng 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ cột sắc ký

Nhiệt độ cột sắc ký	Độ phân giải	Hệ số bất đối	Độ tinh khiết pic
20°C	1,3 (GLB và GLM)	1,6 (MET)	Đạt
30°C	1,7 (GLB và GLM)	1,2 (MET)	Đạt
40°C	2,1 (GLB và GLM)	1,4 (MET)	Đạt

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy nhiệt độ cột 30°C là phù hợp vì đạt các yêu cầu về độ phân giải, hệ số bất đối và độ tinh khiết pic so với nhiệt độ cột 20°C và 40°C.

Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng đồng thời sáu hợp chất giảm glucose huyết bằng phương pháp **HPLC-PDA** là: Cột sắc ký InertSustain C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) và tiền cột (30 x 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ cột 30°C, bước sóng phát hiện 230 nm, thể tích tiêm mẫu 10 µl, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, pha động acetonitril – acid phosphoric 0,03%, rửa giải gradient 4 theo bảng 3.

Khảo sát điều kiện chiết

Bảng 5 tóm tắt kết quả khảo sát dung môi chiết, phương pháp chiết, số lần chiết và thời gian chiết các chất phân tích từ dung dịch thử giả lập với nồng độ các chất phân tích là 50 µg/ml.

Điều kiện chiết được lựa chọn sao cho hiệu suất chiết các chất phân tích cao nhất, các chất phân tích tách hoàn toàn (độ phân giải lớn hơn hoặc bằng 1,5), hệ số bất đối từ 0,8 – 1,5 và pic đạt độ tinh khiết. Như vậy, điều kiện chiết được lựa chọn là: dung môi chiết methanol, chiết siêu âm 20 phút và 2 lần.

Bảng 5. Kết quả khảo sát điều kiện chiết (n= 6)

Điều kiện chiết		Độ phân giải	Hệ số bất đối	Độ tinh khiết pic	Hiệu suất chiết thấp nhất (%)
Dung môi chiết	Aceton	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	12,2 (MET)
	AcN - nước (60:40)	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	85,6 (MET)
	Methanol	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	88,9 (GLC)
Phương pháp chiết	Siêu âm 20 phút	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	82,5 (MET)
	Lắc 20 phút	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	78,8 (MET)
	Lắc 10 phút, siêu âm 10 phút	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	81,9 (MET)
Số lần chiết	Chiết 1 lần	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	84,3 (MET)
	Chiết 2 lần	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	87,1 (MET)
	Chiết 3 lần	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	87,6 (MET)
Thời gian chiết	Siêu âm 10 phút	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	77,5 (MET)
	Siêu âm 20 phút	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	80,8 (GLC)
	Siêu âm 30 phút	1,6 (GLB và GLM)	1,4 (GLC)	Đạt	81,2 (GLC)

Thẩm định quy trình**Tính phù hợp hệ thống****Bảng 6. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu thử giả lập (n=6)**

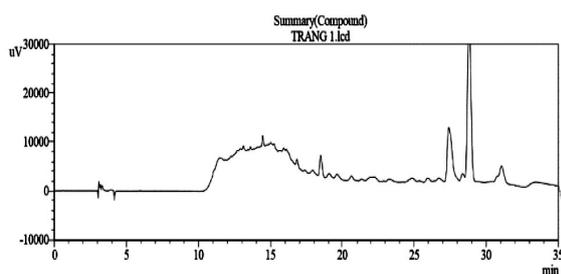
Chất phân tích		t_r (phút)	S ($\mu V \times giây$)	A_s	R_s	N_{bk}
MET	TB	2,496	1333154	1,4	-	3372
	RSD	0,44%	1,99%	1,43%	-	1,53%
PHEN	TB	12,068	1127256	1,3	52,6	63055
	RSD	0,05%	0,79%	0,38%	0,53%	1,19%
GLP	TB	16,441	1268389	1,4	19,7	68642
	RSD	0,03%	0,71%	0,50%	0,40%	0,67%
GLC	TB	18,766	987884	1,4	7,6	42557
	RSD	0,03%	0,80%	0,21%	0,33%	0,68%
GLB	TB	20,797	1307741	1,3	5,1	36903
	RSD	0,03%	1,20%	0,15%	0,16%	0,22%
GLM	TB	21,454	1251742	1,3	1,5	37652
	RSD	0,03%	1,06%	0,38%	0,07%	0,22%

