

# XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI PARACETAMOL, CLOPHENIRAMINE MALEATE, CINARIZINE, LORATADINE VÀ CETIRIZINE HYDROCHLORIDE TRONG CHẾ PHẨM CÓ NGUỒN GỐC TỪ DƯỢC LIỆU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Huỳnh Văn Chung<sup>1,2</sup>, Đào Thị Cẩm Minh<sup>3</sup>, Trần Thị Thu Thủy<sup>3</sup>, Nguyễn Hải Phong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột, 298 Hà Huy Tập, Đắk Lắk, Việt Nam

<sup>3</sup> Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, 6 Ngô Quyền, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Nguyễn Hải Phong <nhphong@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 29-07-2024; Hoàn thành phản biện: 09-09-2024; Ngày chấp nhận đăng: 17-10-2024)

**Tóm tắt.** Bài báo này trình bày quá trình xây dựng phương pháp định lượng đồng thời paracetamol (PAR), clopheniramine maleate (CPM), cinarizine (CIN), loratadine (LOR) và cetirizine hydrochloride (CET) trong chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò PDA. Phương pháp phân tích được thực hiện ở điều kiện sắc ký: cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm); pha động là hỗn hợp hai kênh ACN (A) và 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 2,3) (B) theo chương trình gradient; tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 20 μL; nhiệt độ cột: 40 °C; Bước sóng phát hiện: PAR: 245 nm, CPM: 225 nm, CET: 230 nm, LOR: 254 nm và CIN: 253 nm. Phương pháp phân tích đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC. Giới hạn phát hiện của PAR, CPM, CET, LOR, và CIN lần lượt là 2,00, 2,00, 1,75, 1,00 và 0,50 μg/mL. Quy trình đã được ứng dụng để phân tích 32 mẫu chế phẩm đông dược khác nhau thu thập trên thị trường.

**Từ khóa:** HPLC, paracetamol, clopheniramine maleate, cinarizine, loratadine, cetirizine hydrochloride

## Simultaneous detection of paracetamol, chlorpheniramine maleate, cinnarizine, loratadine, and cetirizine hydrochloride in preparations derived from medicinal herbs by using high-performance liquid chromatography

Huynh Van Chung<sup>1,2</sup>, Dao Thi Cam Minh<sup>3</sup>, Tran Thi Thu Thuy<sup>3</sup>, Nguyen Hai Phong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Viet Nam

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Buon Ma Thuot Medical University, 298 Ha Huy Tap St., Dak Lak, Viet Nam

<sup>3</sup> Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University, 6 Ngo Quyen St, Hue, Viet Nam

\* Correspondence to Nguyen Hai Phong <nhphong@hueuni.edu.vn>

(Received: 20 July 2024; Revised: 09 September 2024; Accepted: 17 October 2024)

**Abstract.** This study was conducted to develop a method for simultaneous quantification of paracetamol (PAR), chlorpheniramine maleate (CPM), cinnarizine (CET), loratadine (LOR), and cetirizine hydrochloride (CIN) in preparations derived from medicinal herbs by using high-

performance liquid chromatography (HPLC) with a PDA detector. The analytical method was performed under the following chromatographic conditions: InertSustain™ C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm); mobile phase: a mixture of ACN (A) and 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 2.3) (B) according to a gradient program; flow rate: 1.0 mL/min; sample injection volume: 20 µL; column temperature: 40 °C; detection wavelength: 245 nm for Paracetamol, 225 nm for chlorpheniramine maleate, 230 nm for cetirizine hydrochloride, 254 nm for loratadine, and 253 nm for cinnarizine. The analytical method was validated according to ICH and AOAC guidelines. The detection limits of PAR, CPM, CET, LOR, and CIN were 2.00, 2.00, 1.75, 1.00, and 0.50 µg/mL, respectively. The developed procedure was applied to analyze 32 samples of traditional medicinal products collected from the local markets.

**Keywords:** HPLC, paracetamol, chlorpheniramine maleate, cinnarizine, loratadine, cetirizine hydrochloride

## 1 Mở đầu

Do đặc điểm khí hậu nhiệt đới ẩm và tình trạng ô nhiễm không khí ngày càng gia tăng ở Việt Nam, tỉ lệ người mắc các bệnh dị ứng nói riêng và các bệnh do thời tiết nói chung đang tăng nhanh [1]. Những bệnh nhân bị mắc các bệnh dị ứng thường tự ý mua thuốc để điều trị. Thuốc chỉ điều trị triệu chứng sau đó tái đi tái lại nhiều lần và vì vậy, bệnh nhân hay tìm và sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu với niềm tin rằng chúng an toàn và có ít tác dụng phụ. Tuy nhiên, nhược điểm của của thuốc có nguồn gốc từ dược liệu có tác dụng từ từ nên phải điều trị trong thời gian dài với lượng lớn. Tâm lý người dân hiện nay muốn sử dụng sản phẩm an toàn và có tác dụng nhanh. Do vậy, để tăng tác dụng dược lý và tăng doanh thu từ các sản phẩm có nguồn gốc dược liệu, một số nhà sản xuất đã trộn vào các sản phẩm này một số thuốc hóa dược. Hu đã phát hiện ra 2 chất hóa dược (trong đó có clorpheniramin) được trộn trái phép trong 16 chế phẩm đông dược chống dị ứng và chống viêm thu thập được [2]. Đặc biệt, một nghiên cứu của Gretchen phát hiện 3 mẫu dương tính với một trong ba chất: clorpheniramin và hai chất kháng histamin H1 khác trộn trái phép trong các chế phẩm đông dược trong tất cả 90 mẫu thu thập được [3]. Ngoài ra, theo Aprilia, hai chế phẩm đông dược được phát hiện chứa acetaminophen trộn trái phép trong ba chế phẩm thu thập được ở Bandung, Indonesia. Nili-Ahmadabadi đã phát

