

Application of multiple-wavelength UV spectrophotometry for quantification of pharmaceutical drugs in binary mixtures

Nghiêm Thi Thanh Nga^{1**}, Phi Thi Tuyet Nhung^{1**}, Tran Dinh Nghia², Nguyen Quang Thang³,
Pham Le Minh³, Vu Tung Lam³, Vu Dang Hoang^{3*}

¹Faculty of Pharmacy, Thanh Do University, Kim Chung, Hoai Duc, Hanoi, Vietnam

²Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Basic Science, Hanoi University of
Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Analytical Chemistry and Drug Quality Control, Hanoi University of Pharmacy,
13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

^{**}Co-first authors

* Corresponding author: Vu Dang Hoang, email: hoangvd@hup.edu.vn

ABSTRACT

Background: UV spectrophotometric quantification of pharmaceutical binary mixtures is usually hindered by spectral overlapping.

Aim: This study aims at highlighting the pros and cons of coupling algorithms with multi-wavelength UV spectral data to possibly quantify two absorbing substances in their standard pharmaceutical mixtures at once.

Method: Antibiotic mixtures, sulfamethoxazole-trimethoprim, were UV spectrophotometrically investigated for demonstration due to severe overlapping spectral bands and no clear peak observed for trimethoprim. The algorithms (i.e., improved Vierordt or Classical Least Squares - CLS) were applied to retrieve the concentration of these antibiotic substances from UV spectral data of their mixtures.

Results: Two wavelengths, 245.0 and 265.5 nm, were selected to construct a pair of simultaneous equations. UV spectral data recorded for 245 ÷ 305 nm ($\Delta\lambda = 1$ nm) were employed for a CLS-type calibration model. Vierordt – based UV spectrophotometric quantification was not so accurate for trimethoprim (recovery ranged $\geq 115\%$ at 90 and 110% of the working concentration, 8 mg/L), especially when spectral measurement error deliberately exceeded 1% at either working wavelength. In contrast, CLS-based UV spectrophotometry showed good accuracy when quantifying either substance (recovery in the range of 98 ÷ 102%) and much lower sensitivity (i.e., quantification error $\leq 1\%$) to errors induced by spectral measurement than the Vierordt-based method. This method was also as accurate as the HPLC method (regulated in the current version of Vietnamese pharmacopoeia) when co-assaying sulfamethoxazole and trimethoprim in commercial dosage forms ($p > 0.05$).

Conclusions: The application of multivariate algorithms such as CLS can be useful for UV quantification of pharmaceutical drugs in binary mixtures; whereas the Vierordt's spectrophotometric method should be applied with caution.

Keywords: UV spectrophotometry, pharmaceutical binary mixtures, Vierordt, Classical Least Squares, measurement error, HPLC.



Ứng dụng kỹ thuật đo quang tại nhiều bước sóng để định lượng thuốc trong hỗn hợp hai thành phần bằng phổ tử ngoại

Nghiêm Thị Thanh Nga^{1**}, Phí Thị Tuyết Nhung^{1**}, Trần Đình Nghĩa², Nguyễn Quang Thắng³,
Phạm Lê Minh³, Vũ Tùng Lâm³, Vũ Đăng Hoàng^{3*}

¹ Khoa Dược, Đại học Thành Đô

² Bộ môn Hóa Đại cương - Vô cơ, Khoa Khoa học cơ bản, Trường Đại học Dược Hà Nội

³ Khoa Hóa Phân tích và Kiểm nghiệm thuốc, Trường Đại học Dược Hà Nội

******Đồng tác giả thứ nhất

* Tác giả liên hệ: Vũ Đăng Hoàng, email: hoangvd@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 16/5/2023 - Ngày duyệt đăng: 15/6/2023)

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Định lượng hỗn hợp dược chất hai thành phần bằng quang phổ tử ngoại thường gặp khó khăn do sự đan xen phổ.

Mục tiêu nghiên cứu: Nghiên cứu này nhằm mục đích nêu bật những ưu và nhược điểm của kết hợp các thuật toán với dữ liệu đo phổ tử ngoại tại nhiều bước sóng để có thể định lượng đồng thời hai chất hoạt quang trong hỗn hợp dược chất của chúng.

Phương pháp nghiên cứu: Hỗn hợp kháng sinh, sulfamethoxazol-trimethoprim được nghiên cứu phổ tử ngoại để minh họa vì có sự chồng chập nhiều các dải phổ và trimethoprim không có cực trị rõ ràng. Các thuật toán (Vierordt cải tiến hoặc bình phương tối thiểu truyền thống – CLS) được áp dụng để xác định nồng độ của các kháng sinh này từ dữ liệu phổ tử ngoại của hỗn hợp mẫu chuẩn của chúng.