Nhận xét: RSD của các thông số sắc ký của các chất phân tích trong mẫu thử giả lập đều nhỏ hơn 2%, độ phân giải đều lớn hơn hoặc bằng 1,5 và hệ số bất đối đều nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Vậy quy trình phân tích đạt tính phù hợp hệ thống.

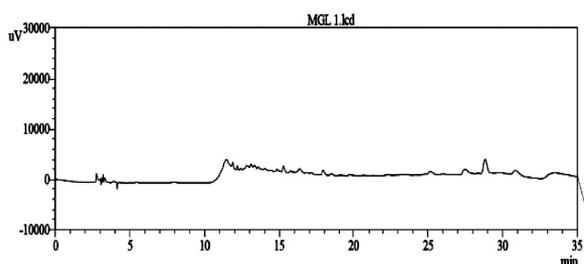
Tính đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy: Sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu giả lập không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các chất phân tích trong hỗn hợp chuẩn. Sắc ký đồ

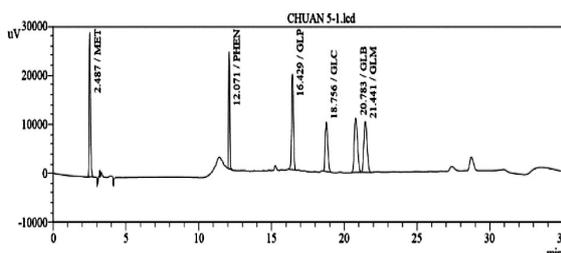
mẫu thử giả lập xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương thời gian lưu của mỗi chất trong sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn. Trên sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn và mẫu thử giả lập các pic tách hoàn toàn. Phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu của các pic trong sắc ký đồ mẫu thử giả lập giống với phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu của các pic tương ứng trong sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn. Các pic trong sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn và mẫu thử giả lập đều tinh khiết. Vậy quy trình phân tích có tính đặc hiệu. Hình 1 đến hình 4 minh họa kết quả khảo sát tính đặc hiệu.



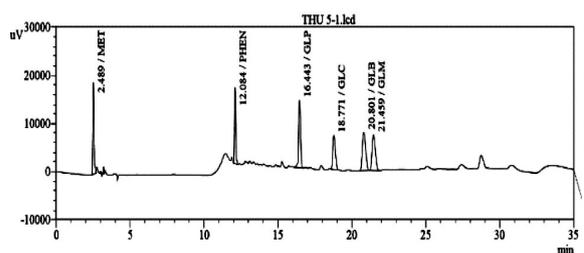
Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu giả lập



Hình 3. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu thử giả lập

Khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), hiệu suất chiết, độ chính xác và độ đúng, độ ổn định

Bảng 7. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, hiệu suất chiết, độ đúng và độ chính xác, độ ổn định

