Nghiên cứu định lượng hỗn hợp 3 thành phần paracetamol, ibuprofen và caffeine trong chế phẩm viên nang bằng quang phổ tử ngoại tỷ đối

Nguyễn Đức Thiện[1*], Nguyễn Ngọc Ánh[2]

[1]Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam
[2]Lớp M1 K74, Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 11/10/2022; ngày gửi phản biện 14/10/2022; ngày nhận phản biện 10/11/2022; ngày chấp nhận đăng 15/11/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu sử dụng quang phổ tử ngoại tỷ đối để xác định nồng độ các chất trong hỗn hợp 3 thành phần chứa paracetamol (PA), ibuprofen (IBU) và caffeine (CA) mà không cần xử lý hóa học. Dung môi sử dụng trong phân tích là hỗn hợp ethanol và nước, đảm bảo thân thiện môi trường và an toàn cho người sử dụng. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối là dựa vào hiệu số giữa biên độ đỉnh của phổ tử ngoại tỷ đối ở 2 bước sóng để xây dựng phương trình hồi quy, thông số phân tích. Hai bước sóng được chọn trong phổ tử ngoại tỷ đối với PA, IBU, CA lần lượt là 246 và 275 nm, 218 và 245 nm, 244 và 278 nm. Khoảng nồng độ xét tuyến tính với PA và IBU là 4-40 µg/ml, với CA là 0,8-8 µg/ml; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của PA, IBU, CA lần lượt là 0,78, 1,18, 0,38 µg/ml và 2,37, 3,59, 1,17 µg/ml. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối đã xác định thành công nồng độ 3 chất trong hỗn hợp thuốc trong phòng thí nghiệm và thuốc thương mại.

Từ khóa: **caffeine, định lượng, ibuprofen, paracetamol, quang phổ tử ngoại tỷ đối, 3 thành phần.**

Chỉ số phân loại: **3.4**

1. Đặt vấn đề

PA là một loại thuốc không steroid (Non-steroidal anti-inflammatory drug -NSAID), được coi là một trong những thuốc giảm đau được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới, mặc dù PA cực kỳ độc với gan. IBU là thuốc NSAID dùng đường uống có đặc tính giảm đau, hạ sốt và được sử dụng rộng rãi trong điều trị viêm khớp. CA là một trong những loại thuốc giảm đau bổ trợ phổ biến nhất, hoạt động bằng cách ngăn chặn tác dụng của adenosine, là chất dẫn truyền thần kinh giúp thư giãn não bộ và chống sự mệt mỏi cơ thể. Sự hấp thụ PA tăng lên khi kết hợp với CA, giúp tăng tác dụng giảm đau [1], trong khi đó tác dụng chống viêm của IBU được tăng gấp đôi khi dùng bằng liều có kết hợp với CA [2]. Việc sử dụng PA và IBU trong một công thức khi kết hợp với thuốc NSAID mang lại hiệu quả giảm đau vượt trội hơn so với từng loại thuốc riêng lẻ [3].

Có nhiều nghiên cứu đưa ra các phương pháp xác định đồng thời PA và CA, PA và IBU, IBU và CA. Tuy nhiên, để xác định đồng thời PA, IBU và CA chỉ có một số phương pháp như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [1], quang phổ tử ngoại tỷ đối và đạo hàm [4-6], điện hóa [7]. Phương pháp HPLC có độ tin cậy, độ bền, độ chọn lọc cao và thường được sử dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, kỹ thuật này tạo ra một lượng lớn chất thải (chủ yếu là dung môi hữu cơ), thời gian phân tích dài và đầu tư kinh tế cao cho việc bảo trì. Các đặc điểm hóa lý của IBU (logP và độ hòa tan) khác PA và CA dẫn đến khó có một quy trình duy nhất để xác định đồng thời bằng HPLC. Mặt khác, giá trị pKa của CA cản trở việc phân tích nó bằng điện hóa. Vì vậy, sử dụng phương pháp định lượng bằng quang phổ tử ngoại tỷ đối để xác định 3 thành phần PA, IBU và CA trong hỗn hợp mà không cần bất cứ sự chiết tách nào được lựa chọn. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối chỉ sử dụng một bước là chia phổ hỗn hợp 3 thành phần cho một thừa số (phổ dung dịch chất chuẩn có 2 thành phần), tiếp theo là xác định khoảng cách từ đỉnh đến đáy trong phổ tử ngoại tỷ đối và thực hiện các tính toán để xác định nồng độ chất. Phương pháp này không sử dụng bước đạo hàm và không tìm kiếm các điểm giao nhau hoặc bất kỳ xử lý toán học, hóa học phức tạp nào đối với tập dữ liệu. Phương pháp được thẩm định và áp dụng thử nghiệm để định lượng 3 chất PA, IBU và CA trong viên nang thương mại trên thị trường.