Kết quả nghiên cứu: Hai bước sóng, 245,0 và 265,5 nm, được lựa chọn để lập hệ hai phương trình. Dữ liệu phổ tử ngoại ghi trong khoảng 245 ÷ 305 nm ($\Delta\lambda = 1$ nm) được sử dụng để xây dựng một mô hình hiệu chuẩn dạng CLS. Định lượng bằng quang phổ tử ngoại kết hợp thuật toán Vierordt không đạt yêu cầu về độ đúng cho trimethoprim (ở mức 90 và 110% nồng độ làm việc, 8 mg/L, % hàm lượng tìm lại $\geq 115\%$), đặc biệt khi phép đo độ hấp thụ được điều chỉnh sai lệch 1% ở mỗi bước sóng làm việc. Ngược lại, quang phổ tử ngoại kết hợp CLS có độ đúng tốt cho cả hai chất (tìm lại trong khoảng 98 ÷ 102%) và ít bị ảnh hưởng hơn rất nhiều (sai số định lượng $\leq 1\%$) với sai số phép đo phổ khi so sánh với phương pháp Vierordt. Phương pháp này cũng có độ đúng tương đương với phương pháp HPLC (được qui định trong phiên bản hiện nay của Dược điển Việt Nam) khi định lượng đồng thời sulfamethoxazol và trimethoprim trong một số chế phẩm lưu hành trên thị trường ($p > 0,05$).

Kết luận: Áp dụng các thuật toán đa biến như CLS có thể hữu ích cho định lượng dược chất trong hỗn hợp hai thành phần bằng quang phổ tử ngoại; trong khi phải thận trọng khi áp dụng phương pháp đo quang kết hợp với thuật toán Vierordt.

Từ khóa: Quang phổ UV, hỗn hợp dược chất hai thành phần, Vierordt, bình phương tối thiểu, lỗi đo lường, HPLC.



Đặt vấn đề

Định lượng hoạt chất trong chế phẩm bằng quang phổ tử ngoại truyền thống có ưu điểm nổi bật là thao tác đơn giản, tiết kiệm dung môi và thời gian đo mẫu. Tuy nhiên, kỹ thuật này không thể áp dụng được cho các chế phẩm đa thành phần do sự chồng chập của các dải phổ thành phần. Chính vì vậy, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng phổ biến để định lượng đồng thời các hoạt chất trong chế phẩm đa thành phần trong các dược điển tham chiếu [3, 4].

Theo lý thuyết, định lượng dung dịch nhiều thành phần khả thi khi đo quang tại nhiều bước sóng với giả thiết: (i) các chất trong hỗn hợp có hệ số hấp thụ khác nhau và (ii) số bước sóng khảo sát phải lớn hơn hoặc bằng số chất có trong dung dịch. Cho tới nay, vấn đề lựa chọn các bước sóng định lượng vẫn chưa được đề cập chi tiết trong giáo trình giảng dạy Hóa phân tích II (Phân tích dụng cụ) dành cho sinh viên dược khoa [2]. Theo Dược điển Việt Nam V, quang phổ tử ngoại chỉ được áp dụng rất hạn chế với kỹ thuật đo quang tại hai bước sóng để định lượng hoạt chất trong hỗn hợp hai thành phần (ví dụ: định lượng strychnin trong hạt mã tiền bằng đo quang tại 262 và 300 nm [1]).

Trên thế giới, kết hợp toán hóa (chemometrics) và quang phổ UV đã được triển khai phổ biến để định lượng hỗn hợp có chứa hai dược chất [5, 6]. Phân tích đa biến (multivariate analysis; ví dụ: CLS, ILS, PCR, PLS) cho phép xác định được một cách tổng thể mối quan hệ giữa độ hấp thụ và các cấu tử trong dung dịch đo nhờ tương quan từng phần (partial relation) và hồi qui bội (multiple regression) cũng như giới thiệu thêm các biến tiềm ẩn (latent variables). Nghiên cứu này được tiến hành nhằm chỉ ra những ưu, nhược điểm của đo phổ tử ngoại tại nhiều bước sóng để định lượng đồng thời hoạt chất trong hỗn hợp hai thành phần. Hai kỹ thuật: Vierordt cải tiến (đo quang tại 2 bước sóng) [7] và bình phương tối thiểu truyền thống (đo quang tại

nhiều bước sóng) [8] được giải thích cơ sở lý thuyết và thử ứng dụng để định lượng hỗn hợp kháng sinh sulfamethoxazol – trimethoprim.

Cơ sở lý thuyết

Vierordt cải tiến

Định lượng các hoạt chất trong hỗn hợp hai thành phần bằng quang phổ đã được Vierordt tiến hành lần đầu tiên trên thế giới vào thế kỷ 19 [9]. Nguyên lý của phương pháp này dựa trên kết quả đo quang tại hai bước sóng phù hợp và giải hệ phương trình sau:

$$E_1 = \alpha_1 C_A + \beta_1 C_B \quad (1)$$

$$E_2 = \alpha_2 C_A + \beta_2 C_B \quad (2)$$

Trong đó: các chỉ số dưới "1" và "2" đề cập đến hai bước sóng đo quang; E là mật độ quang đo với cuvet có bề dày 1 cm; C_A và C_B lần lượt là nồng độ của A và B trong hỗn hợp, với α và β tương ứng là các hệ số hấp thụ của chúng.

