

Định lượng đồng thời các hợp chất axit ascorbic, acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin, dextromethorphan HBr trong thuốc viên bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Thu Thảo*, Mai Thanh Nhân

Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*nguyenttthao@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu thực hiện với hai mục tiêu: xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời axit ascorbic, acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin, dextromethorphan HBr ở dạng thuốc viên bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), và ứng dụng quy trình đã thẩm định để định lượng một số mẫu trên thị trường có chứa các hợp chất trên. Việc phân tách sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), dùng kiểu rửa giải gradient với pha động A (đệm photphat pH = 3,0) và pha động B (acetonitril). Kết quả nghiên cứu thu được khoảng nồng độ tuyến tính lần lượt axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin và dextromethorphan HBr là (8-56, 16-104, 40-240, 16-80 và 24-146) μg·mL⁻¹. Độ đúng phương pháp được xác định bằng tỷ lệ phục hồi trong khoảng (98,80-101,27) %. Độ lặp lại có phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (% RSD) là 0,64 % (< 2,0 %). Phương pháp đề xuất có thể áp dụng để định lượng sáu loại thuốc viên đang lưu hành trên thị trường, và cả sáu mẫu thuốc đều đạt hàm lượng theo quy định Dược điển Việt Nam V.

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 06/06/2024

Được duyệt 17/07/2024

Công bố 28/08/2024

Từ khóa

axit ascorbic,
acetaminophen,
phenylephrin HCl,
guaifenesin,
dextromethorphan HBr

1 Giới thiệu

Hiện nay, xu hướng kết hợp các chế phẩm giảm đau, thông mũi và trị ho được chú trọng và sử dụng rộng rãi để tăng hiệu quả điều trị bệnh. Trong số đó, axit ascorbic, acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin và dextromethorphan HBr là các chế phẩm được phổ biến nhất. Acetaminophen là loại thuốc được dùng để giảm sốt, đau đầu và các cơn đau nhức nhẹ khác. Acetaminophen là thành phần chính trong nhiều loại thuốc trị cảm lạnh và cúm, có thể dùng riêng lẻ hoặc kết hợp với pseudoephedrin, dextromethorphan, chlorpheniramin, phenylephrin HCl, doxylamin, và guaifenesin. Phenylephrin HCl là dược chất tác dụng giống thần kinh giao cảm α1 (α1-adrenergic) có tác dụng trực tiếp lên các thụ thể α1-adrenergic làm co mạch máu và làm tăng huyết áp. Tác dụng làm tăng huyết áp yếu hơn norepinephrin, nhưng thời gian tác

dụng dài hơn. Phenylephrin HCl gây nhịp tim chậm do phản xạ, làm giảm thể tích máu trong tuần hoàn, giảm lưu lượng máu qua thận, cũng như giảm máu vào nhiều mô và cơ quan của cơ thể nên phenylephrin HCl là một chất co mạch mạnh, được sử dụng làm thuốc thông mũi và thuốc trợ tim. Guaifenesin có công dụng long đờm do kích thích tăng tiết dịch ở đường hô hấp, làm tăng thể tích và giảm độ nhớt của dịch tiết ở khí quản và phế quản. Nhờ vậy, thuốc làm tăng hiệu quả của phản xạ ho và làm dễ tống đờm ra ngoài hơn. Dextromethorphan HBr dùng trong điều trị ho không có đờm (ho khan). Axit ascorbic đóng vai trò như một chất chống oxy hóa mạnh, tăng cường hệ thống miễn dịch và có nhiều tác dụng với sức khỏe [1, 2].