hiện ra 9 mẫu chế phẩm đông dược chứa paracetamol và codein trộn lẫn trong tất cả 60 mẫu thu thập được ở Hamadan, Iran [4]. Đồng thời, Kim cũng đã phát hiện 16 loại thực phẩm chức năng chứa paracetamol trộn lẫn trong 214 mẫu thu thập được ở Hàn Quốc [5]. Điều này cho thấy rằng việc trộn trái phép các chất kháng histamin H1 và paracetamol trong các chế phẩm đông dược không chỉ là tình trạng đáng báo động ở Việt Nam mà còn là một vấn đề nghiêm trọng đang xảy ra tại các nước trên thế giới. Vì vậy, đây là một mối quan tâm lớn không những của cơ quan quản lý mà còn của cộng đồng. Do đó, có nhiều công bố về các rủi ro ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe mà nguyên nhân là từ các chế phẩm đông dược được khẳng định là "hoàn toàn tự nhiên" [6]. Vì vậy, Cục quản lý thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ ban hành lệnh cấm hoặc hạn chế bán một số chế phẩm có nguồn gốc thảo dược chứa hoạt chất hoá dược. Tại Việt Nam, ngày 30/06/2021, Bộ Y Tế đưa ra Thông tư số 10/2021/TT-BYT về "Quy định danh mục chất cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe", trong đó có các chất kháng histamin H1 [7]. Ngoài ra, để giảm đau do các bệnh lý về thời tiết, ngoài histamine H1, người ta còn trộn paracetamol. Do đó, để kiểm soát cần thiết phát triển các phương pháp phân tích phát hiện các chất kháng histamin H1 và giảm đau nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm có nguồn gốc từ dược liệu.

Đã có một số công trình nghiên cứu phát triển phương pháp phân tích để phát hiện thuốc kháng histamin H1 trộn trái phép trong chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu như LC-MS, LC-MS/MS và GC-MS [5, 8–12] với độ đặc hiệu cao và giới hạn phát hiện thấp. Tuy nhiên, hệ thống LC-MS rất đắt tiền, kỹ thuật và chi phí phân tích cao; phương pháp UV-vis [13–15] rất dễ bị ảnh hưởng của các hoạt chất trong dược liệu. Ngoài ra, các nghiên cứu trên chỉ xác định các hợp chất kháng histamin H1 mà chưa có quy trình xác định đồng thời một số hợp chất kháng histamin H1 và giảm đau. Do vậy, bài báo này nghiên cứu xác định đồng thời một số hợp chất kháng histamin H1 và paracetamol bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với mục đích góp phần vào công tác kiểm tra phát hiện các thuốc hóa dược trong các chế phẩm đông dược, đảm bảo sức khỏe cộng đồng khi sử dụng các chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu.

## 2 Thực nghiệm

### 2.1 Hóa chất, thiết bị và mẫu nghiên cứu

**Hóa chất:** Paracetamol (số kiểm soát: 0415019.04); clorpheniramine maleate (số kiểm soát: 0418032.03); cetirizine hydrochloride (số kiểm soát: 0114310.01); loratadine (số kiểm soát: 0218242.02); cinnarizine (số kiểm soát: C0220171.02) của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương; methanol, H<sub>2</sub>O, acetonitrile, ethanol của hãng Fisher, Mỹ; acid formic của Sigmaalrich, Mỹ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> của hãng Merck, Đức.

**Thiết bị:** Máy HPLC SHIMADZU LC-20A series 2000-PAD detector; cột sắc ký: InertSustain™ C18 (4,6 × 250mm, 5 μm); cột sắc ký Agilent Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm); bể siêu âm HSVN GLOBAL, Skymen JP-040S; máy ly tâm Labnet Spectrafuge 24D, Mỹ; cân phân tích Mettler Toledo, Thụy Sĩ ( $d = 0,1$  mg).

**Mẫu nền:** Lựa chọn mẫu nền là thuốc “Thông Xoang Tán” dựa trên nền bài cổ phương

Tân Di Tán (Tân Di Tán III – Cổ Tự Y Thư) điều trị viêm mũi, viêm xoang cấp và mãn tính gồm 8 vị dược liệu: bạch chi, tân di, cảo bản, phòng phong, tế tân, thăng ma, xuyên khung và cam thảo.

**Các chế phẩm đông dược:** Bao gồm 32 mẫu với loại chế phẩm như thuốc dược liệu cổ truyền, thực phẩm chức năng bảo vệ sức khỏe dạng viên hoàn, viên nang, viên nén và bột, có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh dị ứng như hen suyễn, viêm mũi dị ứng, nổi mề đay và viêm da dị ứng.

**Chuẩn bị mẫu thử:** Cân chính xác khoảng 1 g mẫu và cho vào ống falcon; thêm 25 mL EtOH 96%; tiến hành lắc xoáy 5 phút; siêu âm 15 phút; ly tâm 5 phút (6000 vòng/phút). Dịch trong thu được đem lọc qua màng lọc 0,45 μm [16].

### 2.2 Phương pháp HPLC

+ Cột sắc ký: cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) và cột Agilent Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm).

+ Pha động: Căn cứ vào các tài liệu tham khảo [3, 8, 17], tiến hành khảo sát các hệ dung môi sau: CAN–H<sub>2</sub>O; ACN–H<sub>2</sub>O (acid formic 0,1%); ACN–5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

+ Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút; 1,0 mL/phút; 1,2 mL/phút.

+ Thẩm định phương pháp phân tích: thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ICH và AOAC [18, 19] gồm: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

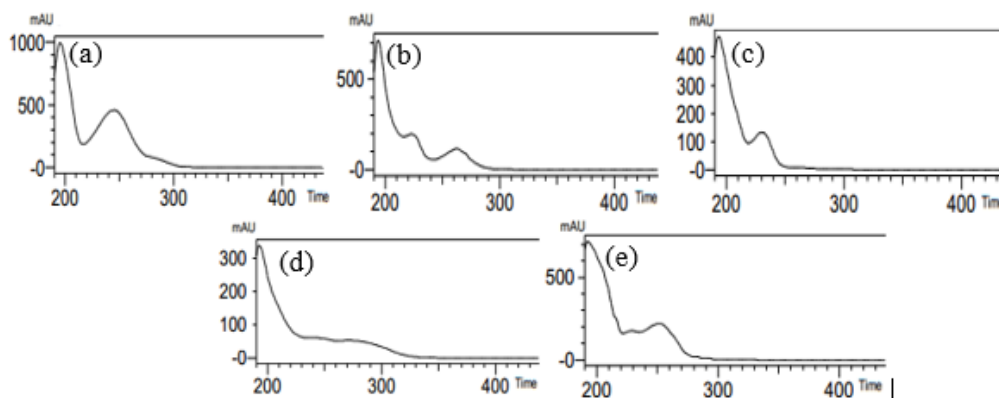
### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Khảo sát điều kiện sắc ký

##### Bước sóng phát hiện

Bước sóng phát hiện được lựa chọn căn cứ vào phổ UV của 5 chất: PAR, CPM, CET, LOR và CIN lần lượt đạt cực đại hấp thụ tại 245, 225, 230,

254 và 253 nm. Kết quả được trình bày trên Hình 1. Sử dụng mỗi bước sóng phát hiện cho mỗi chất khác nhau có tính chọn lọc cao hơn so với việc sử dụng một bước sóng để phát hiện đồng thời nhiều chất trong một số nghiên cứu định lượng CPM, CET, LOR, CIN trong chế phẩm đông được trước đây như 254 nm [20] và 205 nm [17].