Mặc dù đơn giản dễ thực hiện nhưng phương pháp này ít thông dụng trong lĩnh vực hoá phân tích. Điều này chủ yếu là do sự e ngại: phương pháp này có độ chính xác kém hơn so với phương pháp đo điểm (thường chọn tại bước sóng cực đại) khi mắc sai số về bước sóng đo; đặc biệt khi phải đo quang tại ở vùng bờ vai của đường cong phổ hấp thụ.

Glenn đã điều chỉnh phương pháp Vierordt khi sử dụng các tỉ số như sau: $m = E_2/E_1$, $a = \alpha_2/\alpha_1$, $b = \beta_2/\beta_1$. Khi đó, ta sẽ có hệ phương trình tương ứng:

$$E_1 = \alpha_1 C_A + \beta_1 C_B \quad (3)$$

$$mE_1 = a\alpha_1 C_A + b\beta_1 C_B \quad (4)$$

Giải hệ phương trình này ta được:

$$C_A = \frac{E_1}{\alpha_1} \left[\frac{b-m}{b-a} \right] = \frac{E_1}{\alpha_1} T_A = C'_A T_A \quad (5)$$

$$C_B = \frac{E_2}{\beta_2} \left[\frac{b(m-a)}{m(b-a)} \right] \quad (6)$$

Trong đó, phương trình 4 được viết dưới dạng biểu thức của định luật Lambert-Beer cho định lượng chất A (khi không có mặt bất kỳ chất nào khác có khả năng hấp thụ ánh sáng); T_A là số hạng hiệu chỉnh với giả thiết các giá trị mật độ quang E_1 và E_2 đều trong



khoảng phù hợp (ví dụ $0,2 \div 1,0$). Cần lưu ý: khi $a \approx b$ mẫu số của cả phương trình 4 và 5 sẽ bằng 0; $a < m < b$ và tử số của T_A có xu hướng bằng 0. Do vậy, sai số của a , b và m sẽ ảnh hưởng đến độ chính xác của phương pháp này. Điều này có nghĩa là nếu đường cong phổ hấp thụ của A và B gần như "giống nhau", ta sẽ không thể xác định được cặp bước sóng định lượng thích hợp (vì $a \neq b$ không nhiều).

Việc xác định bước sóng định lượng sẽ không dễ thực hiện với đồ thị biểu diễn hệ số hấp thụ theo bước sóng của từng chất, vì mặc dù phổ hấp thụ của A và B có thể có vị trí khác nhau trên cùng một đồ thị nhưng các giá trị a và b vẫn không có sự khác biệt nhiều. Glenn đã đề xuất việc sử dụng đồ thị biểu diễn $\log E$ theo bước sóng để xác định cặp bước sóng phù hợp cho định lượng (hình 1).

Giả thiết hệ số biến thiên (CV) của mật độ quang trong khoảng giá trị $0,2 \div 1,0$ là u (coi là hằng định) và sai số tương đối của phép đo $< 20\%$, trong phép định lượng hỗn hợp hai thành phần CV của C_A sẽ là $u\sqrt{(H_A)}$; tương tự CV của C_B sẽ là $u\sqrt{(H_B)}$. H_A và H_B là các hàm khác nhau của các giá trị a , b và m . Nếu b/m nằm ngoài khoảng giới hạn, $0,1 \div 2,0$, thì $\sqrt{(H_A)} < \sqrt{7}$ và CV của $C_A < u\sqrt{7}$. Điều này có nghĩa là nếu b/m nằm ngoài giới hạn đã nêu, CV của C_A khi có mặt B sẽ không vượt quá 2,5 lần so với CV của C_A khi không có mặt B. Điều này cũng đúng với B, CV của $C_B < u\sqrt{7}$ nếu m/a nằm ngoài khoảng giới hạn, $0,1 \div 2,0$.

Nói một cách khác khoảng giới hạn cho phép đối với b/m hoặc m/a sẽ là $0 \div 0,1$ và $2,0 \div \infty$. Mặc dù khoảng $2,0 \div \infty$ sẽ cho kết quả định lượng chính xác hơn, nhưng trên thực tế khoảng $0 \div 0,1$ vẫn có thể được sử dụng. Điều này sẽ ảnh hưởng đến sự lựa chọn các bước sóng cũng như tỉ số nồng độ C_A/C_B cho phép định lượng. Ví dụ: để định lượng chất A trong hỗn hợp luôn có một tỉ số C_A/C_B mà dưới mức này CV của C_A sẽ $> u\sqrt{7}$.

