

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF FIVE PHOSPHODIESTERASE TYPE 5 (PDE-5) INHIBITOR IN POSTMORTEM BLOOD SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

NGUYEN VIET CHINH¹,✉, DANG DUC KHANH¹, HOANG THI QUE CHI¹

DO THU HIEN², TRAN NGUYEN HA², NGUYEN VIET DOANH³

¹Institute of Military Forensic Medicine

²Hanoi University of Pharmacy

³Ho Chi Minh City Forensic Center

✉Corresponding author: nguyenvietchinh0301@gmail.com

Received December 9th, 2024

Accepted January 10th, 2025

ABSTRACT: This study developed a method for the simultaneous qualitative and quantitative analysis of five selective phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors, including sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, and thiosildenafil, in postmortem blood samples using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). This method is developed based on current FDA guidelines. **Results:** Isotopes Warfarin- d_5 was used as internal standard. The procedure for samples treatment was simple with the value of recovery being higher than 85 % and repeatability being lower than 15.0 %. The experimental results showed that the limit of detection (LOD) of the analytes ranged from 0.02 to 0.03 ng/mL. The linearity of the method was in the range of 1 ng/mL to 250 ng/mL with a good correlation coefficient (R^2) from 0.9989 to 0.9993.

Keywords: PDE-5, sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, thiosildenafil, post-mortem blood samples, LC-MS/MS.

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI 5 CHẤT ỨC CHẾ PHOSPHODIESTERASE TYPE 5 (PDE-5) TRONG MÁU NGƯỜI CHẾT BẰNG SẮC KÝ LÔNG GHÉP NỐI HAI LẦN KHỐI PHỔ

NGUYỄN VIỆT CHÍNH¹,✉, ĐẶNG ĐỨC KHANH¹, HOÀNG THỊ QUÊ CHI¹

ĐỖ THU HIỀN², TRẦN NGUYỄN HÀ², NGUYỄN VIỆT DOANH³

¹Viện Pháp y Quân đội

²Trường Đại học Dược Hà Nội

³Trung tâm Pháp y Thành Phố Hồ Chí Minh

✉Tác giả liên hệ: nguyenvietchinh0301@gmail.com

Nhận bài ngày 09 tháng 12 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 01 năm 2025

Tóm tắt: Nghiên cứu phát triển một phương pháp định tính và định lượng đồng thời 5 chất ức chế phosphodiester nhóm 5 (PDE-5), bao gồm sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil và thiosildenafil trong mẫu máu giám định pháp y bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS-MS). Phương pháp được khảo sát theo hướng dẫn hiện hành của FDA. Kết quả: Phương pháp sử dụng Warfarin- d_5 làm nội chuẩn. Quy trình xử lý mẫu đơn giản, độ thu hồi của các chất lớn hơn 85 % và độ lệch chuẩn tương đối dưới 15,0 %. Kết quả nghiên cứu cho thấy giới hạn phát hiện (LOD) của các chất phân tích nằm trong khoảng từ 0,02 đến 0,03 ng/mL. Khoảng tuyến tính khảo sát các chất có hàm lượng từ 1 ng/mL đến 250 ng/mL với hệ số tương quan tốt (R^2) từ 0,9989 đến 0,9993.

Từ khóa: PDE-5, sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, thiosildenafil, mẫu máu người chết, LC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, trong những năm trở lại đây các vụ án liên quan đến yếu tố tình dục đã có sự gia tăng cả về số vụ cũng như tính chất từng vụ, gây hậu quả nghiêm trọng, ảnh hưởng đến an ninh, chính trị và xã hội[1]. Trong nhiều vụ án, các hoạt chất cương dương bị lạm dụng để thực hiện hành vi tình dục nhằm đạt được thỏa mãn trong quan hệ. Tuy nhiên, hiện nay việc giám định định lượng các hoạt chất cương dương trong máu tại Việt Nam chưa có quy trình cũng như hướng dẫn cụ thể [2].