2. Cơ sở lý thuyết

Xét một hỗn hợp gồm 3 thành phần X, Y và Z không có tương tác hóa học. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo là A_m, với chiều dày cốc đo được xác định bởi phương trình sau:

$$A_m = \varepsilon_X C_X + \varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z \quad (1)$$

trong đó ε_X và C_X, ε_Y và C_Y, ε_Z và C_Z lần lượt là hệ số hấp thụ và nồng độ của các thành phần X, Y và Z.

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp đo quang phổ tử ngoại tỷ đối là hiệu số giữa biên độ đỉnh của phổ tử ngoại tỷ đối (ở 2 bước sóng khác nhau) của một hỗn hợp chất là tỷ lệ với một trong các chất trong hỗn hợp. Điều này cho phép xác định một trong các chất trong hỗn hợp mà không có sự ảnh hưởng từ các thành phần và tá dược khác. Độ hấp thụ của hỗn hợp 3 thành phần ở phương trình (1) được chia cho độ hấp thụ của hỗn hợp 2 thành phần ở phương trình (2) (với nồng độ đã biết $C_{Y'}$ và $C_{Z'}$) để ra phương trình (3).

$$A_{Y'Z'} = \varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'} \quad (2)$$

[*]Tác giả liên hệ: Email: thiennd@hup.edu.vn

Quantitative study ternary mixture of paracetamol, ibuprofen and caffeine in solid pharmaceutical dosage forms by ratio ultraviolet spectroscopy

Duc Thien Nguyen[1*], Ngoc Anh Nguyen[2]

[1]*Faculty of Basic Science, Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam*

[2]*Class M1 K74, Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam*

Received 11 October 2022; revised 10 November 2022; accepted 15 November 2022

Abstract:

This paper aims to apply ratio ultraviolet spectroscopy to determine the concentration of substances in a ternary mixture containing paracetamol (PA), ibuprofen (IBU), and caffeine (CA) without chemical treatment, the solvent used in the analysis is a mixture of ethanol with water friendly to environment and safety for users. The ratio ultraviolet spectroscopy method is based on the difference between the peak amplitude of the proportional spectrum at two wavelengths to build regression equations and analytical parameters. The two wavelengths selected in the ratio spectrum for PA, IBU, CA are 246 and 275 nm, 218 and 245 nm, 244 and 278 nm, respectively. The linear range for PA and IBU is 4-40 µg/ml, and for CA, it is 0.8-8 µg/ml; limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of PA, IBU, CA were 0.78, 1.18, 0.38 µg/ml and 2.37, 3.59, 1.17 µg/ml, respectively. The ratio ultraviolet spectroscopy method has successfully determined the concentrations of three substances in a mixture of laboratory and commercial drugs.

Keywords: **caffeine, ibuprofen, paracetamol, quantitative, ratio ultraviolet spectroscopy, ternary mixtures.**

Classification number: **3.4**

$$\frac{A_m}{A_{Y'Z'}} = \frac{\varepsilon_X C_X}{\varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'}} + \frac{\varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z}{\varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'}} \quad (3)$$

Trong phương trình (3), với một giá trị λ thì tỷ lệ $(\varepsilon_Y C_Y + \varepsilon_Z C_Z)$ với $(\varepsilon_{Y'} C_{Y'} + \varepsilon_{Z'} C_{Z'})$ là một hằng số K, điều này đúng khi xét ở một vùng hoặc một điểm của bước sóng. Do vậy, phương trình (3) có thể viết:

$$\frac{A_m}{A_{Y'Z'}} = \frac{A_X}{A_{Y'Z'}} + K \rightarrow W_m = W_p + K \quad (4)$$

trong đó $W_m = A_m/A_{Y'Z'}$ và $W_p = A_X/A_{Y'Z'}$

Khi lấy hiệu biên độ (ΔW) ở 2 bước sóng (λ_1 và λ_2) của phổ tử ngoại tỷ đối sẽ loại bỏ được hằng số K như phương trình (5).

$$\Delta W = W_{m1} - W_{m2} = (W_{p1} + K) - (W_{p2} + K) = W_{p1} - W_{p2} \quad (5)$$

Ở đây, W_{m1} và W_{m2} lần lượt là biên độ đỉnh của phổ tử ngoại tỷ đối tại 2 bước sóng khác nhau λ_1 và λ_2. Phương trình (5) cho thấy sự hấp thụ của 2 thành phần Y và Z bị loại bỏ hoàn toàn và sự khác biệt về biên độ đỉnh chỉ đại diện cho thành phần X. Tiếp theo, đường chuẩn được xây dựng bằng cách lấy biến thiên biên độ của các phổ với nồng độ X khác nhau. Tương tự, 2 thành phần Y và Z có thể được xác định như trên nhưng ở cặp 2 bước sóng khác.