Khi áp dụng phương pháp Vierordt, nếu A và B có các đỉnh hấp thụ tách khỏi nhau rõ

ràng việc lựa chọn các bước sóng λ_1 và λ_2 sẽ đơn giản là các bước sóng cực đại tương ứng với A và B.

Tuy nhiên nếu A và B có các đỉnh hấp thụ không tách khỏi nhau hoàn toàn, việc xác định các bước sóng cho các tỉ số b/m (để định lượng A) hoặc m/a (để định lượng B) nên nằm ngoài khoảng giới hạn, $0,1 \div 2,0$ (ưu tiên lựa chọn với tỉ số $> 2,0$). Căn cứ theo H_A và H_B , lựa chọn bước sóng phụ thuộc vào tỉ số b/a cho cả A và B. Nếu một trong hai tỉ số b/m hoặc m/a nằm ngoài khoảng giới hạn, $0,1 \div 2,0$, thì tỉ số b/a cũng sẽ nằm ngoài khoảng giới hạn này. Vì $a < m < b$, nên b/m hoặc m/a luôn luôn gần với giá trị 0,1 hoặc 2,0 hơn so với b/a (với giả thiết tỉ số này nằm ngoài khoảng giới hạn).

Khi lựa chọn bước sóng, b/a phải không được có giá trị trong khoảng $0,1 \div 2,0$; nếu $b/a < 0,1$ thì giá trị của tỉ số này càng nhỏ càng tốt. Mặt khác, nếu $b/a > 2,0$ thì giá trị của tỉ số này càng lớn càng tốt (trên thực tế thường xét $2,0 < b/a \leq 5,0$ khi sử dụng cuvet và nồng độ không đổi). Nếu $b \gg a$ thì phương trình 4 sẽ

có dạng : $C_A = \frac{E_1}{\alpha_1} \left[\frac{b-m}{b} \right]$; trừ khi $C_A/C_B \ll$ hay

$m \gg$, sai số của b sẽ ít ảnh hưởng đến C_A .

Trong hình 1, tiến hành trượt đồ thị của B dọc theo trục tung một khoảng K cho tới khi hai đường cong giao nhau gần với hoặc tại bước sóng cực đại của A (bước sóng λ_1). Lựa chọn bước sóng λ_2 theo nguyên tắc đảm bảo một khoảng cách khá lớn giữa A và B. Thông thường, có thể chọn một vài giá trị λ_1 (bằng cách di chuyển B đến các vị trí khác nhau) và tương ứng xác định λ_2 . Nếu tại vị trí λ_2 , trị số của B lớn hơn trị số của A thì b/a sẽ có giá trị trong khoảng $2,0 \div \infty$.

Quy trình xác định bước sóng có thể mô tả bằng các phương trình sau:

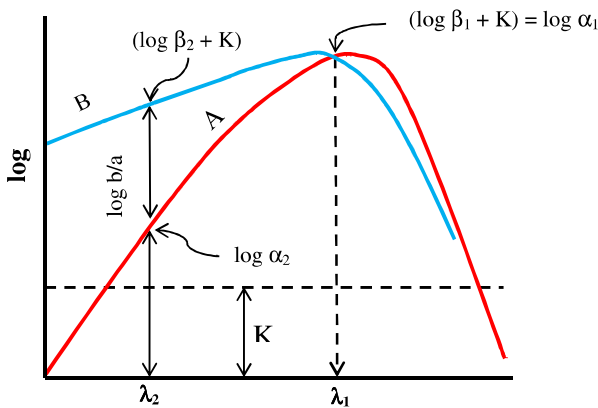
$$b/a = \frac{\beta_2 \alpha_1}{\beta_1 \alpha_2} \quad (7)$$

$$\log(a/b) = \log \beta_2 - \log \alpha_2 + \log \alpha_1 - \log \beta_1 = (\log \beta_2 + K) - \log \alpha_2 + [\log \alpha_1 - (\log \beta_1 + K)] \quad (8)$$

Khi A và B giao nhau, $[\log \alpha_1 - (\log \beta_1 + K)] = 0$ do vậy $\log(a/b) = (\log \beta_2 + K) - \log \alpha_2$



Chú ý khi lựa chọn bước sóng định lượng theo tỉ số b/a thì các bước sóng tốt nhất cho định lượng A cũng chính là các bước sóng tốt nhất cho định lượng B. Ngoài ra cần phải lưu ý đến sai số bước sóng tại vị trí bờ vai của đường cong hấp thụ cũng như khả năng tương tác giữa A và B (ví dụ có khả năng tạo phức, khi một trong hai chất là phân tử lớn). Đặc biệt, với phương pháp Vierordt tính cộng tính ánh sáng của A và B tại các bước sóng được lựa chọn phải tuyệt đối tuân thủ theo định luật Lambert-Beer.