Hình 1. Phổ UV của PARA (a), CPM (b), CET (c), LOR (d), CIN (e) với nồng độ 15 µg/mL

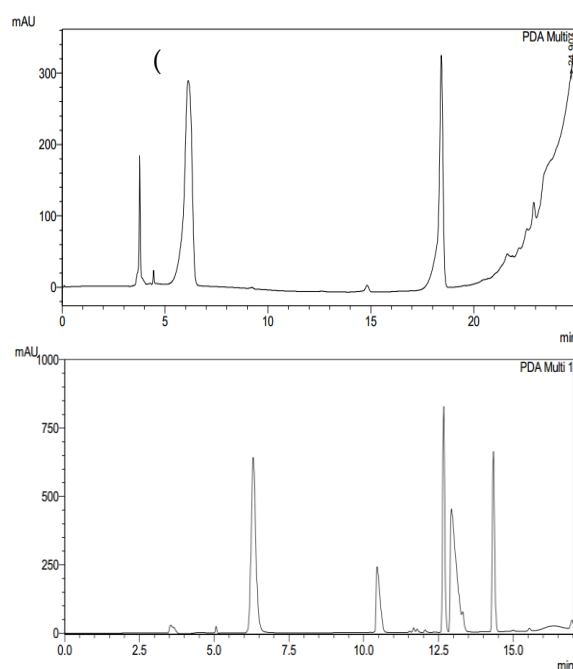
##### Lựa chọn cột sắc ký

Tiến hành khảo sát hiệu quả tách trên 2 cột sắc ký:

a) Cột Agilent Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm);

b) Cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm).

Dựa vào sắc ký đồ trên Hình 2 có thể nhận thấy rằng, với cột Agilent Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), các peak chồng lên nhau và đường nền dâng cao rõ rệt (Hình 2a). Trong khi đó, cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) cho các peak tách khỏi nhau hoàn toàn; phần lớn các peak sắc nhọn, cân xứng và tín hiệu khá cao (Hình 2b). Cột sắc ký InertSustain™ C18 có chiều dài 250 mm, đường kính trong 4,6 mm, kích thước hạt nhồi cột 5 µm, tương tự như cột C18 trong tài liệu [20, 21]. Do đó, cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Sắc ký đồ PAR, CPM, CET, LOR và CIN với cột sắc ký Agilent Eclipse C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) (a), InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) (b)

ĐKTN: thể tích tiêm mẫu 20 µl, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, chương trình pha động ACN (A) – H<sub>2</sub>O (acid formic 0,1%) (B): 0 – 8 phút, 20 – 90% A; 8 – 10 phút, 90% A; 10 – 13 phút, 90 – 20%; 13 – 17 phút, 20% A. Nồng độ tất cả các chất PAR, CPM, CET, LOR và CIN đều là 15 µg/mL.

### Ảnh hưởng của pha động

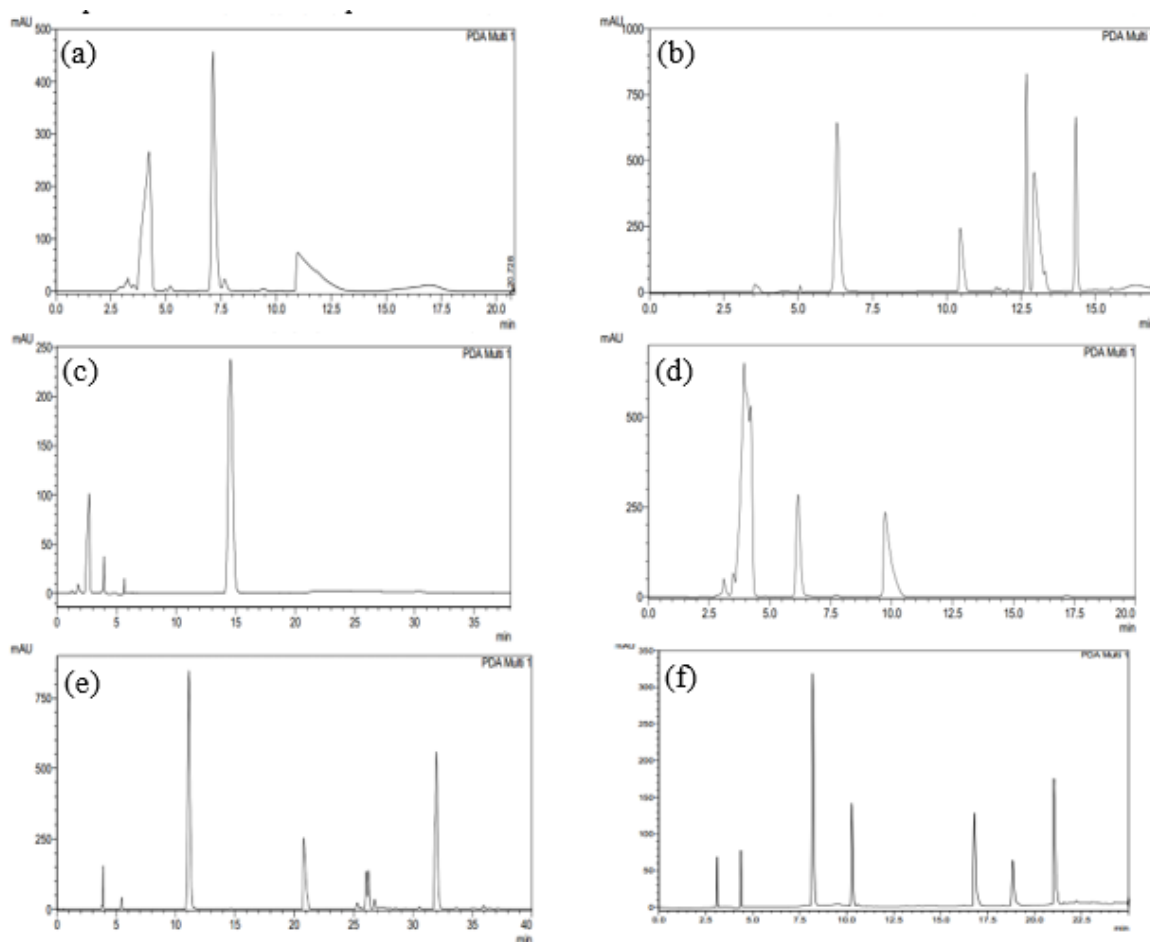
Tiến hành khảo sát hệ dung môi pha động trên cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) với các hệ dung môi và gradient nồng độ như sau:

- 1) ACN–H<sub>2</sub>O (acid formic 0,1%): 50–50.
- 2) ACN (A): H<sub>2</sub>O (acid formic 0,1%); (B): 0–8 phút, 20–90% A; 8–10 phút, 90% A; 10–13 phút, 90–20%; 13–17 phút, 20% A.
- 3) ACN–H<sub>2</sub>O: 8–92.
- 4) ACN–5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 3,2): 55–45.

5) ACN (A)–5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 3,0) (B): 0–10 phút, 10–30% A; 10–20 phút, 50% A; 20–30 phút, 70% A; 30–35 phút, 10% A; 35–40 phút, 10% A.

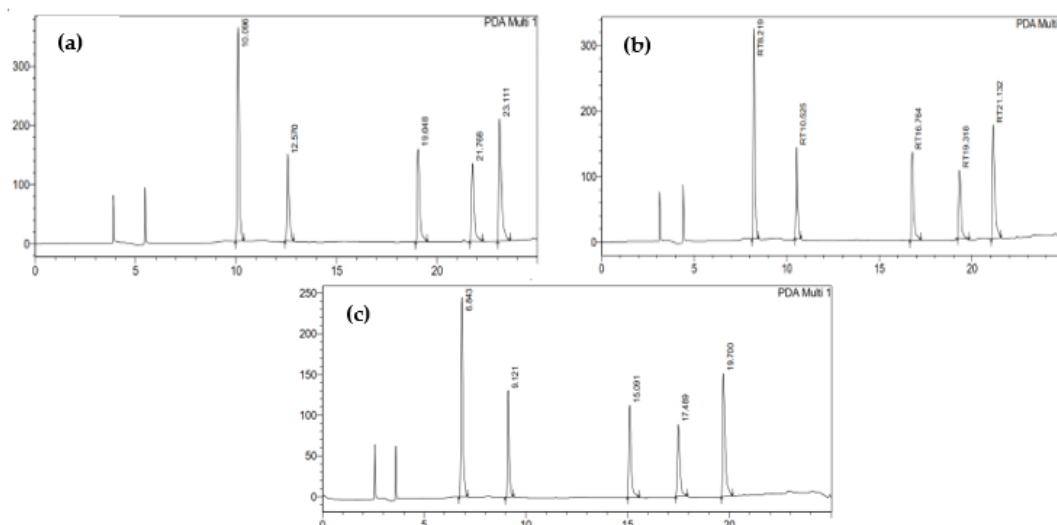
6) ACN (A)–5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 2,3) (B): 0–0,8 phút, 10–20% A; 0,8–3,5 phút, 35% A; 3,5–6 phút, 35% A; 6–12,8 phút, 50% A; 12,8–17,8 phút, 75% A; 17,8–20 phút, 75% A; 20–20,4 phút, 10% A; 20,4–25 phút, 10% A.

Kết quả khảo sát các hệ dung môi pha động được trình bày lần lượt trên Hình 3.



**Hình 3.** Sắc ký đồ của PAR, CPM, CET, LOR và CIN ở các hệ dung môi (1)–(6)

ĐKTN: thể tích tiêm mẫu 20 μl, tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm). Nồng độ tất cả các chất PAR, CPM, CET, LOR và CIN đều là 15 μg/ml



**Hình 4.** Sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp năm chất ở các tốc độ dòng pha động khác nhau: 0,8 mL/phút (a); 1,0 mL/phút (b); 1,2 mL/phút (c)

ĐKTN: thể tích tiêm mẫu 20  $\mu$ L, chương trình pha động (6), Cột InertSustain™ C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu$ m). Nồng độ tất cả các chất PAR, CPM, CET, LOR và CIN đều là 15  $\mu$ g/mL

Đối với hệ dung môi số 1, có thể thấy các peak chồng lên nhau (Hình 3a). Ở hệ dung môi số 2, các peak chưa tách ra khỏi nhau và peak không đối xứng (Hình 3b). Ở hệ dung môi số 3, hình dáng của peak được cải thiện, nhưng có hiện tượng chồng peak và các chất ra khá sớm (Hình 3c). Ở hệ dung môi số 4, các peak chồng lên nhau và hình dáng peak không cân xứng (Hình 3d). Ở hệ dung môi số 5, hình dáng peak được cải thiện nhiều hơn, nhưng peak chưa tách khỏi nhau hoàn toàn (Hình 3e). Ở hệ dung môi số 6, các peak tách khỏi nhau hoàn toàn, nhọn và đối xứng, với thời gian lưu thích hợp (Hình 3f). Do vậy, hệ dung môi số 6 là thích hợp cho việc phân tích định lượng đồng thời PAR, CPM, CET, LOR và CIN.