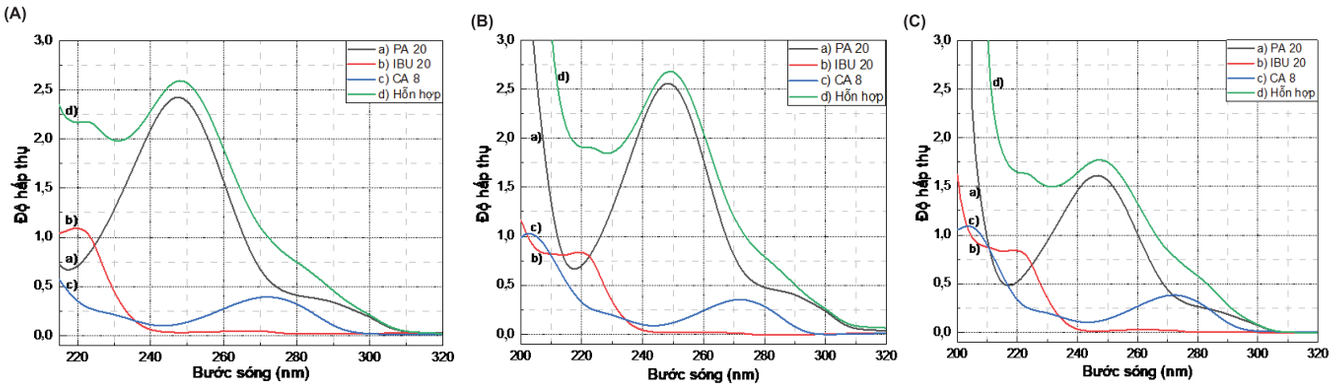
3. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Các chất chuẩn PA (98%), IBU (98%) và CA (98,5%) có nguồn gốc từ Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương. Methanol, ethanol và các dung môi khác đạt tiêu chuẩn phân tích. Dung môi sau khi được tối ưu hóa được chọn và sử dụng là hỗn hợp ethanol với nước cất (tỷ lệ 1:1).

Chế phẩm thương mại là viên nang Ibuparavic (Công ty TNHH sản xuất thương mại dược phẩm Thành Nam, số lô 110222) chứa đồng thời PA, IBU, CA với tỷ lệ 300:200:20 mg.

Các dung dịch gốc sơ cấp PA, IBU và CA có nồng độ 1 mg/ml được pha bằng dung môi lựa chọn. 3 dung dịch thứ cấp PA 80 µg/ml, IBU 80 µg/ml và CA 40 µg/ml được pha loãng từ các dung dịch gốc sơ cấp ở trên. Pha loãng tiếp các dung dịch gốc thứ cấp để được dãy chuẩn PA, IBU và CA. Đối với hỗn hợp 2 và 3 thành phần thì các dung dịch được pha loãng từ các dung dịch gốc thứ cấp của PA, IBU và CA với dung môi để có được các khoảng nồng độ quy định. Phổ hấp thụ tử ngoại của các dung dịch chuẩn đã pha được đo trong khoảng 200-400 nm với mẫu trắng là dung môi lựa chọn.

Để xác định PA, tiến hành đo phổ hấp thụ tử ngoại của các dung dịch chuẩn PA theo bước sóng và ghi lại. Tiếp đến lấy các phổ tử ngoại của dung dịch chuẩn PA đó chia cho phổ tử ngoại của dung dịch hỗn hợp 2 thành phần IBU (20 µg/ml) với CA (2 µg/ml) ta được các phổ tử ngoại tỷ đối. Xác định các biên độ đỉnh đến đáy trong phổ tử ngoại tỷ đối PA thu được ở giữa 246 và 275 nm và vẽ đồ thị phổ tử ngoại tỷ đối với nồng độ tương ứng. Tương tự, tiến hành đo phổ hấp thụ tử ngoại của dãy dung dịch chuẩn IBU, sau đó



Hình 1. Phổ hấp thụ của dung dịch CA (8 µg/ml) (a), IBU (20 µg/ml) (b), PA (20 µg/ml) (c), hỗn hợp 3 thành phần (PA 20 µg/ml, IBU 20 µg/ml, CA 8 µg/ml) (d) trong dung môi methanol (A), ethanol (B) và hỗn hợp ethanol với nước cất (tỷ lệ 1:1) (C).

chia cho phổ của dung dịch hỗn hợp 2 thành phần PA (30 µg/ml) với CA (2 µg/ml) để được các phổ tử ngoại tỷ đối, giá trị hiệu biên độ thu được giữa 2 bước sóng 218 và 247 nm sẽ được dùng để xây dựng đồ thị với các nồng độ tương ứng. Tương tự, phổ của dung dịch hỗn hợp PA (30 µg/ml) và IBU (20 µg/ml) được sử dụng làm số chia trong phổ tử ngoại tỷ đối của các dung dịch chuẩn CA để xác định nồng độ CA, các giá trị đo biên độ trong khoảng 244 và 278 nm được ghi lại và vẽ đồ thị phổ tử ngoại tỷ đối với nồng độ tương ứng.