Sắc ký lỏng kết hợp với detector khối phổ nối tiếp 2 lần (LC-MS/MS) được xem là thiết bị phân tích hiện đại, với nhiều điểm ưu việt như có độ nhạy, độ ổn định, độ chính xác cao và thao tác xử lý đơn giản giúp phân tích nhanh các hoạt chất cương dương trong máu vừa tiết kiệm thời gian, cũng như chi phí [3],[4],[5]. Nghiên cứu xây dựng một quy trình phân tích đồng thời, chính xác các hoạt chất cương dương trong mẫu máu sử dụng thiết bị LC-MS/MS, kết hợp với kỹ thuật chiết lỏng-lỏng giúp xử lý mẫu nhanh, đơn giản, lượng mẫu dùng trong phân tích ít nên có ý nghĩa thực tiễn cao, phục vụ công tác giám định và điều tra cho kết quả nhanh chóng, chính xác.

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống sắc ký lỏng kết nối detector 2 lần khối phổ (LC-MS/MS 8045) của hãng Shimadzu; cân phân tích Sartorius (độ chính xác 10_{-4} g); bể rung siêu âm Elmasonic S100; máy ly tâm Rotina 380, bộ làm khô mẫu bằng khí nitơ; micropipet các thể tích từ 2,0-1000,0 μ L; các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác và các dụng cụ cần thiết khác trong phòng thí nghiệm. Thiết bị và dụng cụ được hiệu chuẩn định kỳ theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn: sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, thiosildenafil và warfarin- d_5 (IS) được mua từ hãng

Cayman Chemicals có code lần lượt là 10008671, 14024, 14930, 23024, 13939, 25432 nguyên trạng.

Dung môi, hóa chất: ethylacetat (EA); diethyl ete; chloroform; methanol (MeOH); acid formic (HCOOH), NH_4OH 10%; nước deion.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Hoạt chất cương dương trong mẫu máu.

- Mẫu sử dụng nghiên cứu: Mẫu máu blank (6 mẫu) được lấy từ những người tình nguyện khỏe mạnh không sử dụng thuốc. 24 mẫu máu thực tế lấy của nam giới chết trong khách sạn sau khi quan hệ tình dục được cung cấp bởi các cơ quan điều tra.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

* Điều kiện sắc ký lỏng

- Cột Shim-pack Velox Biphenyl- C_{18} ($2,1 \times 50$ mm, $2,7 \mu\text{m}$) của hãng Shimadzu.

- Pha động: Pha động: A: acid formic 0,1 % trong nước deion; B: acid formic 0,1 % trong methanol. Chạy chương trình gradient.

- Tốc độ dòng: 0,4 ml/phút

- Thể tích tiêm: 3 μL

* Điều kiện khối phổ

Sử dụng detector ghép nối 2 lần khối phổ Triple Quadrupole (MS/MS). Kiểu phân tích theo chế độ ion hóa đầu phun điện tử (ESI) bắn phá ion dương. Phân tích dung dịch chuẩn và nội chuẩn ở chế độ full scan để xác định lựa chọn precursor ion. Tiếp theo, tiến hành phân tích theo chế độ production để xác định mảnh con, từ đó lựa chọn mảnh ion để phân tích theo chế độ MRM (Multiple Reaction Monitoring). Tối ưu hóa phương pháp bằng phần mềm Optimization của thiết bị.

* Chuẩn bị mẫu

Lấy chính xác 1,0mL máu vào ống nghiệm 5 mL, thêm 50 μL dung dịch nội chuẩn warfarin- d_5 (nồng độ

1000 ng/mL). Sau đó, mẫu máu được kiềm hóa bằng 50 μ L dung dịch NH_4OH 10 %, lắc đều, để yên trong 15 phút. Thêm 2 mL dung dịch Chloroform và đem lắc trong 60 phút. Mẫu được ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 1,0 mL lớp dung môi và lọc qua màng 0,22 μm . Làm bay hơi dung môi dưới dòng khí nitơ ở 40°C. Hòa tan cân bằng 500 μL methanol, dịch thu được dùng để phân tích LC-MS/MS.

* Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của US-FDA gồm các chỉ tiêu: Độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), khoảng tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại[6].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ MS/MS

Khảo sát tìm mảnh phân tử mẹ, mảnh con, chế độ ion hoá mẫu dựa vào chuẩn đơn chất sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, thiosildenafil và warfarin- d_5 cùng nồng độ 1000 ng/mL. Mỗi chất lựa chọn 3 mảnh ion trong đó 1 mảnh tín hiệu cao để định lượng và 2 mảnh để định tính. Kết quả khảo sát được trình bày dưới Hình 1. Tiến hành tự động tối ưu hóa để tìm điều kiện MS/MS bằng phần mềm Optimazation, kết quả điều kiện khối phổ được trình bày dưới Bảng 1.

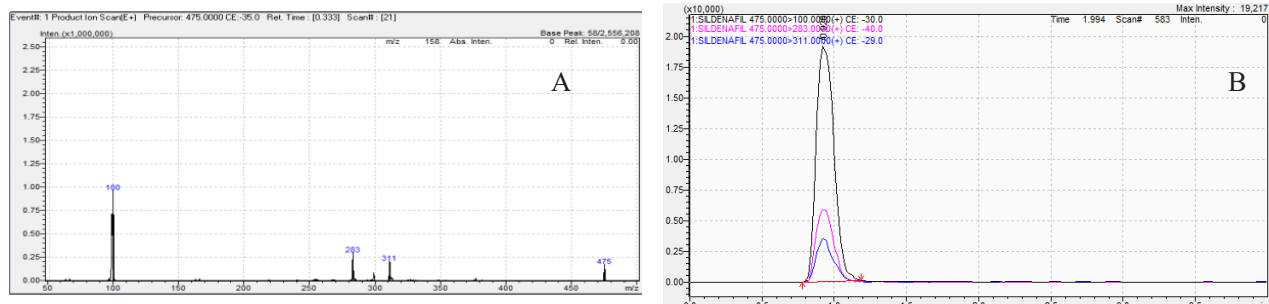
Điều kiện khối phổ: Nhiệt độ interface, DL-desolvation line, desolvate hóa lần lượt là 300°C, 250°C, 526°C. Tốc độ khí phun sương, khí làm nóng, khí làm khô lần lượt là 3 mL/phút, 10 mL/phút, 10 mL/phút.

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều kiện phân tích trên khối phổ

(* mảnh dùng để định lượng)

STT	Chất phân tích	Thời gian lưu (min)	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	Q1 (V)	Collision Energy (CE) (eV)	Q3 (V)
1	Vardenafil	0,842	489,0	151*	12	46	14
				312	29	39	22
				299	21	38	29
2	Sildenafil	0,934	475,0	100*	20	30	17
				283	21	40	30
				311	12	29	30
3	Avanafil	1,831	484,0	155	21	44	28
				375*	28	25	26
				233	29	37	24
4	Thiosildenafil	2,185	491,0	58*	10	50	10
				299	21	40	30
				341	30	30	24
5	Tadalafil	2,377	390,0	135*	17	24	26
				262	10	28	29
				205	10	41	13
6	Warfarin- d_5	2,160	312,0	117	-15	-37	-23
				161*	-15	-19	-17
				255	-15	-23	-18

Hình 1. Mảnh con lựa chọn phân tích (A) và sắc ký đồ (B) của Sildenafil.



Nhận xét: Từ kết quả bảng 1 và các điều kiện khối phổ đã khảo sát được, nhận thấy điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử chất phân tích tại chế độ $[M+H]^+$. Mỗi chất phân tích nghiên cứu lựa chọn 3 mảnh m/z ion con để định tính và định lượng.