### Ảnh hưởng của tốc độ dòng pha động

Dựa vào Hình 4 có thể thấy rằng khi tăng tốc độ dòng thì thời gian lưu của năm hợp chất giảm và điều này có lợi về thời gian phân tích. Tuy nhiên, tại tốc độ dòng 1,2 mL/phút (Hình 4a) thì áp suất của hệ thống sắc ký tăng cao và không

tốt cho thiết bị HPLC. Tại tốc độ dòng 0,8 mL/phút (Hình 4c), áp suất của hệ thống sắc ký nhỏ. Vì vậy, thời gian lưu các chất kéo dài, dẫn đến tăng thời gian phân tích. Tốc độ dòng 1,0 mL/phút cho thời gian phân tích là phù hợp với các peak nhọn và tách khỏi nhau hoàn toàn. Đồng thời, peak có hình dáng cân đối. Do đó, tốc độ dòng 1,0 mL/phút được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

### 3.2 Thẩm định phương pháp phân tích

#### Tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm mẫu lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn chứa hỗn hợp PAR 15  $\mu$ g/mL, CPM 15  $\mu$ g/mL, CET 15  $\mu$ g/mL, LOR 15  $\mu$ g/mL và CIN 15  $\mu$ g/mL vào hệ thống HPLC với các điều kiện thích hợp đã lựa chọn. Nồng độ 15  $\mu$ g/mL nằm trong khoảng tuyến tính và nồng độ này ở gần khoảng dưới khoảng tuyến tính. Do vậy, ở nồng độ nhỏ (dễ gặp sai số) này, nếu đã đạt thì các nồng độ khác sẽ đạt về tính tương thích hệ thống. Kết quả đánh giá được trình bày trong Bảng 1.

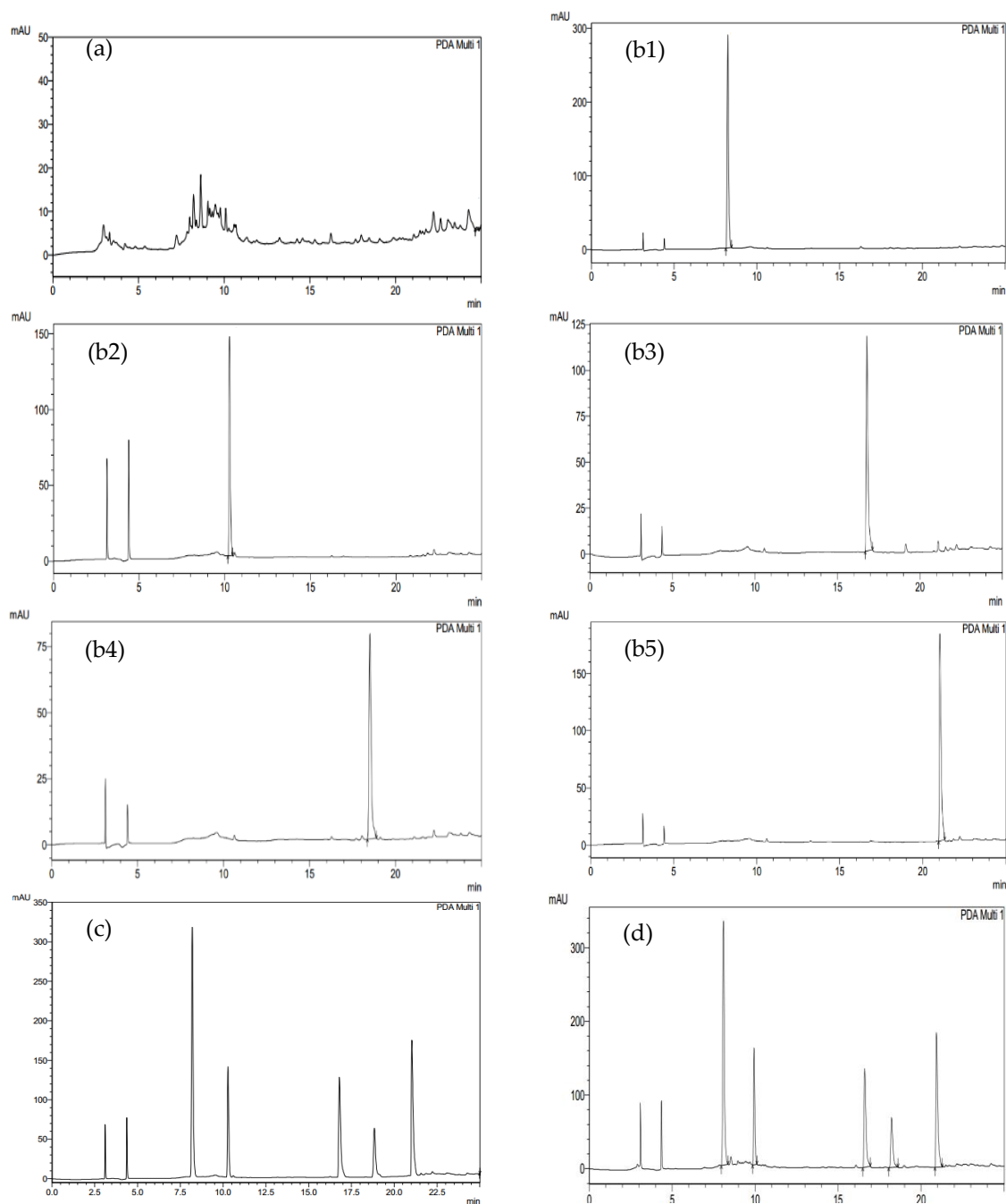
**Bảng 1.** Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Lần tiêm mẫu		1	2	3	4	5	6	TB ± Sd (RSD, %)
PAR	R <sub>t</sub> (phút)	8,174	8,154	8,139	8,154	8,094	8,101	8,136 ± 0,032 (0.392)
	S <sub>peak</sub> (mAU)	904144	892431	901794	892347	878530	885030	892379 ± 9725 (1.09)
	T <sub>f</sub>	1,431	1,395	1,433	1,411	1,421	1,444	1,423 ± 0,018 (1.23)
	N	32704	34191	33178	33710	33508	33906	33533 ± 532 (1.59)
CPM	R <sub>t</sub> (phút)	10,582	10,561	10,549	10,564	10,547	10,569	10,562 ± 0,013 (0.123)
	S <sub>peak</sub> (mAU)	365616	360696	367830	369896	371940	375441	368570 ± 5130 (1.39)
	T <sub>f</sub>	1,495	1,493	1,513	1,467	1,528	1,529	1,504 ± 0,024 (1.59)
	N	68365	69038	67623	67533	66733	66545	67640 ± 950 (1.41)
CET	R <sub>t</sub> (phút)	16,726	16,683	16,678	16,686	16,690	16,710	16,696 ± 0,019 (0.111)
	S <sub>peak</sub> (mAU)	495785	498284	497915	496241	494630	499962	497136 ± 1940 (0.390)
	T <sub>f</sub>	1,741	1,757	1,770	1,752	1,717	1,773	1,752 ± 0,021 (1.18)
	N	110882	108637	109252	109442	107523	108932	109111 ± 1099 (1.01)
LOR	R <sub>t</sub> (phút)	19,440	19,408	19,400	19,412	19,420	19,449	19,422 ± 0,019 (0.099)
	S <sub>peak</sub> (mAU)	536791	517657	528754	528779	545918	531588	531581 ± 9407 (1.77)
	T <sub>f</sub>	1,691	1,708	1,669	1,716	1,737	1,691	1,702 ± 0,024 (1.39)
	N	107143	110219	107505	108446	106390	108464	108028 ± 1335 (1.24)
CIN	R <sub>t</sub> (phút)	21,140	21,108	21,103	21,108	21,113	21,129	21,117 ± 0,014 (0.069)
	S <sub>peak</sub> (mAU)	676881	700626	684748	676469	690605	681731	685177 ± 9218 (1.35)
	T <sub>f</sub>	1,944	1,888	1,892	1,933	1,894	1,941	1,915 ± 0,027 (1.39)
	N	203697	194626	195701	203072	197002	198523	198770 ± 3809 (1.92)