Để định lượng hoạt chất trong các viên nang thương mại, tiến hành nghiền mịn 10 viên và cân lượng bột nghiền tương đương với 300 mg PA, 200 mg IBU và 20 mg CA, cho tương ứng vào 3 bình định mức 100 ml, cho dung môi, lắc, siêu âm khoảng 5 phút và thêm dung môi cho vừa đủ 100 ml. Tiến hành lọc loại bỏ 20-30 ml dịch lọc đầu. Tiếp đến mỗi bình lấy 10 ml dịch lọc, cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi vừa đủ và lắc đều, khi đó ta được dung dịch chứa PA 300 µg/ml, IBU 200 µg/ml và CA 20 µg/ml. Cuối cùng, pha loãng tiếp 10 lần để được dung dịch PA 30 µg/ml, IBU 20 µg/ml và CA 2 µg/ml.

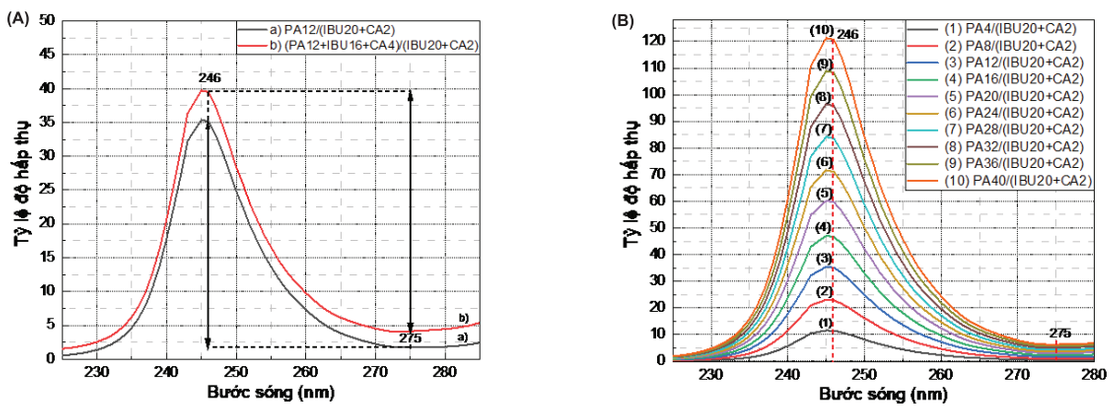
Toàn bộ phép đo quang phổ tử ngoại được thực hiện bằng máy quang phổ Hitachi model U1900 UV-Vis (Nhật Bản) và kết nối với máy vi tính (hệ điều hành Windows) với phần mềm chuyên dụng Solution 2.2. Chế độ bước sóng bắt đầu 200 nm, kết thúc 400 nm, kiểu dữ liệu: độ hấp thụ A, độ rộng 4,0 nm, tốc độ quét 100 nm/phút, cuvet thạch anh 1 cm. Tiến hành lọc nhiễu sơ bộ bằng bộ lọc Savitzky - Galay (đa thức bậc 3, số điểm 15).

4. Kết quả

4.1. Đặc điểm quang phổ và lựa chọn dung môi

Khảo sát sơ bộ phổ hấp thụ tử ngoại của PA, IBU, CA trong dung môi lựa chọn nên các dung dịch được khảo sát trong khoảng bước sóng UV. Phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn PA 20 µg/ml, IBU 20 µg/ml, CA 8 µg/ml và dung dịch hỗn hợp 3 thành phần (PA 20 µg/ml, IBU 20 µg/ml và CA 8 µg/ml) từ 200 đến 320 nm như ở hình 1. Với 3 dung môi là methanol, ethanol và hỗn hợp ethanol với nước (tỷ lệ 1:1) thì cả PA, IBU và CA đều tan tốt, phổ hấp thụ của PA, IBU và CA trong hỗn hợp ở 3 dung môi này đều có tính cộng độ hấp thụ ở hình 1. Do đó, đảm bảo phân tích xanh, thân thiện với môi trường, an toàn nên hỗn hợp ethanol với nước (tỷ lệ 1:1) được chọn làm dung môi để hòa tan và pha loãng.

Phổ tử ngoại tỷ đối của phổ PA tinh khiết và phổ hỗn hợp 3 thành phần (cùng lượng PA) với số chia là phổ hỗn hợp 2 thành phần (IBU, CA) như hình 2A. Hình 2A cho thấy, biên độ đỉnh