3.2. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký lỏng

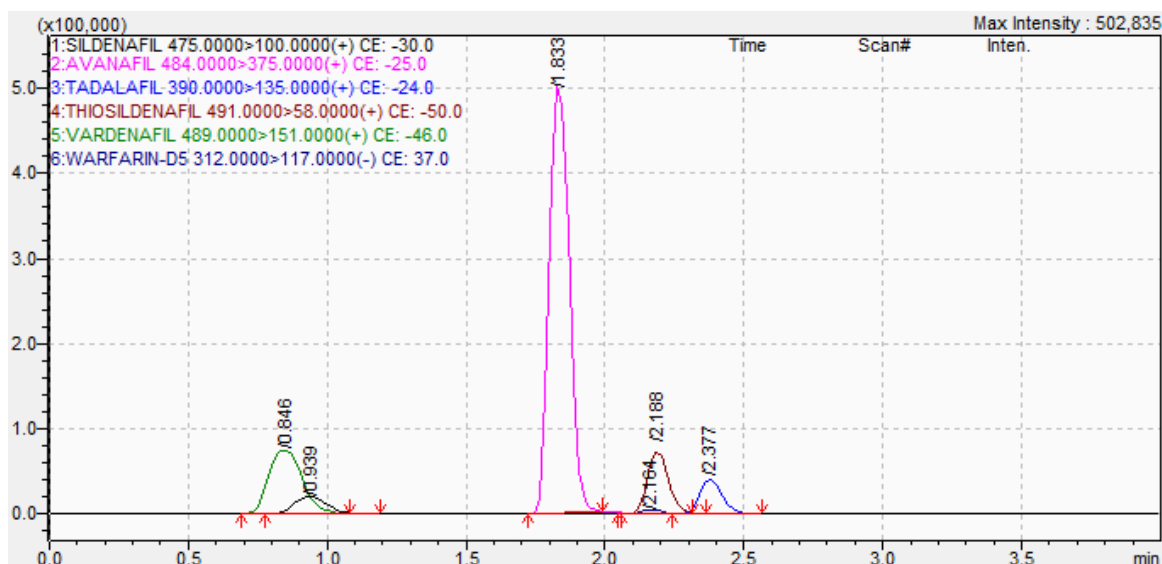
Tiến hành khảo sát chương trình pha động của phương pháp sử dụng dung dịch chuẩn hỗn hợp sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil, thiosildenafil và warfarin- d_5 cùng nồng độ 100 ng/mL.

Pha động: A: acid formic 0,1 % trong nước deion, B: acid formic 0,1 % trong methanol. Chạy chương trình gradient. Kết quả khảo sát pha động được trình bày dưới Bảng 2. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp 5 chất phân tích và nội chuẩn được trình bày trong Hình 2.

Bảng 2. Chương trình gradient pha động

Thời gian (phút)	Tốc độ dòng (ml/phút)	A (%)	B (%)
0,01 - 1,00	0,4	40	60
1,01 - 2,50	0,4	27	73
2,51 - 4,00	0,4	40	60

Nhận xét: Từ kết quả khảo sát chương trình pha động trong Bảng 2, nhận thấy với chương trình gradient trên cho kết quả pic các chất nghiên cứu và nội chuẩn cân đối, thời gian lưu ổn định. Một số chất phân tích có thời gian lưu gần nhau, nhưng khi phân tích trên detector khối phổ có thể lựa chọn mảnh m/z theo chất nghiên cứu nên không bị ảnh hưởng nhiều.



Hình 2. Sắc ký đồ chuẩn hỗn hợp 5 chất phân tích và nội chuẩn warfarin- d_5

3.3. Khảo sát dung môi chiết

Khảo sát 03 dung môi chiết lỏng lỏng bao gồm: ethylacetat, diethylete, chloroform tại 03 mức nồng độ 10 ng/mL, 50 ng/mL và 150 ng/mL. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình tại mục 2.2.2. Kết quả khảo sát dung môi chiết được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Khảo sát dung môi chiết mẫu