Dựa vào Bảng 1 có thể nhận thấy rằng thời gian lưu và diện tích peak đều có RSD ≤ 2%; số đĩa lý thuyết  $N > 2000$  và hệ số kéo đuôi  $T_f \leq 2$ ; điều này cho thấy hệ thống và các điều kiện sắc ký đã chọn là tương thích cho việc phân tích định lượng đồng thời PAR, CPM, CET, LOR và CIN.

**Độ đặc hiệu**

Tiến hành sắc ký các mẫu: mẫu nền; mẫu chuẩn đơn thành phần chỉ chứa một trong các chất sau: PAR, CPM, CET, LOR và CIN; mẫu chuẩn đa thành phần chứa tất cả các chất PAR, CPM, CET, LOR và CIN; mẫu thêm chuẩn đa thành phần trong mẫu nền và được thêm trước khi tiến hành chiết (tất cả được lặp lại 3 lần). Kết quả được trình bày trên Hình 5.



**Hình 5.** Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu: mẫu nền (a); mẫu chuẩn đơn thành phần: PAR (b1), CPM (b2), CET (b3), LOR (b4), CIN (b5); mẫu chuẩn đa thành phần (c); mẫu chuẩn đa thành phần trên mẫu nền (d)  
ĐKTN: Thể tích tiêm mẫu 20  $\mu\text{L}$ ; chương trình pha động (6); cột InertSustain<sup>TM</sup> C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Nồng độ tất cả các chất PAR, CPM, CET, LOR và CIN đều là 15  $\mu\text{g/mL}$ .

Dựa vào Hình 5, có thể thấy rằng trên sắc ký đồ của mỗi mẫu chuẩn đơn thành phần xuất hiện các peak của PAR, CPM, CET, LOR và CIN tại các khoảng thời gian lưu lần lượt là 8,1 phút, 10,5 phút, 16,7 phút, 19,2 phút và 21,1 phút (Hình 5b1–5b5). Trên sắc ký đồ của mẫu nền (Hình 5a)

không xuất hiện peak tại các khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của PAR, CPM, CET, LOR và CIN. Trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn đa thành phần (Hình 5c), xuất hiện 5 peak tại các khoảng thời gian tương ứng với thời gian lưu của PAR, CPM, CET, LOR và CIN ở các mẫu chuẩn

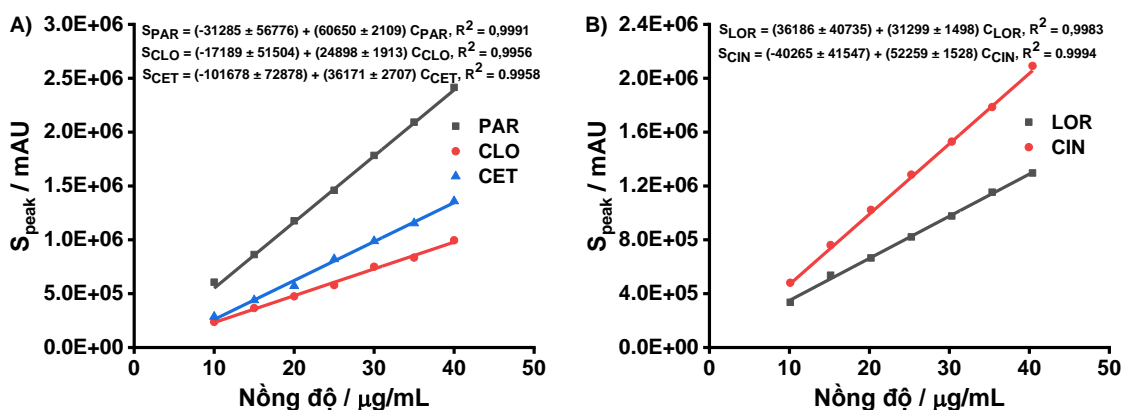


đơn thành phần. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn đa thành phần trên mẫu nền (Hình 5d) có các peak rõ nét của PAR, CPM, CET, LOR và CIN, trùng với thời gian lưu tương ứng của các chất này trong mẫu chuẩn đơn thành phần. Phổ UV của 5 chất trong mẫu nền trùng khớp với phổ UV của 5 chất chuẩn. Do đó, phương pháp có độ đặc hiệu cao để phát hiện PAR, CPM, CET, LOR và CIN trên các chế phẩm đông được khảo sát.

### Xây dựng đường chuẩn

Pha dãy chuẩn hỗn hợp gồm PAR, CPM, CET, LOR và CIN với nồng độ của từng chất đều từ 10 đến 40  $\mu\text{g/mL}$ , tiến hành chạy sắc ký và ghi nhận diện tích peak của 5 chất. Kết quả xây dựng đường chuẩn của PAR, CPM, CET, LOR và CIN được trình bày trên Hình 6.

Dựa vào kết quả Hình 6, có thể thấy rằng các hệ số xác định  $R^2$  đều trên 0,99, cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ hoạt chất và diện tích peak đáp ứng theo AOAC [18].