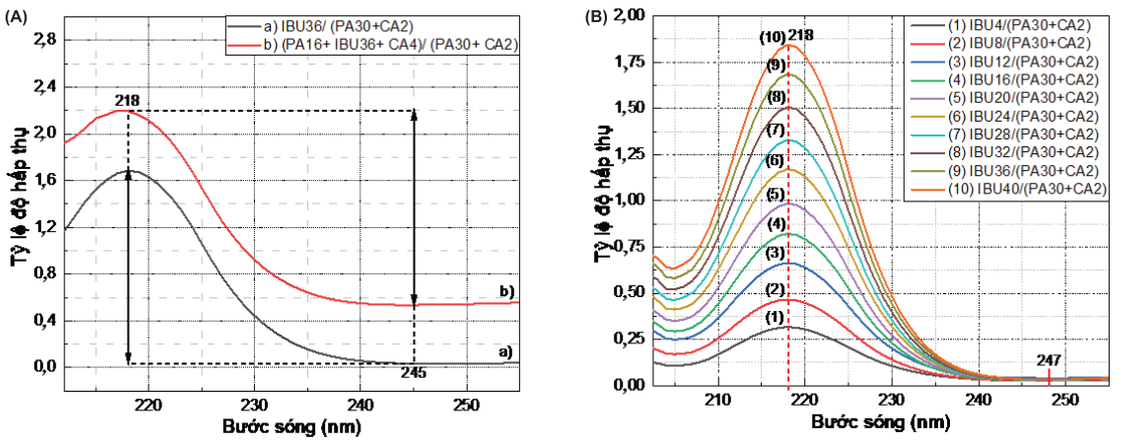
Hình 2. Phổ tử ngoại tỷ đối của PA 12 µg/ml và hỗn hợp 3 thành phần (PA 12 µg/ml, IBU 16 µg/ml, CA 4 µg/ml) với số chia là hỗn hợp 2 thành phần (IBU 20 µg/ml, CA 2 µg/ml) (A); dãy chuẩn PA với số chia là hỗn hợp (IBU 20 µg/ml, CA 2 µg/ml) (B).

Bảng 1. Các thông số hồi quy và phân tích để xác định sự kết hợp 2 thuốc bằng phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối.

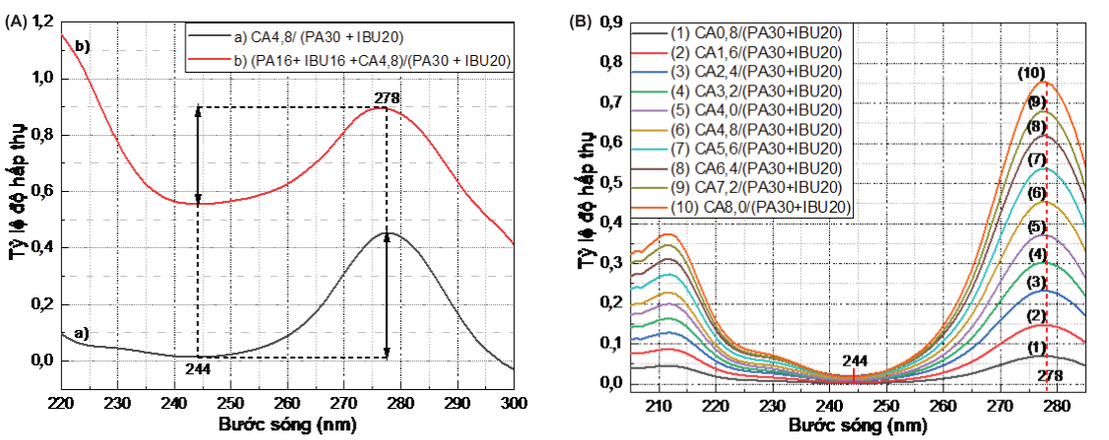
Thông số	Dược chất		
	PA	*IBU*	*CA*
Hai bước sóng lựa chọn (nm)	246 và 275	218 và 245	244 và 278
Khoảng nồng độ khảo sát (µg/ml)	4-40	4-40	0,8-8
Hệ số chặn (a)	-0,8217	0,1108	-0,0057
Độ lệch chuẩn hệ số chặn (SD_a)	0,6800	0,0153	0,0109
Độ dốc (b)	2,8576	0,0426	0,0932
Độ lệch chuẩn độ dốc (SD_b)	0,0274	0,0006	0,0022
Độ lệch chuẩn tương đối độ dốc (RSD_b, %)	0,9588	1,4486	2,3537
Hệ số hồi quy (r)	0,9999	0,9998	0,9998
LOD (µg/ml)	0,78	1,18	0,38
LOQ (µg/ml)	2,37	3,59	1,17

đến đáy ở giữa 2 bước sóng 246 và 275 nm trên phổ tử ngoại tỷ đối đo được trong phổ hỗn hợp 3 thành phần bằng với phổ PA. Nghĩa là có thể định lượng được PA trong hỗn hợp 3 thành phần dựa vào phổ PA vì không có sự ảnh hưởng của IBU và CA trong hỗn hợp khi xét phổ tử ngoại tỷ đối, điều này cũng được lý thuyết trên chứng minh. Vì vậy, đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn PA có nồng độ 4-40 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 4 µg/ml) với mẫu trắng là hỗn hợp ethanol với nước. Sau đó vẽ và chồng phổ hấp thụ tử ngoại tỷ đối của PA (nồng độ 4-40 µg/ml) với số chia là phổ hấp thụ của hỗn hợp IBU, CA (nồng độ 20 µg/ml, 2 µg/ml) (hình 2B). Xây dựng đường chuẩn giữa hiệu biên độ tại 2 bước sóng 246 và 275 nm với nồng độ PA. Đường chuẩn này được xây dựng dựa vào 10 điểm chuẩn và có các thông số hồi quy như ở bảng 1. Từ phương trình chuẩn độ này ta có thể xác định được nồng độ PA trong hỗn hợp mà không cần biết nồng độ IBU và CA.