Tất cả các hợp chất nêu trên có độ phân cực và giá trị pKa khác nhau nên gây ra một vấn đề về phân tích định lượng đồng thời các hoạt chất. Các tài liệu nghiên cứu đã đề xuất một số phương pháp phân tích định lượng

như sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC), đo quang phổ UV, HPLC. Nghiên cứu của Rekulapally và cộng sự dùng phương pháp HPLC để xác định đồng thời phenylephrin, acetaminophen, guaifenesin và dextromethorphan ở dạng viên nén. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra các thành phần được phân tách tốt bằng cột Altima (50 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m), dùng pha động A là axit photphoric (H_3PO_4) bằng cách pha 1 mL axit trong 1 000 mL nước và acetonitril (ACN) dưới dạng dung môi B, tách các hợp chất dùng kiểu rửa giải gradient. Nhược điểm phương pháp này dùng H_3PO_4 làm thành phần pha động có giá trị pH = 1,88 nằm ngoài giới hạn cho phép của cột sắc ký có pH trong khoảng (từ 2 đến 8) nên sẽ ảnh hưởng đến tuổi thọ cột sắc ký. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu chỉ ra hình dạng peak của phenylephrin bị kéo đuôi với hệ số kéo đuôi 1,4 sẽ ảnh hưởng đến kết quả phân tích [3].

Ngoài ra, phần lớn các phương pháp HPLC đã công bố đều sử dụng tác nhân ghép cặp ion để tăng khả năng phân tách các thuốc trên cột gốc silica. Năm 2021, nghiên cứu của Dagariya và cộng sự đã xác định đồng thời dextromethorphan HBr, phenylephrin HCl và chlorpheniramin maleat trong siro bằng phương pháp HPLC. Việc định lượng được thực hiện bằng cách dùng cột C8 (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m) và pha động bao gồm dung dịch đệm pH = 3,2 (hòa tan 1,08 gam muối natri của axit octan-1-sulfonic và 1,0 mL triethylamin trong 1 000 mL nước, điều chỉnh về pH = 3,2 bằng dung dịch axit H_3PO_4) và ACN với kiểu rửa giải gradient. Từ các điều kiện sắc ký đã chọn, kết quả thu được có hệ số kéo đuôi lần lượt là phenylephrin HCl (1,36), chlorpheniramin maleat (1,49) và dextromethorphan HBr (1,64) [4]. Kết quả nghiên cứu cho thấy các hợp chất có hệ số kéo đuôi cao, dao động trong khoảng (1,36-1,64). Trong đó, dextromethorphan HBr (1,64) không đạt yêu cầu về hệ số kéo đuôi (0,8-1,5) và dùng chương trình rửa giải gradient có thời gian lưu lần lượt phenylephrin HCl, chlorpheniramin maleat và dextromethorphan HBr là 3,7 phút, 10,3 phút và 11,1 phút. Phenylephrin HCl phân tách hoàn toàn, ngược lại khả năng phân tách giữa chlorpheniramin maleat và dextromethorphan HBr thời gian lưu quá gần nhau (chênh lệch 0,8 phút) và hình dạng hai peak bè rộng nên dễ dẫn tới hiện tượng chập peak. Bên cạnh đó, các tác nhân ghép cặp ion (muối natri của axit octan-1-sulfonic) dùng làm thành phần pha động có xu hướng

hấp phụ rất mạnh ở pha tĩnh, dẫn đến khó phục hồi các đặc tính ban đầu của cột.

