

Xác định đồng thời acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil bằng phương pháp CE-C⁴D

Hoàng Thị Lan Anh¹, Nguyễn Thị Oanh^{1,2}, Đinh Thị Diệu³, Đỗ Yến Nhi¹,
Phạm Gia Bách¹, Vũ Thị Trang⁴, Nguyễn Thị Ánh Hoàng^{1*}, Lê Thị Hồng Hảo^{1,4†}

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

²Cục An toàn Thực phẩm, Bộ Y tế, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

⁴Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 04/05/2022; Ngày chấp nhận đăng: 03/06/2022)

Tóm tắt

Hiện nay, xu hướng sử dụng thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TPBVSK) giúp tăng cường, bổ trợ, nâng cao sức khỏe đang rất được ưa chuộng, đặc biệt là các sản phẩm có nguồn gốc từ tự nhiên. Một trong số đó là các sản phẩm tăng cường sinh lý nam. Tuy nhiên, nhiều sản phẩm đã bị phát hiện có chứa các thuốc điều trị rối loạn cương dương nhóm ức chế enzym phosphodiesterase-5 (PDE-5). Điều này gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người sử dụng. Phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) đã được sử dụng để nghiên cứu xác định đồng thời bốn chất nhóm PDE-5 (gồm: acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil) trong mẫu TPBVSK. Điều kiện phân tích được lựa chọn gồm: hệ đệm arginine (Arg) 20 mM/acid acetic (Ace)/acetonitrile (ACN) 20 % pH 6,5, mao quản silica đường kính trong 50 μ m với chiều dài hiệu dụng 50 cm, thế tách là 20 kV, bơm mẫu thủy động học kiểu xiphong ở độ cao 25 cm trong 30 s. Giới hạn phát hiện tương ứng đạt được với acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil lần lượt là 2,1 mg/L, 1,6 mg/L, 2,3 mg/L, 1,3 mg/L với độ lặp lại (< 5 %) và độ thu hồi tốt (97,6 - 101,3 %). Quy trình phân tích đã được áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng bốn chất nhóm PDE-5 trong ba mẫu TPBVSK. Kết quả bước đầu chưa phát hiện bốn chất PDE-5 trong các mẫu này. Để minh chứng khả năng áp dụng của phương pháp, hỗn hợp bốn chất chuẩn PDE-5 này đã được thêm vào ba mẫu và tiến hành xác định hiệu suất thu hồi. Kết quả các hiệu suất thu hồi đạt được trong khoảng 98,8 - 100,6 %, cho thấy phương pháp có tiềm năng áp dụng nhằm phân tích các chất PDE-5 trong mẫu TPBVSK.

Từ khóa: PDE-5, CE-C⁴D, acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil, mirodenafil

* Điện thoại: 0946593969

Email: nguyenthanhhuong@hus.edu.vn

† Điện thoại: 0904248167

Email: lethihonghao@yahoo.com

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với sự phát triển của xã hội, nhiều sản phẩm đã được phát triển để tăng cường sức khỏe cho con người, trong đó có tăng cường sinh lý ở nam giới. Một trong các sản phẩm được ưa chuộng sử dụng là thực phẩm bảo vệ sức khỏe có nguồn gốc từ thiên nhiên. Tuy nhiên, một số nhà sản xuất đã thêm trái phép các thuốc tân dược vào thực phẩm bảo vệ sức khỏe nhằm tăng cường hiệu quả của sản phẩm và gia tăng lợi nhuận. Điều này gây ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người sử dụng, với nhiều triệu chứng như: đột ngột mất thị lực nghiêm trọng, mất thính giác, khó thở, dương vật cương cứng, đau kéo dài,... [1, 2, 3]. Do đó, việc xác định sự có mặt của các thuốc điều trị rối loạn cương dương nhóm PDE-5 trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe là cần thiết, nhằm bảo đảm chất lượng sản phẩm và bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

Các phương pháp thường được sử dụng để xác định các chất nhóm PDE-5 là: quang phổ hấp thụ phân tử (UV-Vis) [4], phương pháp sắc ký lỏng kết hợp nhiều loại detector khác nhau [3, 5, 6], phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) [7], phương pháp sắc ký lớp mỏng kết hợp phổ Raman tăng cường bề mặt (TLC-SERS) [8]. Trong nghiên cứu này, phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D) [9] đã được sử dụng để xác định đồng thời bốn chất nhóm PDE-5 gồm: acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Phương pháp có ưu điểm là đơn giản, chi phí thấp, sử dụng ít dung môi và hóa chất, hy vọng sẽ góp phần vào làm phong phú thêm các kỹ thuật kiểm nghiệm nhóm chất PDE-5 nói riêng và các thành phần khác trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe nói chung.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc loại tinh khiết phân tích (P.A). Các chất chuẩn gồm acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil được mua từ hãng Toronto Research Chemicals (Canada) và LGC Standards (Đức). Các hóa chất khác gồm: L-arginin (Arg), L-histidin (His), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), acid 2-(N-morpholino)ethanesulfonic (Mes), acetonitrile (ACN), acid acetic (Ace) của hãng Merck hoặc Fluka. Các dung dịch được pha bằng nước deion.