STT	Chất phân tích	Hàm lượng thí nghiệm (ng/mL)	Độ thu hồi (%)		
			Ethyl acetat	Chloroform	Diethyl etc
1	Sildenafil	10	49,61	83,05	66,67
		50	52,06	89,47	71,25
		150	66,21	92,02	78,15
2	Avanafil	10	51,85	82,61	68,12
		50	59,50	86,23	74,14
		150	71,74	93,70	80,68
3	Tadalafil	10	45,34	80,84	62,33
		50	53,20	87,31	75,87
		150	67,96	91,22	87,43
4	Thiosildenafil	10	50,84	86,27	72,43
		50	66,28	90,49	80,27
		150	74,25	95,71	83,25
5	Vardenafil	10	64,62	84,50	71,67
		50	68,83	87,56	76,28
		150	77,64	95,56	87,41

Nhận xét: Từ kết quả Bảng 3 cho thấy, dung môi Chloroform cho lượng chất thu hồi sau chiết lớn nhất. Do vậy, nhóm nghiên cứu lựa chọn Chloroform làm dung môi chiết mẫu.

3.4. Thẩm định phương pháp

3.4.1. Độ thích hợp hệ thống LC-MS/MS

Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn hỗn hợp 5 chất phân tích ở 03 mức nồng độ 5 ng/mL; 100 ng/mL và 200 ng/mL cho mỗi chất và nồng độ nội chuẩn ở mỗi mức đều là 50 ng/mL. Phân tích lặp lại 6 lần đối với mỗi mức nồng độ. Giá trị của độ lệch chuẩn tương đối (RSD) được thống kê thông qua tỷ lệ thời gian lưu tương đối và tỷ lệ diện tích pic của 5 chất phân tích với nội chuẩn warfarin-d₅. Kết quả thí nghiệm khảo sát Độ thích hợp hệ thống được trình bày trong Bảng 4.

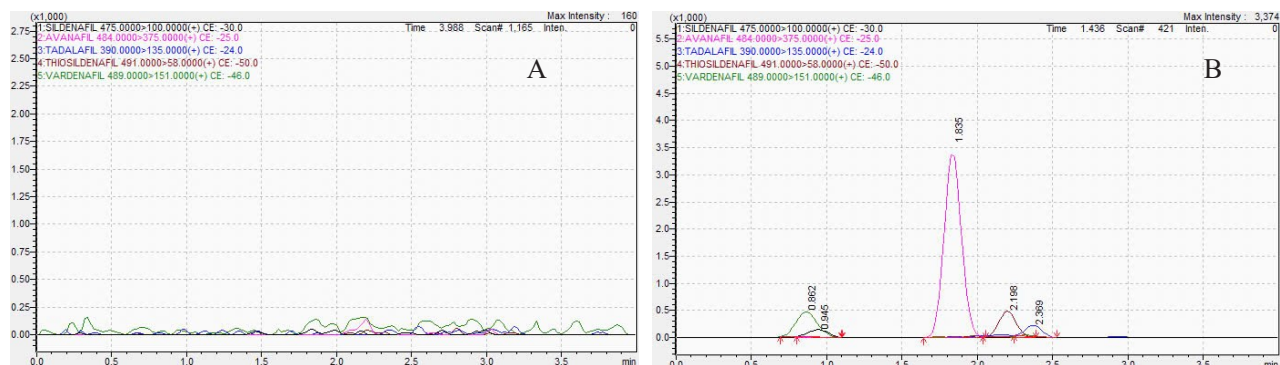
Bảng 4. Kết quả độ thích hợp hệ thống

STT	Chất phân tích	Độ thích hợp hệ thống LC-MS/MS					
		Tỷ lệ thời gian lưu (% RSD)			Tỷ lệ diện tích pic (% RSD)		
		5,0 (ng/mL)	100,0 (ng/mL)	200,0 (ng/mL)	5,0 (ng/mL)	100,0 (ng/mL)	200,0 (ng/mL)
1	Sildenafil	0,421	0,774	0,449	3,419	1,841	1,416
2	Avanafil	0,142	0,047	0,121	3,032	1,768	2,242
3	Tadalafil	0,222	0,065	0,128	2,144	1,266	2,340
4	Thiosildenafil	0,263	0,053	0,122	3,202	1,388	1,660
5	Vardenafil	0,387	0,257	0,298	2,581	2,287	1,230

Nhận xét: Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của tỷ lệ thời gian lưu trên nội chuẩn và tỷ lệ diện tích pic chất phân tích trên nội chuẩn có giá trị dưới 5,0 %. Vì vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ thích hợp hệ thống.