Hình 1: Hướng dẫn lựa chọn bước sóng định lượng cho hỗn hợp hai thành phần Bình phương tối thiểu truyền thống (Classical Least Squares – CLS)

Theo định luật Lambert-Beer, độ hấp thụ quang của cấu tử thứ i trong hỗn hợp được tính theo công thức:

$$A_i = a_i b c_i \quad (9)$$

Trong đó: A_i , a_i và c_i lần lượt là độ hấp thụ quang, hệ số hấp thụ và nồng độ của cấu tử thứ i ; b là bề dày của dung dịch. Vì b là hằng số (thường là 1), nên tích số của ab có thể được biểu diễn bằng ký hiệu K (do vậy, thuật toán CLS còn được gọi là ma trận K).

Với hỗn hợp hai thành phần, ta có:

$$A = a_1 c_1 + a_2 c_2 \quad (10)$$

Thuật toán CLS được xây dựng dựa trên phương trình (10) khi áp dụng cho tất cả các bước sóng trong một khoảng đo quang:

$$A_j = a_{1j} c_1 + a_{2j} c_2 \quad (11)$$

Trong đó: A_j là mật độ quang của hỗn hợp

tại bước sóng thứ j ($j = 1 \div n$); a_{1j} và a_{2j} là hệ số hấp thụ của cấu tử thứ 1 và 2 tại bước sóng thứ j .

Gọi E_j là sai số cho A_j , ta có:

$$E_j = A_j - (a_{1j} c_1 + a_{2j} c_2) \quad (12)$$

$$\sum_j E_j^2 = \sum_j (A_j - a_{1j} c_1 - a_{2j} c_2)^2 \quad (13)$$

Lấy đạo hàm theo c_i :

$$d(\sum_j E_j^2)/dc_i = d/dc_i (\sum_j (A_j - a_{1j} c_1 - a_{2j} c_2)^2) \quad (14)$$

$$d(\sum_j E_j^2)/dc_i = 2 \times \sum_j (A_j - a_{1j} c_1 - a_{2j} c_2) \times d/dc_i (A_j - a_{1j} c_1 - a_{2j} c_2) \quad (15)$$

$$d(\sum_j E_j^2)/dc_i = 2 \times \sum_j (A_j - a_{1j} c_1 - a_{2j} c_2) \times \sum_j (a_{ij}) \quad (16)$$

Với phương pháp “bình phương tối thiểu”, các giá trị đạo hàm được đặt bằng 0:

$$0 = \sum_j (A_j - a_{1j} c_1 - a_{2j} c_2) \times \sum_j (a_{ij}) \quad (17)$$

$$\sum_j a_{ij} A_j = \sum_j a_{ij} a_{1j} c_1 + \sum_j a_{ij} a_{2j} c_2 \quad (18)$$

Phương trình (18) có thể chuyển thành dạng ma trận:

$$[c] [aa^T] = [a] [A^T] \quad (19)$$

$$[c] = [A][a^T]^{-1} \quad (20)$$

Thuật toán này chỉ đúng khi phổ hấp thụ của hỗn hợp phải có tính cộng tính ánh sáng (dung dịch đo phải trong suốt, không có hiện tượng tán xạ). Đây là nhược điểm cơ bản vì hiếm khi chúng ta biết được phổ hấp thụ của tất cả các cấu tử trong dung dịch đo [10].

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Chất chuẩn sulfamethoxazol (SUL, 99,85%) và trimethoprim (TRI, 100,67%) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương. Dung môi pha mẫu là HCl 0,1M. Các dung dịch chuẩn hỗn hợp được pha từ các dung dịch chuẩn gốc SUL 500 mg/L và TRI 500 mg/L.

Các chế phẩm được khảo sát (SUL 400 mg + TRI 80 mg/đơn vị liều) gồm có: viên nén Cotrimstada (Trách nhiệm hữu hạn liên doanh STADA, SĐK: VD-23965-15, số lô: 040419); viên nén Biseptol 480mg (Công ty cổ phần Dược phẩm Trung ương 1 – Pharbaco, SĐK: VD-19942-13, số lô: 18015); viên nén Trimeseptol (Công ty CP Dược phẩm Hà Tây, SĐK: VD-24195-16, số lô: 1110120); viên nang cứng (Công ty cổ phần Dược Đồng Nai, SĐK: VD-26690-17, số lô: 471017); bột uống Supertrim (Công ty CP Dược phẩm Agimexpharm, SĐK: VD-23491-15, số lô: 150619).