2.2. Thiết bị và dụng cụ

Hệ thiết bị điện di mao quản CE-C⁴D sử dụng trong nghiên cứu [10] được cung cấp bởi công ty 3Sanalysis. Máy đo pH của hãng HANNA, cân phân tích của hãng Scientech (Mỹ) có độ chính xác đến $\pm 0,1$ mg. Máy rung siêu âm, có gia nhiệt và các dụng cụ thông thường khác trong phòng thí nghiệm.

Mao quản sử dụng là mao quản silica, chiều dài 60 cm (chiều dài hiệu dụng là 50 cm) đường kính trong (ID) là 50 μ m, đường kính ngoài (OD) là 375 μ m.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thông tin mẫu và xử lý mẫu

Ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng tăng cường sinh lý nam được mua ngẫu nhiên trên thị trường ở Hà Nội.

Mẫu dưới dạng viên nang cứng: lấy 20 viên và cân khối lượng, tách vỏ, làm sạch phần vỏ và cân khối lượng vỏ. Xác định khối lượng trung bình của ruột viên bằng cách lấy trung bình tổng khối lượng trừ đi trung bình khối lượng vỏ. Cân chính xác một lượng mẫu tương ứng với khối lượng trung bình của ruột viên, thêm 10 mL nước deion, rung siêu âm cho tan hết và chuyển vào bình định mức 25 mL, định mức tới vạch bằng nước deion. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 μm và pha loãng (nếu cần) trước khi tiến hành phân tích trên thiết bị CE-C⁴D.

Mẫu trắng sử dụng trong nghiên cứu là mẫu bột mì. Mẫu trắng được dùng để đánh giá độ đúng và độ chụm của phương pháp.

Mẫu thêm chuẩn: Chất chuẩn được thêm vào sau khi mẫu đã được nghiền mịn và đồng nhất. Sau đó, mẫu được trộn đều và bảo quản trong bình hút ẩm ở điều kiện nhiệt độ phòng ít nhất trong 3 giờ rồi tiến hành xử lý, phân tích theo quy trình như trên.

2.3.2. Phương pháp phân tích

Phương pháp phân tích sử dụng trong nghiên cứu này là điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D). Phương pháp có ưu điểm là đơn giản, chi phí thấp và hiệu quả phân tích cao. Phương pháp CE-C⁴D có tiềm năng xác định các chất thuộc nhóm PDE-5 nhờ vào khả năng tách tốt của CE và khả năng phát hiện vạm vãng của detector C⁴D.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

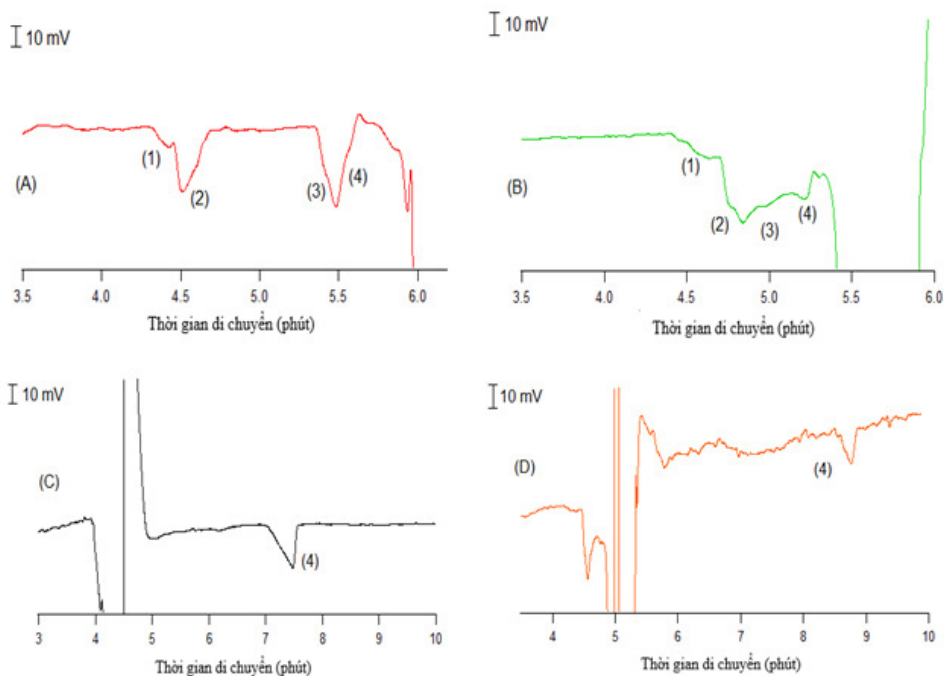
Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện phân tách đồng thời bốn chất nhóm PDE-5