	MET	PHEN	GLP	GLC	GLB	GLM
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 34939x$	$\hat{y} = 28836x$	$\hat{y} = 31728x$	$\hat{y} = 25593x$	$\hat{y} = 34417x$	$\hat{y} = 33890x$
Khoảng tuyến tính (ppm); r	0,4 - 100; 1,0000	0,6 - 100; 1,0000	0,6 - 100; 1,0000	1,2 - 100; 1,0000	1,0 - 100; 0,9998	1,0 - 100; 0,9998
LOD (ppm)	0,1	0,08	0,08	0,4	0,25	0,3
LOQ (ppm)	0,4	0,6	0,6	1,2	1,0	1,0
Hiệu suất chiết (RSD) (n = 6)	85,82% - 88,42% (0,68% - 0,80%)	90,69% - 91,47% (0,55% - 0,99%)	91,57% - 92,58% (0,54% - 0,87%)	91,16% - 92,37% (0,55% - 1,65%)	90,92% - 92,82% (0,44% - 1,72%)	90,70% - 92,29% (0,33% - 1,43%)
Độ đúng và độ chính xác** (RSD) (n = 6)	99,6% - 111,7% (0,59% - 2,33%)	100,7% - 117,5% (0,59% - 1,93%)	101,2% - 117,8% (0,68% - 2,00%)	93,06% - 101,5% (0,69% - 2,14%)	99,98% - 113,3% (0,59% - 2,15%)	97,83% - 100,1% (0,6% - 2,11%)
Độ ổn định (RSD) (n = 3)***	98,25% - 102,1% (0,31% - 1,87%)	98,19% - 101,1% (0,3% - 2,48%)	98,54% - 100,9% (0,2% - 2,48%)	97,35% - 101,0% (0,1% - 2,28%)	98,03% - 101,6% (0,3% - 2,66%)	98,14% - 102,56% (0,61% - 3,32%)

* Hiệu suất chiết được thực hiện tại 3 mức nồng độ thấp (5 ppm), trung bình (50 ppm) và cao (80 ppm)

** Độ đúng và độ chính xác được thực hiện tại 4 mức nồng độ: giới hạn định lượng, nồng độ thấp, trung bình và cao

*** Độ ổn định được thực hiện với mẫu thử giả lập tại mức nồng độ thấp (5 ppm) và nồng độ cao (80 ppm)

Nhận xét: Kết quả xử lý thống kê cho thấy giá trị F của 6 chất phân tích đều lớn hơn $F_{0,05}$ nên phương trình hồi quy tương thích. Giá trị t của hệ số B của 6 chất đều lớn hơn $t_{0,05}$ nên giá trị B có ý nghĩa. Giá trị t của hệ số B_0 của 6 chất nhỏ hơn $t_{0,05}$ nên hệ số B_0 không có ý nghĩa. Hệ số tương quan r có giá trị lớn hơn 0,999. Hiệu suất chiết của các chất trong mẫu thử giả lập khá cao (> 85%) và ổn định (RSD < 2%). Phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng (tỷ lệ hồi phục trong khoảng 75% - 120% đối với

chất có nồng độ < 10 ppm và 80% - 115% đối với chất có nồng độ < 100 ppm)^[10] và độ chính xác (RSD < 8% đối với chất có nồng độ < 10 ppm và RSD < 6% đối với chất có nồng độ < 100 ppm)^[10]. Kết quả thực nghiệm cũng cho thấy dung dịch thử giả lập được để trong buồng tiêm mẫu trong vòng 24 giờ vẫn ổn định.

Độ tho

Kết quả thực nghiệm cho thấy khi thay đổi nhiệt độ cột $\pm 5^\circ\text{C}$, và giảm dần thể tích tiêm mẫu

(còn 5 µl) các thông số về tính phù hợp của hệ thống vẫn đạt yêu cầu.

Như vậy, quy trình định lượng đồng thời sáu hợp chất giảm glucose huyết bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò PDA có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, hiệu suất chiết cao và ổn định, đạt độ chính xác, độ đúng và mẫu thử giả lập ổn định trong 24 giờ nên quy trình có thể được ứng dụng để

định lượng các chất này nguy tạo trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng.