Để định lượng hoạt chất trong chế phẩm, 20 viên nén hoặc bột thuốc trong 20 viên nang hoặc 20 gói được nghiền mịn, trộn đều



và cân chính xác một lượng (tương ứng với khoảng 50 mg SUL và 10 mg TRI) cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 60-70 mL dung dịch HCl 0,1M, lắc, siêu âm khoảng 15 phút và thêm tiếp dung môi này cho vừa đủ 100 mL. Lọc, loại bỏ 20 - 30 mL dịch lọc đầu. Lấy chính xác 2 mL dịch lọc cho vào bình định mức 25 mL, thêm dung dịch HCl 0,1M vừa đủ được dung dịch thử (có nồng độ chính xác khoảng SUL 40 mg/L và TRI 8 mg/L), lắc đều.

Đo quang được thực hiện với máy quang phổ hai chùm tia UV-1800 Shimadzu (Nhật Bản) được kết nối với máy tính (hệ điều hành Windows XP) với mẫu trắng là HCl 0,1M. Chế độ đo độ hấp thụ: quét phổ từ 400 nm đến 200 nm; độ rộng khe sáng: 1,0 nm; tốc độ quét: trung bình; khoảng cách giữa hai điểm trên phổ: 0,05 nm; cuvet thạch anh 1 cm. Tiền xử lý phổ (làm trơn) được tiến hành với phần mềm UVProbe 2.35. Xử lý dữ liệu phổ được tiến hành với EXCEL Microsoft và MATLAB 2015a (MathWorks, Mỹ).

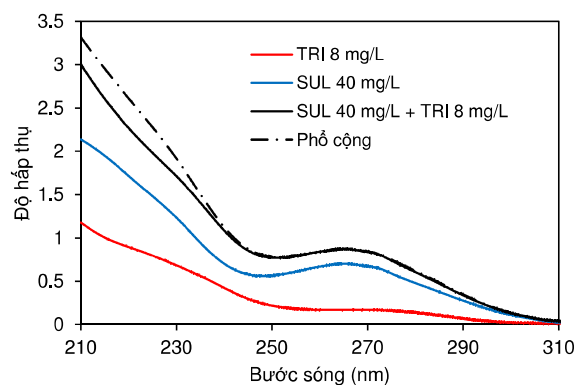
Phân tích sắc ký được tiến hành trên hệ thống Shimadzu LC 2030C 3D Plus (Nhật Bản) với cột InertSustain C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) - GL Sciences Inc. Pha động: 1750 mL nước, 500 mL acetonitril và 2,5 mL triethylamin, điều chỉnh đến pH 5,90, thêm nước vừa đủ 2500 mL. Bước sóng phát hiện: 254 nm. Tốc độ dòng: 1,8 mL/phút. Thể tích tiêm: 20 μL. Dung môi pha động, mẫu thử và chuẩn đều được lọc qua màng 0,45 μm trước khi chạy sắc ký.

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Hình 2 biểu diễn sự chồng chập của các dải phổ thành phần SUL 40 mg/L và TRI 8 mg/L cản trở việc định lượng đồng thời hai hoạt chất này trong hỗn hợp hai thành phần. Khoảng cộng tính ánh sáng của hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L được ước lượng là 245 ÷ 305 nm (sai khác giữa phổ hỗn hợp và phổ cộng < 3%). Tại nồng độ làm việc, phổ SUL có cực đại hấp thụ tại khoảng 265,5 nm; trong khi phổ TRI không có cực trị rõ ràng.

Thông thường, hạn chế của phép đo quang UV-Vis có liên quan đến: (i) định luật

Lambert-Beer chỉ đúng với bức xạ đơn sắc và (ii) tia lác (ánh sáng chiếu tới đầu dò, không phải là một phần của phân tích). Ngay cả với bộ lựa chọn bước sóng tốt nhất, ánh sáng được chiếu tới đầu dò luôn là một băng thông dù nhỏ nhưng hữu hạn (gây ra sai lệch âm so với định luật Lambert-Beer; nhưng được giảm thiểu nếu hệ số hấp thụ về cơ bản hằng định trong phạm vi bước sóng đi qua bộ lựa chọn bước sóng). Phép đo sẽ mắc ít sai số hơn nếu độ rộng của băng thông hữu dụng từ nguồn sáng bằng khoảng 1/10 độ rộng của băng thông tự nhiên của chất phân tích (là độ rộng đo tại một nửa chiều cao của đỉnh hấp thụ). Điều này khiến kết quả định lượng dễ mắc sai số khi bước sóng được lựa chọn tại bờ vai của phổ hấp thụ [11]. Vì lý do này, định lượng hoạt chất trong dung dịch đơn thành phần được tiến hành tại bước sóng cực đại (λ_{max}) và/hoặc bước sóng có độ hấp thụ đạt khoảng 0,2 ÷ 0,8 [12]. Trên thực tế, sai số trong phép đo quang phổ tử ngoại luôn tồn tại bất chấp nỗ lực cải tiến kỹ thuật và hiệu chuẩn máy [13]; ngoài ra cũng phải kể đến sai số có thể có do sự có mặt của các cấu tử khác trong nền mẫu thực.