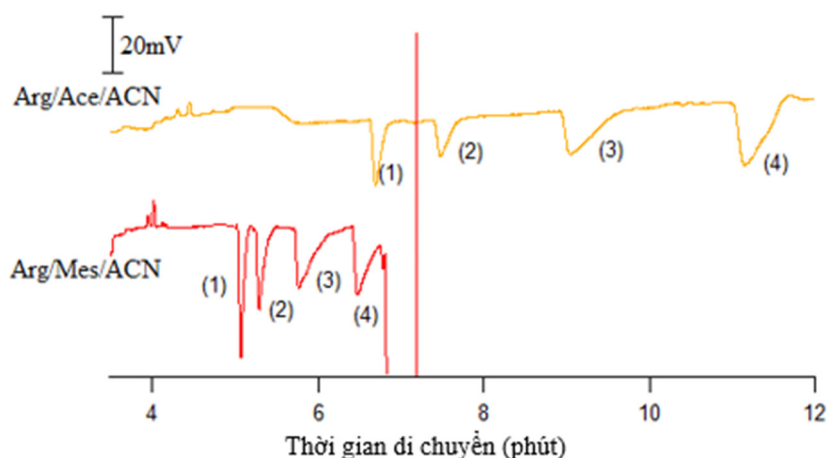
3.1.1. Khảo sát hệ đệm điện di

Thành phần và giá trị pH của dung dịch đệm điện di là yếu tố quyết định trực tiếp đến quá trình phân tách các chất. Các yếu tố này ảnh hưởng đến sự phân ly, thay đổi điện tích, tốc độ di chuyển của các chất trong mao quản. Vì vậy, cần phải khảo sát lựa chọn thành phần, pH của dung dịch đệm điện di thích hợp nhằm đạt được khả năng phân tách các chất tốt nhất. Việc khảo sát dung dịch đệm điện di được thực hiện trên cơ sở sử dụng một hợp phần base thường dùng trong phương pháp CE-C⁴D là arginine (Arg), tris(hydroxymethyl) aminomethan (Tris), histidin (His) kết hợp với các hợp phần acid như acid 2-(N-morpholino) ethanesulfonic (Mes) hoặc acid acetic (Ace). Kết quả khảo sát thành phần dung dịch đệm điện di được thể hiện trong Hình 1.



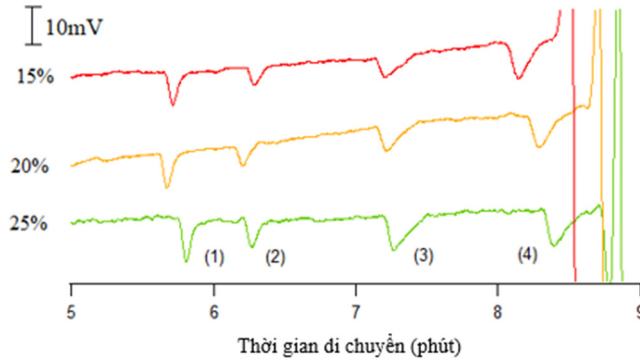
Hình 1. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần dung dịch đệm điện di Arg/Mes (A), đệm Arg/Ace (B), đệm His/Ace (C), đệm Tris/Ace (D) đến sự phân tách của (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil 50 mg/L, thế tách +20 kV

Kết quả khảo sát cho thấy, trong số bốn hệ đệm khảo sát, hai hệ đệm Arg/Mes và Arg/Ace cho tín hiệu đầy đủ của bốn chất sẽ được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo. Tuy nhiên, trong cả hai đệm này, bốn chất hầu như không phân tách ra khỏi nhau. Do đó, acetonitrile (ACN) đã được thêm vào các hệ đệm để làm thay đổi độ phân cực, tăng cường hiệu quả phân tách các chất PDE-5. Kết quả được thể hiện trong Hình 2.