Ứng dụng quy trình phân tích MET, PHEN, GLP, GLC, GLB và GLM trong một số thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị đái tháo đường trên địa bàn tỉnh Tây Ninh

Kết quả kiểm tra một số thực phẩm chức năng và thuốc dược liệu trên địa bàn tỉnh Tây Ninh được tóm tắt trong bảng 8.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra các hợp chất giảm glucose huyết trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng (n = 2)

Mẫu thử	Xuất xứ	Số lô	Hạn dùng	Số đăng ký/ Xác nhận công bố an toàn thực phẩm	Hàm lượng
MT1	Việt Nam	01082019	01/01/2021	V 1065-H12-10	Không phát hiện
MT2	Trung Quốc	YK089	07/2021	Không có	PHEN: 1,99%
MT3	Việt Nam	01707014	25/06/2021	9468/2014/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT4	Việt Nam	010718	24/07/2021	45387/2017/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT5	Việt Nam	012017	28/08/2020	13473/2015/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT6	Việt Nam	10/2018	03/2021	6792/2017/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT7	Việt Nam	0618	28/11/2021	8533/2016/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT8	Việt Nam	19-0005	15/03/2022	13493/2016/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT9	Việt Nam	14112018	13/11/2021	29881/2017/ATTP-XNCB	Không phát hiện
MT10	Việt Nam	01112018	01/11/2020	9229/2013/YT-CNTC	Không phát hiện

Nhận xét: Tất cả các thuốc dược liệu có số đăng ký và thực phẩm chức năng có quy chuẩn kỹ thuật hoặc có bản công bố phù hợp quy định an toàn thực phẩm được sản xuất trong nước và hiện đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Tây Ninh đều không phát hiện các hợp chất giảm glucose huyết. Trong khi đó, một thực phẩm chức năng có nguồn gốc Trung Quốc và chưa có số đăng ký có phát hiện phenformin với hàm lượng là 1,99%.

Bàn luận

Có rất nhiều công trình nghiên cứu định lượng đồng thời hỗn hợp các chất điều trị đái tháo đường pha trộn trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng nhưng phần lớn sử dụng các kỹ thuật phân tích hiện đại như **GC-MS**, **LC-MS/MS**. Đây là các thiết bị hầu như chưa được trang bị cho các Trung tâm Kiểm nghiệm các tỉnh. Nghiên cứu của chúng tôi đã áp dụng kỹ thuật **HPLC-PDA** để phân tích đồng thời 6 hợp chất giảm glucose huyết nguy tạo trong thuốc dược liệu và TPCN với các ưu điểm sau: Quy trình chiết đơn giản dễ thực hiện, dung môi chiết tương đối ít độc, phương pháp chiết không cần quá nhiều trang thiết bị, thời gian chiết không quá lâu và hiệu suất chiết khá cao; Chỉ sử dụng một loại cột pha đảo C18 để phân tích đồng thời sáu hợp chất so với một

nghiên cứu phải sử dụng hai loại cột để phân tích bốn dược chất điều trị đái tháo đường^[8]; Sử dụng pha động là hệ dung môi đơn giản bao gồm acetonitril và dung dịch acid phosphoric 0,03% so với các công trình nghiên cứu định lượng đồng thời các dược chất trị đái tháo đường đã công bố, sử dụng pha động có đệm pH 3,0 (triethyl amin trong nước, điều chỉnh pH bằng acid phosphoric)^[9] hay muối amoni acetat^[3] nên cần tăng thời gian rửa hệ thống sắc ký, cần chuyển đổi cẩn thận giữa các kênh dung môi để tránh gây kết tủa muối trong hệ thống, gây ăn mòn hệ thống sắc ký; thời gian rửa cột phải kéo dài.

Bên cạnh đó mẫu thử giả lập có tính đại diện cho các nền mẫu thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng do được thống kê từ các thành phần dược liệu có tàn suất xuất hiện trên 2% trong thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng được sử dụng cho bệnh nhân đái tháo đường trên địa bàn tỉnh Tây Ninh.

Kết luận

Quy trình phân tích đồng thời metformin, phenformin, glipizid, gliclazid, glibenclamid và glimepirid bằng phương pháp **HPLC** với đầu dò PDA đã được xây dựng và thẩm định, sử dụng chương trình rửa giải gradient và pha động không có dung dịch đệm. Quy trình đã được chứng minh có tính đặc

hiệu, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, hiệu suất chiết cao và ổn định, đạt độ đúng, độ chính xác, độ ổn định và độ thô. Quy trình đã được ứng dụng để kiểm tra các hợp chất giảm glucose huyết trong một số thuốc dược liệu và thực phẩm chức năng đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Tây Ninh.