Tương tự, hình 3A cho thấy giá trị biên độ hấp thụ tử ngoại tỷ đối từ đỉnh tới đáy (tại 218 và 245 nm) là bằng nhau của phổ tử ngoại tỷ đối IBU (36 µg/ml), phổ tử ngoại tỷ đối hỗn hợp 3 thành phần (PA 16 µg/ml, IBU 36 µg/ml, CA 2 µg/ml) với số chia là phổ hỗn hợp 2 thành phần (PA 30 µg/ml, CA 2 µg/ml). Nghĩa là, ta có thể định lượng IBU trong hỗn hợp 3 thành phần dựa vào phổ IBU vì không có sự ảnh hưởng của PA và CA trong hỗn hợp khi xét phổ tử ngoại tỷ đối. Đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn IBU có nồng độ 4-40 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 4 µg/ml). Vẽ và chồng phổ hấp thụ tỷ đối của dãy dung dịch IBU này với số chia là phổ hấp thụ của hỗn hợp PA và CA (nồng độ 30 và 2 µg/ml) (hình 3B).



Hình 3. Phổ tử ngoại tỷ đối của IBU 36 µg/ml và hỗn hợp 3 thành phần (PA 16 µg/ml, IBU 36 µg/ml, CA 4 µg/ml) với số chia là hỗn hợp 2 thành phần (PA 30 µg/ml, CA 2 µg/ml) (A); dãy chuẩn IBU với số chia là hỗn hợp (PA 30 µg/ml, CA 2 µg/ml) (B).



Hình 4. Phổ tử ngoại tỷ đối của CA 4,8 µg/ml và hỗn hợp 3 thành phần (PA 16 µg/ml, IBU 16 µg/ml, CA 4,8 µg/ml) với số chia là hỗn hợp 2 thành phần (PA30 µg/ml, IBU 20 µg/ml) (A); dãy chuẩn CA với số chia là hỗn hợp (PA 30 µg/ml, IBU 20 µg/ml) (B).

Xây dựng phương trình đường chuẩn với các thông số hồi quy như ở bảng 1 của hiệu biên độ hấp thụ tỷ đối tại 2 bước sóng 218 và 245 nm với nồng độ IBU.

Tương tự ở hình 4A, 2 bước sóng được chọn là 244 và 278 nm để khảo sát biên độ từ đỉnh đến đáy của độ hấp thụ tỷ đối. Phổ hấp thụ tỷ đối của dãy dung dịch chuẩn CA có nồng độ 0,8-8,0 µg/ml (mỗi dung dịch cách nhau 0,8 µg/ml) với số chia là phổ hấp thụ của hỗn hợp PA và IBU (nồng độ 30 và 20 µg/ml) (hình 4B). Phương trình đường chuẩn ở đây cũng dựa vào 10 điểm chuẩn và có các thông số hồi quy như ở bảng 1. Dựa vào đường chuẩn của hiệu độ hấp thụ tỷ đối tại 2 bước sóng trên và nồng độ CA, ta có thể xác định nồng độ của CA trong hỗn hợp 3 thành phần.

4.2. Thẩm định phương pháp

Khoảng tuyến tính và phạm vi: Khoảng tuyến tính của đường chuẩn trong phương pháp dựa vào 10 giá trị nồng độ liên tiếp cách nhau 4 µg/ml mỗi chất PA, IBU và cách nhau 0,2 µg/ml với CA. Thông số, phương trình hồi quy và phân tích tương ứng mỗi chất ở bảng 1 được xác định dựa vào bộ số liệu phổ tử ngoại tỷ *đối* của các chất. Với số bị chia là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn gốc PA, IBU, CA và số chia là các dung dịch 2 thành phần cho các giá trị độ hấp thụ tỷ đối vẽ dưới dạng hàm của nồng độ tương ứng và phương trình hiệu chuẩn xác định bằng phương pháp hồi quy bình phương nhỏ nhất.

Giới hạn phát hiện và định lượng: Ở đây, LOD và LOQ được tính toán theo hướng dẫn của International Council for Harmonisation (ICH) [8]. LOD được định tính là $3,3xSD_a/b$ và LOQ được tính là $10xSD_a/b$, trong đó SD_a là độ lệch chuẩn của điểm chặn và b là độ dốc của đường chuẩn. Độ nhạy của phương pháp định lượng hỗn hợp PA, IBU, CA dựa vào quang phổ tử ngoại tỷ đối được xác nhận bằng giá trị LOD và LOQ có giá trị thu được ở bảng 1.

Độ chính xác (độ đúng và độ chụm): Theo hướng dẫn của ICH [8], độ lặp lại trong ngày của phương pháp đề xuất được đánh giá thông qua phân tích 3 mức nồng độ được đo tại 3 thời điểm khác nhau trong cùng một ngày. Tương ứng, độ chính xác giữa các ngày được xác định ở cùng nồng độ trong 3 ngày liên tiếp, kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Độ chính xác và độ chụm xác định của các dược chất trong phương pháp.