3.4.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành nghiên cứu trên 6 mẫu máu blank và 6 mẫu máu blank thêm chuẩn 5 chất phân tích ở nồng độ 1,0 ng/mL. Đánh giá sự xuất hiện tín hiệu các pic trên sắc ký đồ của 6 mẫu blank và 6 mẫu thêm chuẩn. Kết quả được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu máu blank (A), Sắc ký đồ mẫu máu blank thêm chuẩn ở nồng độ 1 ng/mL (B)

Nhận xét: Kết quả khảo sát độ đặc hiệu cho thấy. Trên sắc ký đồ của mẫu máu blank không thấy xuất hiện pic so với sắc ký đồ mẫu máu blank thêm chuẩn tại thời gian lưu chất phân tích. Vì vậy, phương pháp phân tích đặc hiệu với các chất nghiên cứu.

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

Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 1,0 ng/mL sau đó đem phân tích theo điều kiện đã chọn để xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của chất phân tích. Kết quả LOD và LOQ được trình bày trong Bảng 5.

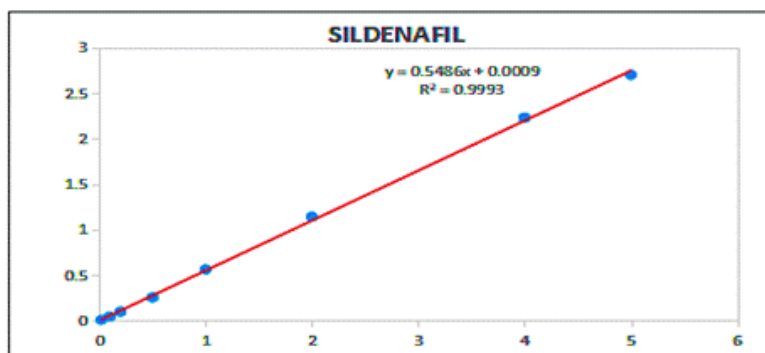
3.4.4. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính được khảo sát trên các mẫu máu blank thêm chuẩn hỗn hợp 5 chất phân tích ở 08 nồng độ gồm 1; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 250 ng/mL. Nồng độ của nội chuẩn trong các mẫu thêm chuẩn đều là 50 ng/mL. Tại mỗi nồng độ, thí nghiệm lặp lại 06 lần và lấy giá trị trung bình. Đường chuẩn được xây dựng thông qua mối quan hệ tuyến tính giữa tỷ lệ lượng chất phân tích và tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích so với nội chuẩn. Trong đó: Y là tỷ lệ diện tích pic chất phân tích/IS. X là tỷ lệ nồng độ chất phân tích/IS. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính được trình bày trong Bảng 5 và Hình 4 đại diện cho Đồ thị biểu diễn khoảng tuyến tính của Sildenafil.

Bảng 5. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

STT	Chất phân tích	Phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số tương quan (R^2)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
1	Sildenafil	$Y = 0,5486X + 0,0009, R^2 = 0,9993$	0,03	0,10
2	Avanafil	$Y = 8,5329X + 0,0274, R^2 = 0,9989$	0,02	0,07
3	Tadalafil	$Y = 0,7615X + 0,0025, R^2 = 0,9989$	0,03	0,10
4	Thiosildenafil	$Y = 1,4456X - 0,0019, R^2 = 0,9993$	0,03	0,10
5	Vardenafil	$Y = 2,0116X + 0,0063, R^2 = 0,9990$	0,02	0,07

Nhận xét: Đường chuẩn xây dựng được giữa tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích so với nội chuẩn và tỷ lệ lượng chất tương ứng có hệ số tương quan $R^2 > 0,995$.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn khoảng tuyến tính của Sildenafil.