Hình 2. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thành phần ACN 20 % khi thêm vào dung dịch đệm điện di đến sự phân tách của (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil 50 mg/L, thế tách +20 kV

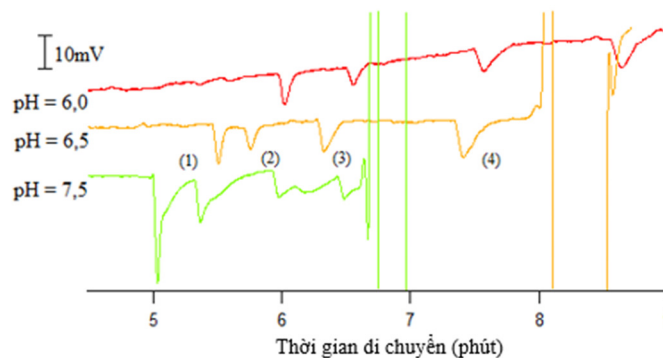
Kết quả ở Hình 3 cho thấy, khi thêm ACN 20 % vào hai hệ đệm Arg/Mes và Arg/Ace đều đã cho tín hiệu bốn chất tách tốt ra khỏi nhau. Trong đó, hệ đệm Arg/Ace/ACN cho đường nền ổn định, độ phân giải giữa các pic rất tốt và pic của các chất (đặc biệt là mirodenafil) không bị ảnh hưởng nhiều bởi dòng EOF như đối với hệ đệm Arg/Mes/ACN. Do đó, hệ đệm Arg/Ace/ACN được sử dụng để khảo sát tỷ lệ ACN (15, 20 và 25 %) thêm vào thành phần hệ đệm. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ ACN đến sự phân tách của (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil 50 mg/L, thế tách +20 kV

Kết quả cho thấy, với tỷ lệ ACN 20 % trong dung dịch đệm thì các chất được tách tương đối tốt, các pic khá cân đối và sắc nét, đường nền ổn định hơn so với các tỷ lệ khác. Do đó, tỷ lệ ACN 20 % thêm vào hệ đệm điện di được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

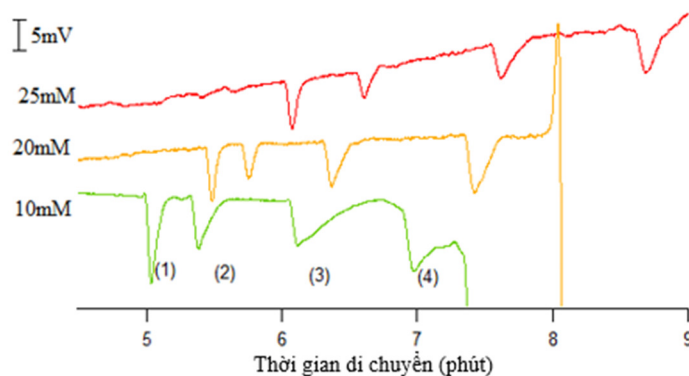
pH là yếu tố ảnh hưởng nhiều đến quá trình phân ly và phân tách điện di của các chất. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của pH được khảo sát trong khoảng rộng từ pH từ 2,0 đến 9,0 (kết quả không được thể hiện) và tập trung trong vùng pH từ 6,0 đến 7,5 (Hình 4).



Hình 4. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của pH đến sự phân tách của (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil 50 mg/L, thế tách +20 kV

Kết quả ở Hình 4 cho thấy, khi pH tăng, tổng thời gian phân tích giảm nhưng diện tích pic và khả năng tách pic của các chất cũng giảm. Cũng có thể thấy tại giá trị pH 6,5 cho kết quả tốt nhất về cả diện tích pic, độ phân giải giữa các pic, tín hiệu đường nền ổn định và thời gian phân tích hợp lý. Do đó, hệ đệm Arg/Ace/ACN 20 %, pH 6,5 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Cùng với pH và thành phần thì nồng độ dung dịch đệm cũng ảnh hưởng nhiều đến kết quả phân tích điện di. Việc khảo sát nồng độ đệm điện di được thực hiện trên cơ sở hệ đệm Arg/Ace/ACN 20 %, pH 6,5 với các nồng độ Arg 10 mM, 20 mM, 25 mM. Kết quả được thể hiện trong Hình 5.