Dược chất	Nồng độ pha (µg/ml)	Giá trị đo được trong ngày			Giá trị đo được trong 3 ngày		
		Nồng độ (±SD, µg/ml)	*RSD (%)*	*E_r (%)*	*Nồng độ (±SD, µg/ml)*	*RSD (%)*	*E_r (%)*
PA	24	24,16±0,35	1,48	1,03	24,02±0,53	2,20	1,57
	28	28,13±0,57	0,02	1,50	28,36±0,19	0,65	0,46
	32	31,67±0,67	2,11	1,42	32,18±0,95	2,97	2,24
IBU	16	16,07±0,41	2,59	1,94	15,92±0,41	2,59	2,00
	20	20,63±0,32	1,56	1,18	19,82±0,35	1,79	1,29
	24	24,23±0,42	1,72	1,25	24,00±0,51	2,12	1,54
CA	1,6	1,68±0,08	3,90	3,23	1,58±0,09	5,46	3,95
	2,0	1,97±0,08	3,80	2,59	2,02±0,11	5,33	4,06
	2,4	2,44±0,09	3,57	2,63	2,42±0,08	3,16	2,29

Mỗi nồng độ lặp lại 10 lần đo và tính nồng độ trung bình.

Độ ổn định: Để khảo sát sự ổn định của các dược chất thì dung dịch gốc của nó được để tĩnh ở 4°C trong 1 tháng. Thêm vào đó, độ ổn định còn được xác định bằng cách đo phổ tử ngoại tỷ đối của dung dịch chuẩn PA, IBU và CA ở nhiệt độ phòng sau 4 giờ pha chế. Kết quả cho thấy, phổ tử ngoại tỷ đối của dung dịch PA, IBU và CA không có sự thay đổi đáng kể nào.

Phân tích hỗn hợp thuốc thương mại: Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối của hỗn hợp 3 thành phần được áp dụng để phân tích hỗn hợp trong chế phẩm chứa cả PA, IBU và CA trên thị trường có tên Ibuparavic.

Lấy khối lượng bột trung bình của 20 viên nang, tiến hành pha loãng 20.000 lần. Sau đó sử dụng phương pháp thêm chuẩn và dựa vào phương trình đường chuẩn thiết lập phía trên để xác định nồng độ từng chất PA, IBU và CA có trong chế phẩm. Kết quả phân tích nồng độ mỗi chất cùng độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Xác định PA, IBU và CA bằng phương pháp thêm chuẩn trong viên nang thương mại trên thị trường.

Dược chất	Nồng độ pha định kiến		Nồng độ xác định phương pháp	
	Ban đầu (µg/ml)	*Thêm chuẩn (µg/ml)*	*Khối lượng (µg/ml)*	*%*
PA	30	2	30,324	101,08
		6	30,182	100,61
		10	30,295	100,98
			Trung bình	100,89
			SD	0,25
			% RSD	0,25
IBU	20	2	19,876	99,38
		4	20,058	100,29
		6	20,125	100,63
			Trung bình	100,10
			SD	0,65
			% RSD	0,65
CA	2	0,4	2,06	103,00
		0,8	1,99	99,50
		1,2	2,05	102,50
			Trung bình	101,67
			SD	1,89
			% RSD	1,86

5. Bàn luận

Phổ hấp thụ của PA, IBU, CA trong khoảng bước sóng 200-300 nm trong các dung môi khác nhau đều cho sự chồng chéo lớn, gây cản trở việc sử dụng phương pháp đo quang phổ tử ngoại tỷ đối thông thường để xác định đồng thời chúng trong hỗn hợp (hình 1). Khi đo phổ hấp thụ quang phổ tử ngoại tỷ đối, có 2 yếu tố ảnh hưởng là dung môi và nồng độ số chia. Ở đây, sự ảnh hưởng của dung môi pha loãng đến cường độ của phép đo đã được khảo sát. Các dung môi bao gồm nước, NaOH 0,1 M và HCl 0,1 M đã bị loại trừ do tính không hòa tan hoặc ít tan của PA, IBU và CA. Để đảm bảo phân tích an toàn, thân thiện môi trường và đảm bảo sự

tan của PA, IBU, CA nên nghiên cứu lựa chọn hỗn hợp ethanol với nước làm dung môi để hòa tan và pha loãng.

Trong phổ tử ngoại tỷ đối giữa số bị chia là phổ hấp thụ PA, IBU, CA với số chia là phổ hỗn hợp 2 thành phần có bước nhảy nồng độ đều là 4 µg/ml. Kết quả thu được ở hình 2B, 3B, 4B cho thấy, sự tuyến tính ở nồng độ thấp 4 µg/ml và cao 40 µg/ml, 3 đường chuẩn tương ứng đều có hệ số tương quan gần bằng 1. Với phổ tử ngoại tỷ đối của phổ hấp thụ CA với phổ hỗn hợp (PA, IBU) có thể xét 2 cặp bước sóng 244-278 nm và 212-244 nm (hình 3B), nhưng ở đây lựa chọn cặp 244-278 nm để có giá trị lớn của biên độ đỉnh đến đáy.