**Hình 6.** Các đường hồi quy tuyến tính của PAR, CPM, CET (A) và LOR, CIN (B)

ĐKTN: Thể tích tiêm mẫu 20  $\mu\text{L}$ ; chương trình pha động (6); cột InertSustain<sup>TM</sup> C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); tốc độ dòng 1,0 mL/phút. Nồng độ tất cả các chất PAR, CPM, CET, LOR và CIN đều là 15  $\mu\text{g/mL}$ .

### Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Chuẩn bị và tiến hành phân tích các mẫu chứa PAR, CPM, CET, LOR và CIN với nồng độ giảm dần. Giá trị LOD và LOQ được xác định bằng tỷ số tín hiệu/nhiều nền ( $S/N$ ). Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ mà tại đó  $S/N = 3$ ; giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ mà tại đó  $S/N = 10$ . Kết quả giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt như sau: PAR (2,00 và 6,60  $\mu\text{g/mL}$ ), CPM (2,00 và 6,60  $\mu\text{g/mL}$ ), CET (1,75 và 5,78  $\mu\text{g/mL}$ ), LOR (1,00 và 3,30  $\mu\text{g/mL}$ ) và CIN (0,50 và 1,65  $\mu\text{g/mL}$ ).

### Độ đúng

Độ đúng được đánh giá thông qua độ thu hồi (Rev, %) khi thêm chuẩn vào mẫu nền với 3 mức nồng độ tương ứng thấp, trung bình và cao; mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần trong cùng điều kiện khảo sát. Kết quả đánh giá độ đúng được trình bày trong Bảng 2. Có thể nhận thấy rằng độ thu hồi dao động từ 94,27 đến 104,80%, đáp ứng theo yêu cầu của AOAC [18]. Vì vậy, phương pháp đã xây dựng đáp ứng độ đúng theo yêu cầu.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đúng

C thêm,  µg/mL	PAR		CPM		CET		C thêm,  µg/mL	LOR		CIN	
	Tìm thấy, µg/mL	Độ thu hồi, %	Tìm thấy, µg/mL	Độ thu hồi, %	Tìm thấy, µg/mL	Độ thu hồi, %		Tìm thấy, µg/mL	Độ thu hồi, %	Tìm thấy, µg/mL	Độ thu hồi, %
15,00	15,51	103,4	14,39	95,95	14,50	96,69	15,15	14,80	97,68	15,26	100,7
	16,03	106,9	14,08	93,89	14,41	96,05		15,11	99,74	15,20	100,3
	15,62	104,1	14,37	95,81	14,20	94,67		15,00	98,97	15,26	100,7
25,00	25,48	101,9	25,48	101,9	23,66	94,62	25,50	26,11	102,4	24,82	97,30
	25,13	100,5	25,12	100,5	23,38	93,50		24,94	97,77	25,24	98,95
	24,81	99,23	25,75	103,0	23,67	94,69		25,58	100,3	24,87	97,51
35,00	34,58	98,81	34,86	99,60	34,57	98,78	35,35	35,53	100,5	35,72	101,0
	34,48	98,53	36,88	105,4	33,94	96,98		35,08	99,22	34,96	98,88
	34,08	97,36	36,32	103,8	34,71	99,17		34,53	97,67	35,12	99,34

3.3 Áp dụng quy trình phân tích xây dựng được vào phân tích mẫu thực tế

Chúng tôi đã thu thập được 32 mẫu chế phẩm đông dược có tác dụng điều trị hoặc hỗ trợ điều trị các bệnh dị ứng (hen suyễn, viêm mũi dị ứng, viêm da dị ứng...) trên thị trường qua các nguồn bao gồm nhà thuốc, qua Internet và qua các nhà thuốc đông y. Trong đó, các chế phẩm chủ yếu có dạng bào chế là viên nang với 16 mẫu,

viên nén với 7 mẫu, viên hoàn với 7 mẫu và bột với 2 mẫu. Sau khi phân tích 32 mẫu chế phẩm đông dược thu thập được, chúng tôi đã phát hiện 9 mẫu bị trộn trái phép các chất nghiên cứu. Cả 9 mẫu đều dương tính với CPM (BNH093, HCH164, HCH094, HCH04, VNA01, VNA02, VNA03, VNA04, VNA05); 4 mẫu dương tính đồng thời CPM và PAR (BNH093, HCH164, HCH094, HCH04). Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định mẫu thực tế

Mẫu thử	Chất phát hiện	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng (mg/liều)
BNH093	CPM	16,74	18,31
	PAR	197,2	215,7
HCH164	CPM	0,4610	1,180
	PAR	34,17	87,41
HCH094	CPM	4,444	12,62
	PAR	237,2	673,8
HCH04	CPM	0,7920	1,725
	PAR	141,0	307,1
VNA01	CPM	5,831	4,553

Mẫu thử	Chất phát hiện	Hàm lượng (mg/g)	Hàm lượng (mg/liều)
VNA02	CPM	7,840	3,152
VNA03	CPM	6,952	4,533
VNA04	CPM	7,573	3,547
VNA05	CPM	2,146	1,530

Kết quả phân tích cho thấy trong số 32 mẫu khảo sát thì phát hiện 9 mẫu trộn trái phép các chất kháng histamine H1 và paracetamol, chiếm tỷ lệ 28,1%. Trong đó, 9/32 mẫu đều dương tính với CPM, gồm: BNH093, HCH164, HCH094, HCH04, VNA01, VNA02, VNA03, VNA04 và VNA05; 4/32 mẫu dương tính đồng thời với CPM và PAR, gồm: BNH093, HCH164, HCH094 và HCH04.

Trong tổng số mẫu phân tích, có những mẫu dương tính với hàm lượng thuốc hóa được vượt quá liều điều trị đối với clorpheniramin maleat như BNH093, HCH094, VNA01 và VNA03 với hàm lượng lần lượt là 18,31, 12,62, 4,553 và 4,533 mg/liều và mẫu dương tính vượt quá liều điều trị của paracetamol: HCH094 với hàm lượng 673,8 mg/liều.

Các mẫu BNH093, HCH094, HCH164 và HCH04 đều dương tính đồng thời với cả CPM và PAR. Trong đó, hàm lượng CPM (12,62 mg/liều) và PAR (673,8 mg/liều) của mẫu HCH094 đều lớn hơn so với liều điều trị. Đặc biệt, mẫu BNH093 có hàm lượng CPM lớn hơn rất nhiều so với liều điều trị (18,31 mg/liều). Đồng thời, hàm lượng CPM trong các mẫu HCH164, HCH04, VNA02, VNA04 và VNA05 có giá trị thấp hơn so với liều điều trị của CPM (1,180–3,547 mg/liều). So với liều điều trị của PAR, mẫu HCH04 có hàm lượng tương đương (307,1 mg/liều) và các mẫu BNH093 và HCH164 đều có hàm lượng thấp hơn (lần lượt 215,7 và 87,41 mg/liều).