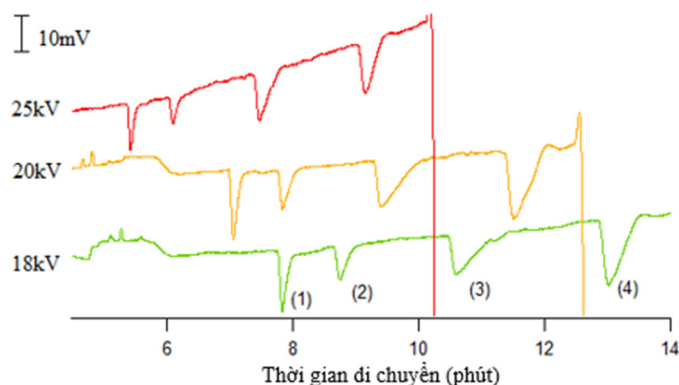


Hình 5. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đệm điện di đến sự phân tách của (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil 50 mg/L, thế tách +20 kV

Kết quả cho thấy, tại nồng độ Arg 20 mM thì các chất được tách tương đối tốt, các pic khá cân đối và sắc nét, tín hiệu ổn định hơn so với các nồng độ khác. Vì vậy, hệ đệm Arg 20 mM/Ace/ACN 20 %, pH 6,5 được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Quá trình điện di chỉ xảy ra khi có nguồn điện thế một chiều nhất định đặt vào hai đầu mao quản, điện thế này có vai trò điều khiển và duy trì sự di chuyển của các chất trong mao quản. Để có kết quả tốt và ổn định cần phải chọn thế thích hợp và giữ cho thế này luôn ổn định trong suốt quá trình phân tách. Các thế tách được lựa chọn để khảo sát là 18 kV, 20 kV, 25 kV. Kết quả khảo sát thế tách được thể hiện trong Hình 6.



Hình 6. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của thế tách đến sự phân tách của (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil 50 mg/L. Dung dịch đệm điện di Arg 20 mM/Ace/ACN 20%, pH 6,5.

Kết quả thể hiện trên điện di đồ Hình 6 cho thấy, khi tăng thế tách từ 18 kV đến 25 kV, thời gian di chuyển của chất phân tích và độ phân giải giữa các pic giảm. Tại thế tách 20 kV cho kết quả đường nền ổn định, thời gian phân tích và độ phân giải phù hợp. Vì vậy, thế tách 20 kV được lựa chọn trong nghiên cứu này.

3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và chiều cao bơm mẫu

Trong quá trình nạp mẫu vào mao quản, lượng mẫu nạp phải đủ lớn để đảm bảo đạt độ nhạy tốt nhưng nếu vùng nạp vào quá lớn thì sự phân tán sẽ xuất hiện mạnh do hiện tượng khuếch tán làm giảm hiệu suất tách. Do đó, thời gian bơm mẫu và chiều cao bơm mẫu hợp lý cũng cần được khảo sát để đảm bảo thu được tín hiệu lớn nhất mà pic không bị giãn rộng. Trên cơ sở khảo sát với các thời gian bơm mẫu 20 s, 30 s, 40 s và chiều cao bơm mẫu 20 cm, 25 cm, 30 cm cho thấy, khi thời gian và chiều cao bơm mẫu tăng, thời gian di chuyển của cả bốn chất phân tích hầu như không thay đổi hoặc thay đổi rất ít nhưng tín hiệu (diện tích) pic thì tăng đáng kể do lượng mẫu được bơm vào mao quản tăng lên. Tuy nhiên, để đảm bảo hiệu quả phân tách và độ nhạy phù hợp cho phép đo, thời gian 30 s và chiều cao bơm mẫu là 25 cm được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

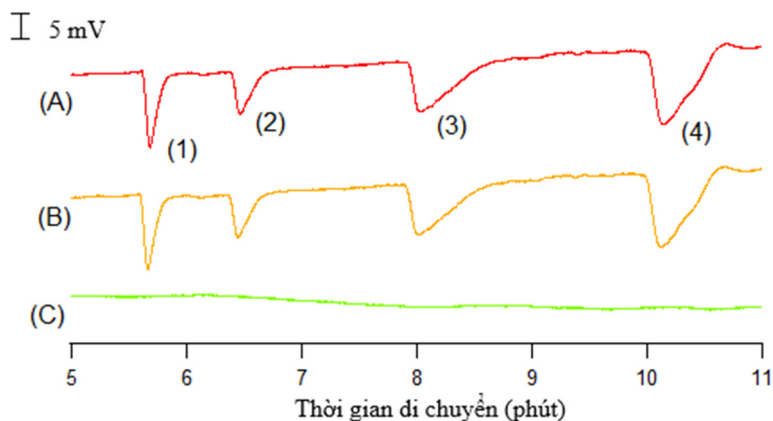
3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu của phương pháp

Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp được trình bày trong Bảng 1 và Hình 7. Mẫu trắng không cho tín hiệu trùng với thời gian lưu của chất phân tích. Mẫu thêm chuẩn có tín hiệu trùng thời gian di chuyển của các chất phân tích trong mẫu chuẩn (độ lệch chuẩn tương đối (RSD) $\leq 2\%$). Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu tốt, đáp ứng yêu cầu.