Theo bảng 2, giá trị của %RSD trong ngày của các dung dịch chuẩn PA và IBU đều không vượt quá 2,6%, với CA các giá trị này đều dưới 4,0%, kết quả này cũng tương tự như các nghiên cứu trước đây [1, 6, 7]. Dễ thấy %RSD khi xác định nồng độ CA đều có giá trị cao, nguyên nhân có thể là do nồng độ CA nhỏ hơn nhiều so với nồng độ PA và IBU trong dung dịch 3 thành phần pha tại phòng thí nghiệm.

Dãy nồng độ xác định được thích hợp cùng với các giá trị thấp của sai số tương đối (E_r%) được ghi trong bảng 2 có thể xác nhận độ chính xác của phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối 3 thành phần có thể thực hiện được.

Kết quả đo ở bảng 3 cho thấy, RSD của PA, IBU có giá trị lần lượt là 0,25 và 0,65%. Giá trị RSD của CA nhỏ (1,86%) và đạt tiêu chuẩn phân tích [9]. Có thể thấy rằng, để giảm %RSD của CA khi kiểm nghiệm viên nang thương mại thì số lần lặp lại phép đo phải được tăng lên. Các kết quả xác định nồng độ PA, IBU và CA trong chế phẩm thương mại có giá trị sai khác rất ít với nồng độ ghi trên bao bì.

6. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng quang phổ tử ngoại tỷ đối của hỗn hợp 3 thành phần cũng như của 1 trong 3 thành phần với số chia là hỗn hợp 2 thành phần còn lại để định lượng thành phần kia là rất khả quan, thao tác đơn giản, cho kết quả nhanh và chính xác. Phương pháp quang phổ tử ngoại tỷ đối đã định lượng 3 thành phần trong hỗn hợp 3 chất mà không cần bất kỳ xử lý hóa học nào, dung môi phân tích xanh và an toàn. Phương pháp này phù hợp để kiểm soát chất lượng thường quy thuộc phòng đảm bảo chất lượng tại các công ty sản xuất, cũng như ở các trung tâm kiểm nghiệm thuốc và mỹ phẩm ở các tỉnh, thành phố, khi chỉ cần có máy quang phổ tử ngoại thông thường. Đồng thời, phương pháp này được áp dụng để định lượng cho biệt dược 2 và 3 thành phần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R.R. Cunha, S.C. Chaves, M.M.A.C. Ribeiro, et al. (2015), "Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by highperformance liquid chromatography with UV detection and by capillary lectrophoresis with conductivity detection", *J. Sep. Sci.*, **38(10)**, pp.1657-1662, DOI: 10.1002/jssc.201401387.

[2] J.R.M. Lopez, A.M. Dominguez-Ramirez, H.J. Cook, et al. (2006), "Enhancement of antinociception by o-administration of ibuprofen and caffeine in arthritic rats", *Eur. J. Pharmacol.*, **544(1-3)**, pp.31-38, DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.06.041.

[3] C.K.S. Ong, R.A. Seymour, P. Lirk, et al. (2010), "Combining paracetamol (acetaminophen) with nonsteroidal antiinflammatory drugs: A qualitative systematic review of analgesic efficacy for acute postoperative pain", *Anesth. Analg.*, **110(4)**, pp.1170-1179, DOI: 10.1213/ANE.0b013e3181cf9281.

[4] N.M. Habib, M.M. Abdelrahman, N.S. Abdelwhab, et al. (2017), "Spectrophotometric methods for resolving ernary mixture of diflunisal, naproxen and diflunisal toxic impurity", *Anal. Chem. Lett.*, **7(1)**, pp.97-108, DOI: 10.1080/22297928.2017.1294990.

[5] M. Attimarad, M.S. Chohan, R.E.E. Elgorashe (2020), "Smart analysis of a ternary mixture of amlodipine, hydrochlorothiazide and telmisartan by manipulation of UV pectra: Development, validation and application to formulations", *J. Mol. Struct.*, **1212**, DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128095.

[6] B.T. Tran, T.N. Tran, A.M.T. Tran, et al. (2022), "Simultaneous determination of paracetamol, ibuprofen, and caffeine in tablets by molecular absorption pectroscopy combined with classical least square method", *Molecules*, **27(9)**, DOI: 10.3390/molecules27092657.

[7] M.R. Khoshayand, H. Abdollahi, M. Shariatpanahi, et al. (2008), "Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by hemometric methods", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **70(3)**, pp.491-499, DOI: 10.1016/j.saa.2007.07.033.

[8] P. Borman, D. Elder (2017), "Q2(R1) validation of analytical procedures", *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, John Wiley & Sons, Inc, **2**, pp.127-166, DOI: 10.1002/9781118971147.ch5.

[9] AOAC International (2007), "How to meet ISO 17025 requirements or method verification", https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/09/ALACC-method-verification.pdf, accessed 20 September 2022.