Nhìn chung, nhiều mẫu dương tính được trộn với các chất CPM, CET và PAR có hàm lượng các chất vượt quá liều điều trị. Việc sử dụng quá

liều điều trị và kéo dài đối với những sản phẩm này có thể sẽ gây nên những tác dụng bất lợi, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của người sử dụng. Vì vậy, việc kiểm soát chất lượng các chế phẩm đông được đang lưu hành trên thị trường một cách chặt chẽ là rất cần thiết nhằm đảm bảo sức khỏe cộng đồng cũng như bảo vệ uy tín các cơ sở sản xuất thuốc đông được chân chính.

#### 4 Kết luận

Đã xây dựng phương pháp định lượng đồng thời paracetamol, clopheniramine maleate, cinnarizine, loratadine và cetirizine hydrochloride trong chế phẩm được liệu bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký: cột InertSustain™ C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm); pha động là hỗn hợp ACN (A) – 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 2,3) (B) theo chương trình gradient; tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; thể tích tiêm mẫu: 20 µL; nhiệt độ cột: 40 °C; bước sóng phát hiện: paracetamol: 245 nm, clorpheniramine maleate: 225 nm, cetirizine hydrochloride: 230 nm, loratadine: 254 nm và cinnarizine: 253 nm. Phương pháp phân tích được thẩm định có tính đặc hiệu cao, giới hạn phát hiện của paracetamol, clopheniramine maleate, cinnarizine, loratadine, cetirizine hydrochloride lần lượt là 2,00, 2,00, 1,75, 1,00 và 0,50 µg/mL; độ đúng và độ lặp lại cao. Đã áp dụng phân tích 32 mẫu thực tế trên thị trường và phát hiện 9 mẫu trộn thuốc hóa được chiếm tỉ lệ 28,1%.

## Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ của Bộ Giáo dục và Đào tạo từ Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ, mã số B2023-DHH-10

## Tài liệu tham khảo

1. Roman Stanaszek WL. Pharmaceutical preparations in illicit drug cases. *Problems of Forensic Sciences*. 2001;XLVI:152-7.
2. HU QC, Yi-ling; WANG, Ke; JI, Shen. Detection of 16 anti-inflammatory and anti-histamine chemical drugs added illegally into traditional Chinese medicine and health food by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry method *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2008;28(12):2065-8.
3. Miller GM, Stripp R. A study of western pharmaceuticals contained within samples of Chinese herbal/patent medicines collected from New York City's Chinatown. *Legal Medicine*. 2007;9(5):258-64.
4. Nili-Ahmadabadi A, Borzouee Z, Ahmadimoghaddam D, Firozian F, Dastan D. The occurrence of acetaminophen/codeine as an adulterant in herbal analgesic supplements in Hamadan, Iran: A pilot study. *Complement Ther Med*. 2019;42:223-5.
5. Kim JY, Choi JY, Yoon CY, Cho S, Kim WS, Do JA. LC-MS/MS monitoring of 22 illegal antihistamine compounds in health food products from the Korean market. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2015;58(1):137-47.
6. Bộ Y tế. Dược thư quốc gia Việt Nam. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học Hà Nội; 2007.
7. Bộ Y tế. Thông tư số 10/2021/TT-BYT ngày 30/06/2021 về "Quy định danh mục chất cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thực phẩm bảo vệ sức khỏe"; Hà Nội: Bộ Y tế; 2021.
8. Tuyền PTT, An NT, Hải ĐTT, Hạnh TT, Anh NTK. Nghiên cứu phát hiện các thuốc chống dị ứng trộn trái phép trong chế phẩm đông được bằng LC-MS/MS. *Tạp chí Dược học*. 2018;3(517):70-4.
9. Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41(2):554-64.
10. Kim EH, Seo HS, Ki NY, Park N-H, Lee W, Do JA, et al. Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2017;1491:43-56.
11. Lin Y-P, Lee Y-L, Hung C-Y, Chang C-F, Chen Y. Detection of adulterated drugs in traditional Chinese medicine and dietary supplements using hydrogen as a carrier gas. *PLOS ONE*. 2018;13(10):e0205371.
12. Song N, Zhang K, Liu X, Sang T, Sun Y, Teng N. Determination of twelve chemical drugs illegally added in herbal tea by ultra highperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with modified QuEChERS]. *Se Pu*. 2015;33(10):1026-31.
13. Khoshayand MR, Abdollahi H, Ghaffari A, Shariatpanahi M, Farzanegan H. Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches. *Daru*. 2010;18(4):292-7.
14. Chawe LCD, Tittikpina NK, Ndiaye SM, Diop A, Ndiaye B, Fall D, et al. Validation of an UV-Visible spectrophotometry assay method for the determination of chlorpheniramine maleate tablets without prior extraction. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2021;15(1).
15. Raad A, Al-healy F. UV-Spectral Studies on Chlorpheniramine Maleate In Pure Form And Pharmaceutical Preparations. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2021;64:4151-6.
16. Liu S-Y, Woo S-O, Koh H-L. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;24(5):983-92.
17. Kim JY, Do JA, Choi JY, Cho S, Kim WS, Yoon CY. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of 20 antihistaminics in dietary supplements. *Biomed Chromatogr*. 2015;29(3):465-74.

- 
18. AOAC. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: Appendix F, editor; 2016. p. 1–18.
  19. ICH. Validation of analytical procedures: Text and Methodology; 2005. p. 1–17.
  20. Lan TT, Quỳnh NT, Anh NTK. Nghiên cứu xác định một số thuốc kháng histamin H1 trộn trái phép trong chế phẩm Đông dược bằng HPLC-PDA. Tạp chí dược học. 2020;258:35-40.
  21. Chittrakarn S, Penjamras P, Keawpradub N. Quantitative analysis of mitragynine, codeine, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in a kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) cocktail using high-performance liquid chromatography. Forensic Sci Int. 2012;217(1–3):81-6.