Bảng 1. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp

Tên chất	Loại mẫu	Thời gian di chuyển (phút)	RSD (%)
	Mẫu trắng	-	
<i>Acetyl vardenafil</i>	Mẫu chuẩn	5,513	-1,72
	Mẫu thực thêm chuẩn	5,608	
<i>Hydroxy acetildenafil</i>	Mẫu chuẩn	6,479	-1,67
	Mẫu thực thêm chuẩn	6,587	
<i>Homosildenafil</i>	Mẫu chuẩn	8,268	1,32
	Mẫu thực thêm chuẩn	8,159	
<i>Mirodenafil</i>	Mẫu chuẩn	10,283	0,86
	Mẫu thực thêm chuẩn	10,195	



Hình 7. Điện di đồ mẫu thực thêm chuẩn (A) và dung dịch chuẩn (B), mẫu thực không thêm chuẩn (C), (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil

3.2.2. Xây dựng đường chuẩn

Các dung dịch dùng để dựng đường chuẩn được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc. Các dung dịch này có nồng độ biến thiên trong khoảng 25 mg/L đến 125 mg/L. Giá trị diện tích pic trung bình của các lần đo lặp lại ($n = 3$) là số liệu để dựng đường chuẩn sự phụ thuộc vào nồng độ các chất phân tích. Các kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số hồi qui tương ứng được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phương trình đường chuẩn và hệ số hồi qui

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn	R^2	P
Acetyl vardenafil	$y = 2,2453x - 16,226$	0,9972	< 0,005
Hydroxy acetildenafil	$y = 1,7636x - 7,906$	0,9961	
Homosildenafil	$y = 1,7148x + 15,415$	0,9975	
Mirodenafil	$y = 2,3895x - 2,508$	0,9988	

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, đường chuẩn của homosildenafil, acetyl vardenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil đều có hệ số tương quan tuyến tính biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ là tương đối tốt ($R^2 > 0,99$), đồng thời giá trị $P < 0,005$ chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính.

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

Giới hạn phát hiện (LOD) được xác định bằng cách pha loãng dần hỗn hợp dung dịch chuẩn của các chất phân tích tới nồng độ nhỏ nhất mà cho tín hiệu đo $S/N = 3$. Giới hạn định lượng (LOQ) được tính bằng 10 lần S/N . Kết quả xác định LOD và LOQ được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định LOD và LOQ

<i>Chất phân tích</i>	<i>LOD (mg/L)</i>	<i>LOQ (mg/L)</i>	<i>Chiều cao pic (S)</i>	<i>Tín hiệu nhiễu nền (N)</i>	<i>S/N ở giá trị LOD</i>
<i>Acetyl vardenafil</i>	2,1	6,9	0,17		3,4
<i>Hydroxy acetildenafil</i>	2,3	7,6	0,16	0,05	3,2
<i>Homosildenafil</i>	1,6	5,3	0,18		3,6
<i>Mirodenafil</i>	1,3	4,3	0,16		3,2

Như vậy, giới hạn phát hiện (LOD) của homosildenafil, acetyl vardenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil lần lượt là 2,1 mg/L, 2,3 mg/L, 1,6 mg/L và 1,3 mg/L. Giới hạn định lượng (LOQ) tương ứng của homosildenafil, acetyl vardenafil, hydroxy acetildenafil và mirodenafil lần lượt là 6,9 mg/L, 7,6 mg/L, 5,3 mg/L và 4,3 mg/L. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp, mặc dù chưa đạt được tương đương với các phương pháp sắc ký [3, 5, 6], nhưng có thể ứng dụng phù hợp để phân tích sàng lọc nhanh các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thêm trái phép các chất PDE-5.

3.2.3. Đánh giá độ chụm và độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi trung bình khi phân tích mẫu trắng được thêm chuẩn bốn chất phân tích ở ba nồng độ khác nhau 25 mg/L, 50 mg/L và 100 mg/L. Phương pháp cho kết quả thu hồi tương đối tốt với cả bốn chất phân tích từ 97,6 - 101,3 %. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD1 - RSD5) tương ứng của diện tích pic đối với mẫu trắng thêm chuẩn bốn chất phân tích ở nồng độ 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L và 125 mg/L được sử dụng để đánh giá độ lặp lại của phương pháp (n = 7). Kết quả độ lệch chuẩn dao động trong khoảng từ 0,79 - 4,29 % (Bảng 4). Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC [11].