3.4.5. Độ đúng, độ lặp lại của quy trình phân tích mẫu

Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp được đánh giá trên các mẫu máu blank thêm chuẩn hỗn hợp 5 chất phân tích ở 03 nồng độ khác nhau là 10 ng/mL; 50 ng/mL và 200 ng/mL, nồng độ nội chuẩn warfarin-d₅ tại mỗi mức đều là 50,0 ng/mL. Mỗi nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Mỗi mức nồng độ thêm chuẩn tiến hành thí nghiệm 06 lần lặp lại. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

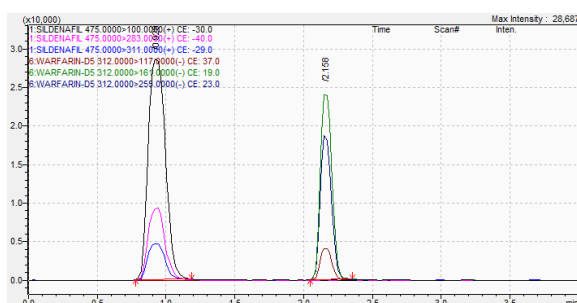
Bảng 6. Kết quả khảo sát độ thu hồi và độ lặp lại của quy trình

STT	Chất phân tích	Độ thu hồi (%)			RSD (%)		
		10 (ng/mL)	50 (ng/mL)	200 (ng/mL)	10 (ng/mL)	50 (ng/mL)	200 (ng/mL)
1	Sildenafil	85,96	92,06	95,71	6,675	3,381	2,874
2	Avanafil	86,17	91,78	94,12	4,684	2,935	1,529
3	Tadalafil	87,02	88,84	96,93	7,653	2,366	1,696
4	Thiosildenafil	87,77	93,10	95,13	5,828	2,511	1,279
5	Vardenafil	86,30	92,00	97,08	8,428	3,252	2,009

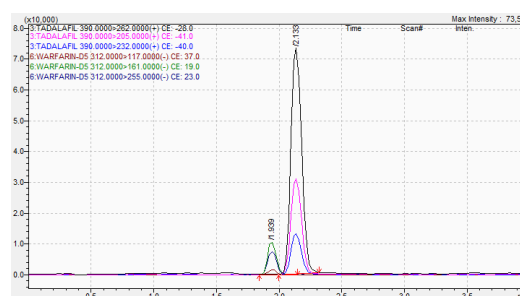
Nhận xét: Kết quả cho thấy độ đúng nằm trong khoảng 85,96 đến 97,08 % với độ lệch chuẩn tương đối từ 1,279 đến 8,428 %. Do vậy, phương pháp xây dựng đạt yêu cầu về độ đúng và độ lặp lại.

3.5. Kết quả phân tích mẫu thực tế

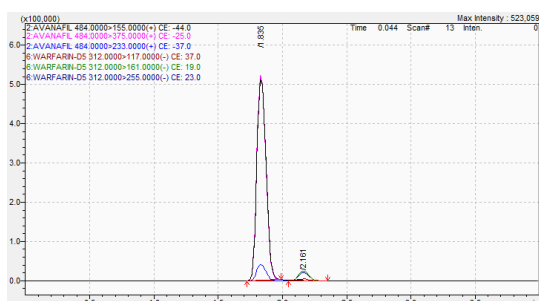
Áp dụng phương pháp đã nghiên cứu vào phân tích định tính và định lượng 24 mẫu máu của 24 người chết trong khách sạn có sử dụng thuốc trước khi quan hệ tình dục, mẫu được thu giữ và gửi từ các cơ quan cảnh sát điều tra tại Việt Nam. Phát hiện 7 mẫu dương tính với sildenafil nồng độ từ 82,14-210,32 ng/mL. 4 mẫu dương tính tadalafil với nồng độ từ 74,64-180,51 ng/mL, 6 mẫu dương tính với vardenafil nồng độ từ 17,25-28,84 ng/mL. 4 mẫu dương tính với avanafil nồng độ từ 64,82-327,24 ng/mL và 3 mẫu dương tính với thiosildenafil nồng độ từ 30,41-148,05 ng/mL. Sắc ký đồ đại diện cho mẫu dương tính được trình bày trong Hình 5, 6, 7, 8, 9.