Tài liệu tham khảo

1. <https://www.who.int/vietnam/vi/health-topics/diabetes>. Ngày truy cập: 15/05/2020.
2. Anika Tasnim Chowdhury (2018), "Determination of synthetic drugs as adulterant in herbal anti-diabetic medicines by HPLC", *The requirements for the degree of Bachelor of Pharmacy, BRAC University*, pp. 36-37.
3. Chunyan Zhou, Bobin Tang, Cunxian Xi, Lei Zhang, Guomin Wang, Junrong Xi, Zhiqiong Chen (2013), "Simultaneous determination of seven sulfonylurea-type oral anti-diabetic agents in adulterated dietary supplements and traditional chinese medicines by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Spectroscopy Letters*, 48, pp. 163-169.
4. Manish Kumar, Vivekananda Mandal, Hemalatha S. (2011), "Detection of Metformin hydrochloride in a traditionally used Indian herbal drug for 5antidiabetic: A case report", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), pp. 307-313.
5. Mei-Chih Lin, Jer-Huei, Kuo-Ching Wen (2001), "Detection and determination of phenformin in chinese medicinal capsules by GC-MS and HPLC", *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(3), 139-144.
6. Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Kiều Anh (2018), "Nghiên cứu phát hiện các dược chất giảm glucose máu tổng hợp trộn không khai báo trong chế phẩm đông dược bằng LC-MS/MS", *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 9(6), tr. 2-8.
7. Phạm Thị Tâm, Đào Thị Cẩm Minh, Phạm Thị Thanh Hà, Nguyễn Minh Hoàng, Nguyễn Thị Kiều Anh (2017), "Xây dựng phương pháp xác định metformin và glibenclamid trộn trái phép trong chế phẩm Đông dược bằng sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 8(3), tr. 25-30.
8. Phan Nguyễn Trường Thắng, Trần Việt Hùng, Lê Thanh Hoàng, Trần Thị Bạch Mai (2018), "Phân tích phát hiện một số tân dược chống tiểu đường trộn trái phép trong thuốc Đông dược và thực phẩm chức năng", *Tạp chí Dược học*, 58(7), tr. 68-72.
9. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), *Validation of analytical procedures: text and methodology*, pp. 1-13.
10. AOAC (2013), *Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals*, Section 3.4.1- 3.4.2, pp. 8-9.

(Ngày nhận bài: 30/7/2020 - Ngày phản biện: 02/9/2020 - Ngày duyệt đăng: 29/9/2020)

p-Menthan-3,8-diol (PMD): Tổng hợp, tinh chế và phân tích đặc điểm phổ của các đồng phân

Phan Minh Hoàng¹, Phan Thị Thanh Thủy²

Trần Thành Đạo¹, Trần Ngọc Châu^{1*}

¹ BM. Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

² BM. Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

* E-mail: tranchau@ump.edu.vn

Summary

p-Menthane-3,8-diol (PMD) was synthesized from (±)-citronellal via Prins cyclized reaction using sulfuric acid as catalyst with high yield ($H = 78.5\%$). *cis/trans* PMD isomers were isolated with purity over 99%. From analysing IR and NMR spectra of *cis* isomers, *trans* isomers and mixture of them, some methods of determining *cis/trans* PMD ratio in the mixture are proposed.

Keywords: PMD, citronellal, geometric isomer, IR.

Đặt vấn đề

p-Menthan-3,8-diol (PMD) là một dẫn chất cấu trúc terpen có nguồn gốc tự nhiên, ví dụ trong lá cây

bạch đàn chanh (*Corymbia citriodora*, L.) với lượng khá thấp (khoảng 4%)^[1]. Hoạt chất trên có tác dụng xua đuổi côn trùng hiệu quả, đặc biệt trên một số loài