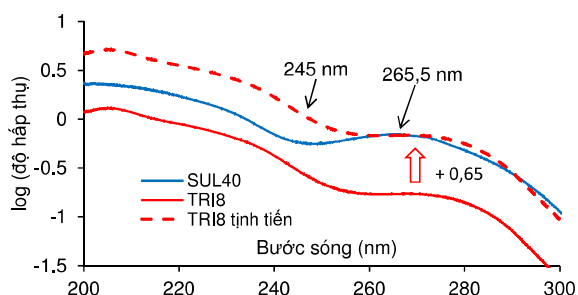


Hình 2: Phổ hấp thụ của SUL 40 mg/L, TRI 8 mg/L, phổ cộng và phổ hỗn hợp (SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L) tương ứng

Theo thuật toán Vierordt cải tiến, cặp bước sóng 245 và 265,5 nm được lựa chọn để định lượng hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L (hình 3). Bảng 1 trình bày khoảng tuyến tính của SUL và TRI tại hai bước sóng được lựa chọn và hệ phương trình được thiết lập để tìm



nồng độ của SUL và TRI trong hỗn hợp (sử dụng độ dốc của phương trình hồi qui là hệ số hấp thụ tương ứng; hệ số chặn của các phương trình hồi qui khác 0 không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$).



Hình 3: Xác định bước sóng định lượng cho hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L bằng thuật toán Vierordt cải tiến.

Bảng 1: Khoảng tuyến tính và hệ phương trình hai ẩn số để định lượng SUL và TRI tại bước sóng 245 và 265,5 nm.

Bước sóng (nm)	Phương trình	R ²
Khoảng tuyến tính		
245	$D = 0,0138 \times C_{SUL} + 0,0256$	0,9985
	$D = 0,035 \times C_{TRI} + 0,018$	0,9973
265,5	$D = 0,0171 \times C_{SUL} + 0,0132$	0,9987
	$D = 0,021 \times C_{TRI} + 0,0058$	0,9992
Hệ phương trình		
245	$0,854 = 0,0138 \times C_{SUL} + 0,035 \times C_{TRI}$	
265,5	$0,874 = 0,0171 \times C_{SUL} + 0,021 \times C_{TRI}$	

Kết quả cho thấy độ đúng của phép định lượng SUL và TRI trong các hỗn hợp chuẩn tự tạo thường mắc sai số lớn (% tìm lại $\geq 115\%$) khi TRI ở mức 90 và 110 % so với nồng độ làm việc (Bảng 2). Đặc biệt, khi sai số đo phổ hấp thụ $\geq 1\%$ tại hai bước sóng được lựa chọn, độ đúng của phép định lượng SUL và TRI ở mức nồng độ làm việc đều có nguy cơ nằm ngoài giới hạn $98 \div 102\%$ [14]. Do vậy, thuật toán Vierordt cải tiến đã không được ứng dụng để định lượng đồng thời SUL và TRI trong chế phẩm.

Bảng 2: Kết quả định lượng bằng thuật toán Vierordt cải tiến một số hỗn hợp chuẩn SUL-TRI và hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L khi có sai số đo 1% tại hai bước sóng 245 và 265,5 nm.

STT	Nồng độ (mg/L)		% tìm lại	
	SUL	TRI	SUL	TRI
1	40	7,2	99,1	119,4
2	40	8	102,3	102,5
3	40	8,8	99,5	114,7
4	36	8	96,4	119,0
5	44	8	98,9	119,5
Sai số đo 1% với hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L*				
% tìm lại	265,5 \uparrow +245 \uparrow	265,5 \downarrow +245 \downarrow	265,5 \uparrow +245 \downarrow	265,5 \downarrow +245 \uparrow
SUL	101,5	103,5	98,5	106,3
TRI	101,6	104,1	113,5	92,3

* \uparrow và \downarrow : lần lượt là tăng và giảm độ hấp thụ tại bước sóng định lượng

Thuật toán CLS được triển khai với ma trận nồng độ bao gồm 9 hỗn hợp chuẩn tự tạo SUL - TRI ở mức $80 \div 120\%$ nồng độ làm việc, SUL 40 mg/L và TRI 8 mg/L (bảng 3) với dữ liệu phổ hấp thụ trong khoảng bước sóng $245 \div 305$ nm. Kết quả cho thấy độ đúng của phép định lượng đồng thời SUL và TRI đạt yêu cầu theo quy định của AOAC (% tìm lại trung bình trong khoảng $98 \div 102\%$ [11]). Đáng chú ý, kết quả định lượng hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L bằng thuật toán CLS có sai số nhỏ hơn đáng kể (chỉ khoảng 1 %) so với thuật toán Vierordt cải tiến khi giả thiết đo độ hấp thụ mắc sai số 1 %.

Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo qui định của Dược điển Việt Nam V [1] được sử dụng làm phương pháp đối chiếu. Độ đúng của phương pháp HPLC được đánh giá bằng kỹ thuật thêm 20 % chất chuẩn vào nền mẫu thực (viên nén, viên nang, bột uống): đạt khoảng $98,9 \div 101,2$



Bảng 3: Kết quả định lượng bằng thuật toán CLS các dung dịch chuẩn SUL-TRI ma trận nồng độ hợp chuẩn và hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L khi thay đổi giá trị đo 1 % (tăng hoặc giảm so với giá trị ban đầu) trong vùng bước sóng 245 ÷ 305 nm ($\Delta\lambda = 1$ nm).

STT	Nồng độ (mg/L)		% tìm lại	
	SUL	TRI	SUL	TRI
1	40	8	102,1	99,8
2	40	6,4	101,7	100,9
3	40	9,6	100,9	98,9
4	32	8	101,1	101,7
5	32	6,4	100,4	104,8
6	32	9,6	98,7	99,9
7	48	8	99,8	99,3
8	48	6,4	99,3	100,2
9	48	9,6	97,7	98,0

Sai số đo 1% với hỗn hợp SUL 40 mg/L + TRI 8 mg/L*				
% tìm lại	↑		↓	
SUL	101,0		98,8	
TRI	103,0		100,8	

* ↑ và ↓: lần lượt là tăng và giảm độ hấp thụ tại bước sóng định lượng

% cho định lượng SUL và TRI. Kiểm định thống kê (t cặp với độ tin cậy 95 %) cho thấy phương pháp quang phổ tử ngoại kết hợp với CLS không có sự khác biệt đáng kể về độ đúng so với HPLC ($p > 0,05$) với giá trị RSD của phép định lượng quang phổ < 2 % (bảng 4). Điều này cũng cho thấy kết quả định lượng của phương pháp CLS-UV không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của thành phần tá dược trong các chế phẩm được khảo sát.

Bảng 4: Hàm lượng (% so với nhãn) của SUL và TRI trong một số chế phẩm bằng quang phổ tử ngoại và HPLC

Chế phẩm	Hàm lượng (% so với nhãn, TB \pm SD, n = 6)			
	SUL		TRI	
	CLS-UV	HPLC	CLS-UV	HPLC
Trimeseptol	95,8 \pm 0,9	96,7 \pm 0,2	99,5 \pm 0,7	99,3 \pm 0,3
Cotrimstada	97,3 \pm 0,5	97,8 \pm 0,5	98,9 \pm 1,3	98,3 \pm 0,3
Biseptol	99,0 \pm 1,7	97,7 \pm 0,7	97,9 \pm 1,1	99,4 \pm 0,5
Sulfareptol	97,2 \pm 0,6	98,7 \pm 0,2	100,3 \pm 0,9	100,8 \pm 0,4
Supertrim	100,1 \pm 1,2	97,9 \pm 0,6	97,3 \pm 0,9	98,1 \pm 0,5

Kết luận

Theo lý thuyết, định lượng đồng thời các hoạt chất trong hỗn hợp hai thành phần bằng quang phổ tử ngoại có tính khả thi khi ứng dụng các thuật toán: Vierordt cải tiến hoặc CLS để tương ứng xử lý dữ liệu phổ đo được tại hai hoặc nhiều bước sóng. Ví dụ minh họa định lượng SUL và TRI trong hỗn hợp cho thấy thuật toán Vierordt cải tiến có cơ sở lý thuyết đơn giản (xử lý số liệu bằng EXCEL Microsoft) nhưng có nguy cơ mắc sai số lớn khi: (i) nồng độ SUL hoặc TRI khác với nồng độ làm việc được sử dụng để lựa chọn bước sóng, (ii) sai số đo phổ hấp thụ ≥ 1 %. Ngược lại, thuật toán CLS cho phép định lượng SUL và TRI trong hỗn hợp bằng kỹ thuật đo quang tại nhiều bước sóng với độ chính xác (độ lặp lại và độ đúng) cao. Phương pháp này có ưu điểm nổi bật là tiết kiệm thời gian và dung môi, có thể thay thế phương pháp HPLC trong kiểm tra thường qui chất lượng thuốc, đặc biệt khi số lượng mẫu lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản y học, 2018. Chuyên luận "Viên nén Cotrimoxazol", tr. 966; Chuyên luận "Mã tiền (hạt)", tr. 1241.
2. Trần Tử An, *Hóa Phân tích II (Phân tích công cụ)*, Trường Đại học Dược Hà Nội, 2006. Chương 3: Quang phổ hấp thụ phân tử, tr. 41-72.
3. United States Pharmacopeial Convention, 2021. USP 44 - NF 39
4. Stationery Office, 2022. British Pharmacopoeia 2023

(Tiếp theo trang 35)