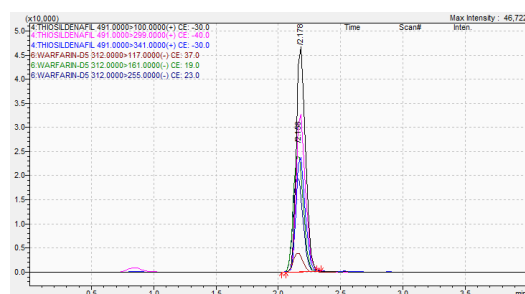
Hình 5. Sắc ký đồ mẫu máu thực tế dương tính với Sildenafil.



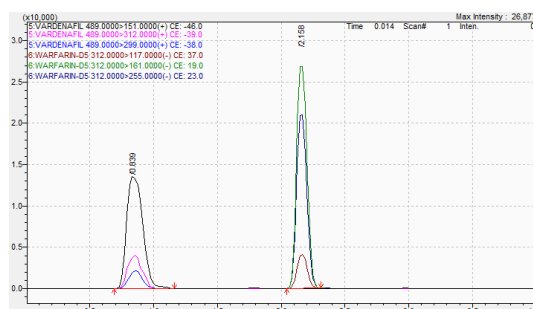
Hình 6. Sắc ký đồ mẫu máu thực tế dương tính với Tadalafil.



Hình 7. Sắc ký đồ mẫu máu dương tính với Avanafil.



Hình 8. Sắc ký đồ mẫu máu dương tính với Thiosildenafil.



Hình 9. Sắc ký đồ mẫu máu dương tính với Vardenafil.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng phương pháp phân tích đồng thời 5 chất ức chế enzym Phosphodiester type 5 (PDE-5) là sildenafil, tadalafil, vardenafil, avanafil và thiosildenafil. Nghiên cứu sử dụng thiết bị phân tích là LC-MS/MS kết hợp với kỹ thuật chiết lỏng-lỏng để xử lý mẫu. Phương pháp phân tích xây dựng đã khảo sát đầy đủ các chỉ tiêu, như độ ổn thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng

(LOQ), độ thu hồi và độ lặp lại, có sử dụng chất nội chuẩn warfarin-d₅.

Ứng dụng phương pháp đã xây dựng phân tích các chất trong 24 mẫu máu người chết trong nhà nghỉ, khách sạn được cung cấp bởi cơ quan điều tra tại Việt Nam. Phương pháp trên có thể áp dụng để xác định các hoạt chất cương dương được trộn trái phép trong một số thuốc, sản phẩm bảo vệ sức khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen My Thi Diem (2024), Child sexual abuse in Vietnam: A review of prevalence, risk factors, and prevention strategies, *Multidisciplinary Reviews*, 7(11), pp. 2024269-2024269.
2. Bộ Y tế (2024), *Thông tư số 42/TT-BYT ngày 02/12/2024 của Bộ Y tế về quy trình giám định pháp y*.
3. Lee E. S., Lee J. H., et al. (2013), Simultaneous determination of 38 phosphodiesterase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, pp. 171-178.
4. Xiao C., Tang M., et al. (2013), Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction–back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography–ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 931, pp. 111-116.
5. De Souza Madeira C. R., Fachi M. M., et al. (2021), A validated LC-MS/MS assay for the quantification of phosphodiesterase-5 inhibitors in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 1179, pp. 122829.
6. FDA US (2018), Bioanalytical method validation, *Guidance for industry*. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.