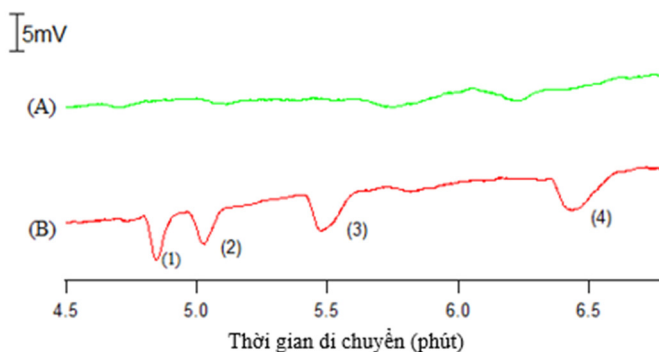
Bảng 4. Kết quả đánh giá độ chụm và độ đúng

<i>Chất</i>	<i>Hiệu suất thu hồi (%)</i>	<i>RSD1 (%) (n = 7, 25 mg/L)</i>	<i>RSD2 (%) (n = 7, 50 mg/L)</i>	<i>RSD3 (%) (n = 7, 75 mg/L)</i>	<i>RSD4 (%) (n = 7, 100 mg/L)</i>	<i>RSD5 (%) (n = 7, 125 mg/L)</i>
<i>Acetyl vardenafil</i>	100,8	4,29	3,59	1,15	1,17	1,09
<i>Hydroxy acetildenafil</i>	97,6	2,89	2,57	3,46	1,08	1,63
<i>Homosildenafil</i>	99,6	2,01	2,21	1,81	1,21	0,96
<i>Mirodenafil</i>	101,3	1,97	1,94	0,79	0,85	1,17

3.3. Phân tích mẫu thực tế

Quy trình phân tích đã được áp dụng để phân tích hàm lượng bốn chất PDE-5 trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe (M1, M2, M3) thu thập ngẫu nhiên trên địa bàn Hà Nội. Kết quả cho thấy không phát hiện bất cứ chất phân tích nào trong ba mẫu này. Để minh chứng khả năng áp dụng của phương pháp, các mẫu này đã được thêm chuẩn bốn chất phân

tích với các mức nồng độ 25, 50, 100 mg/L và xác định hiệu suất thu hồi. Kết quả được thể hiện trong Hình 8 và Bảng 5.



Hình 8. Điện di đồ mẫu M1 chưa thêm chuẩn (A) và đã thêm chuẩn (B), (1) acetyl vardenafil, (2) hydroxy acetildenafil, (3) homosildenafil và (4) mirodenafil

Bảng 5. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi (%) trung bình ($n = 3$) ở ba mức nồng độ của 4 chất phân tích thêm chuẩn vào các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe

	<i>Acetyl vardenafil</i>	<i>Hydroxy acetildenafil</i>	<i>Homosildenafil</i>	<i>Mirodenafil</i>
M1	99,6	98,9	98,8	99,2
M2	99,3	99,1	99,3	100,5
M3	100,6	99,3	99,6	99,7

Các kết quả thu được từ Bảng 5 cho thấy, hiệu suất thu hồi của bốn chất phân tích khi thêm chuẩn vào các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe dao động trong khoảng 98,8 - 100,6%. Kết quả này cho thấy phương pháp có tiềm năng áp dụng để xác định hàm lượng bốn chất PDE-5 trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp CE-C⁴D đã được phát triển để xác định đồng thời bốn chất nhóm PDE-5 gồm: acetyl vardenafil, hydroxy acetildenafil, homosildenafil, mirodenafil trong mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Phương pháp đã được đánh giá có độ đúng và độ chụm đáp ứng yêu cầu của AOAC. Quy trình phân tích đã được áp dụng để xác định đồng thời bốn chất nhóm PDE-5 trong ba mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe có tác dụng tăng cường sinh lý nam thu thập ngẫu nhiên trên thị trường. Kết quả không phát hiện bốn chất PDE-5 trong các mẫu này. Việc xác định độ thu hồi đã được thực hiện với các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe thêm chuẩn ở ba mức nồng độ các chất phân tích khác nhau, cho thấy phương pháp có tiềm năng xác định các chất PDE-5 trong các mẫu thực phẩm bảo vệ sức khỏe với hiệu suất tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Ministry of Health, Vietnam National Pharmacopoeia, Medicine Publishing House, Hanoi, 2007.
- [2]. Y. K. Gupt, T. Kaleekal, and S. Joshi, "Missue of Coritcosteroids in some of the drugs dispensed as prepreparations from alternative systems of medicine in India," *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, vol. 9, pp. 599-6002, 2000.
- [3]. P. Zou, S. S.-Y. Oh, P. Hou, M.-Y. Low, and H.-L. Koh, "Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1104, no. 1-2, pp. 113-122, 2006.
- [4]. Amir Alhaj Sakur, Shaza Affas, "Validated spectrophotometric method to determine vardenafil and sildenafil in pharmaceutical forms using potassium iodide and potassium iodate," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 9, no. 10, pp. 65, 2017.
- [5]. S. K. Lee, Y. Kim, T. K. Kim, G-J. Im, B-Y. Lee, D-H. Kim, C. Jin, and H. H. Yoo, "Determination of mirodenafil and sildenafil in the plasma and corpus cavernous of SD male rats," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 49, no. 2, pp. 513-518, 2009.
- [6]. W. F. Smyth, V. Rodriguez, "Recent studies of the electrospray ionisation behaviour of selected drugs and their application in capillary electrophoresis-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 1159, no. 1-2, pp. 159-174, 2007.
- [7]. D. N. Patel, L. Li, C.L. Kee, X. Ge, M.-Y. Low, and H.L Koh, "Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: Analytical techniques and challenges," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 87, pp. 176-190, 2014.
- [8]. D. T. C. Minh, L. A. Thi, N. T. T. Huyen, L. V. Vu, N. T. K. Anh, and P. T. T. Ha, "Detection of sildenafil adulterated in herbal products using thin layer chromatography combined with surface enhanced Raman spectroscopy: "Double coffee-ring effect" based enhancement," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 174, pp. 340-347, 2019.
- [9]. Le Thi Hong Hao, Pham Thi Ngoc Mai, Nguyen Thi Anh Huong, Nguyen Van Anh, Pham Tien Duc, Vu Thi Trang, "Application of electrophoresis in food analysis", *Science and Technics Publishing House*, 2016.
- [10]. T. A. H. Nguyen, T. N. M. Pham, T. T. Doan, T. T. Ta, J. S'aiz, T. Q. H. Nguyen, P. C. Hauser, and T. D. Mai, "Simple semi-automated portable capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection for the determination of β -agonists in pharmaceutical and pig-feed samples," *Journal of Chromatography A*, vol. 1360, pp. 305-311, 2014.
- [11]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements*, 2012.

Simultaneous determination of acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil and mirodenafil by CE-C⁴D

Hoang Thi Lan Anh¹, Nguyen Thi Oanh^{1,2}, Dinh Thi Diu³, Do Yen Nhi¹,
Pham Gia Bach¹, Vu Thi Trang⁴, Nguyen Thi Anh Huong¹, Le Thi Hong Hao^{1,4}

¹*Faculty of Chemistry, Hanoi University of Science,*

Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

²*Vietnam Food Administration, Ministry of Health, Hanoi, Vietnam*

³*Faculty of Environmental Science, Hanoi University of Science,*

Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

⁴*National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam*

Abstract

Dietary supplements are currently popular because of their natural origin, especially male enhancement products. However, some of these products have been found to contain erectile dysfunction drugs that inhibit the enzyme phosphodiesterase-5 (PDE-5), leading to adverse effects on human health. In this study, capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) was used to determine four PDE-5 inhibitors (including acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil and mirodenafil) in dietary supplement samples. The optimum analytical conditions included electrolyte solution of 20 mM arginine (Arg)/ acid acetic (Ace)/acetonitrile (ACN) 20% pH 6.5, silica capillary 50 µm inner diameter with effective length of 50 cm, separation voltage of 20kV, siphoning hydrodynamic injection at a height of 25 cm for 30 s. At the optimum analytical conditions, the limits of detection of acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil, and mirodenafil were 2.1, 1.6, 2.3, and 1.3 mg/L, respectively. The analysis of four PDE-5 inhibitors by CE-C⁴D also showed good repeatability (< 5 %) and recovery (> 97 %). This method was further applied to simultaneously determine the amount of acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil, and mirodenafil in three functional products. All four PDE-5 inhibitors were not detected in these samples. To demonstrate the utility of this method, the mixture of four PDE-5 inhibitors standard solutions was added to three samples. The recovery was between 98.8 % and 100.6%, illustrating the potential applicability of the method of determining PDE-5 inhibitors in dietary supplement samples.

Keywords: PDE-5, CE-C⁴D, acetyl vardenafil, homosildenafil, hydroxy acetildenafil, mirodenafil.