Trước đây, định lượng đồng thời acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin và dextromethorphan HBr bằng UPLC ghép với đầu dò UV-Vis đã được thực hiện. Việc phân tách sắc ký của bốn hoạt chất được phẩm này được thực hiện trên cột pha đảo C18 (100 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μ m) bằng kiểu rửa giải gradient trong 13 phút với pha động A bao gồm chất đệm (axit H_3PO_4 18,3 mM và 4,94 mM muối natri của axit sunfonic 1-heptan) và nước theo tỷ lệ 95:5 v/v, pha động B (hỗn hợp gồm axit H_3PO_4 18,3 mM và muối natri của axit sunfonic 1-heptan 4,94 mM) và nước theo tỷ lệ 20:80, và phát hiện ở bước sóng 214 nm. Kết quả nghiên cứu, cho thấy các peak tách hoàn toàn và đối xứng với hệ số kéo đuôi dao động trong khoảng (1,0-1,2) [5]. Phương pháp UPLC sử dụng chưa phổ biến tại các công ty dược ở Việt Nam vì chi phí thiết bị đắt tiền hơn so với máy HPLC khoảng 5 lần và độ nhạy của phương pháp phân tích cao hơn so với HPLC nên phù hợp để xác định hàm lượng vết hoặc dư lượng thuốc bảo vệ thực vật (từ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ đến $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) và yêu cầu người kỹ thuật viên phải có trình độ chuyên môn cao. Phương pháp HPLC có ưu điểm độ nhạy, độ chính xác cao hơn phương pháp quang phổ UV-Vis, không yêu cầu phải dùng điện cực chọn lọc như chuẩn độ điện thế. Phương pháp HPLC dùng để định lượng các đối tượng mẫu thử có nồng độ từ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ đến $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ và các hợp chất có tính chất từ không phân cực đến phân cực phù hợp với tính chất hoá học các kháng sinh dùng trong điều trị bệnh nên HPLC được ứng dụng rộng rãi trong dược phẩm. Năm 2016, nghiên cứu của Nguyễn Thị Dung và cộng sự đã xác định đồng thời paracetamol, phenylephrin, chlorpheniramin và hợp chất liên quan 4-aminophenol trong dược phẩm bằng HPLC. Các hợp chất này được phân tách trên cột C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m) bằng kiểu rửa giải gradient, sử dụng dung dịch đệm KH_2PO_4 (pH 2,5) và ACN làm pha động, tốc độ dòng 1,4 mL.phút⁻¹, nhiệt độ 35 °C và phát hiện ở bước sóng 265 nm đối với chlorpheniramin và 278 nm đối với paracetamol, phenylephrin và 4-aminophenol. Kết quả thu được các hợp chất tách nhau hoàn toàn và hình dạng peak đối xứng, với hệ số kéo đuôi lần lượt là phenylephrin (1,1), paracetamol (1,3) và chlorpheniramin (1,2) [6]. Vì vậy, nghiên cứu chọn pha động gồm ACN/dung dịch đệm KH_2PO_4 . Cho đến nay, các công bố vẫn chưa có quy trình định lượng đồng thời

năm hoạt chất gồm axit ascorbic, acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin và dextromethorphan HBr bằng HPLC trong thuốc viên. Bên cạnh đó, nhằm mục đích kiểm soát chất lượng thuốc trong dược phẩm để đảm bảo an toàn cho người tiêu dùng và tối ưu quy trình phân tích đơn giản, có thể áp dụng dễ dàng cho các công ty Dược phẩm, nghiên cứu này được đề xuất thực hiện nhằm nghiên cứu định lượng đồng các hợp chất axit ascorbic, acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin và dextromethorphan HBr trong thuốc viên bằng HPLC và áp dụng quy trình đã xây dựng để định lượng đồng thời năm hoạt chất trên trong thuốc viên đang được lưu hành trên thị trường.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Hóa chất: dung môi methanol, triethylamin, axit photphoric (H_3PO_4), kali dihydrophosphat, acetonitril (ACN) (tất cả đều của Supelco, Germany); Chất chuẩn hàm lượng nguyên trạng acetaminophen (99,7 %), guaifenesin (99,5 %), axit ascorbic (100,1 %), phenylephrin HCl (100,1 %), dextromethorphan HBr (95,1 %) (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương); Mẫu thử viên nén bao phim Ameflu Daytime + C ameflu (mỗi viên chứa acetaminophen 500 mg, guaifenesin 200 mg, axit ascorbic 100 mg, phenylephrin HCl 10 mg và dextromethorphan HBr 15 mg), Ameflu Day Time (mỗi viên chứa phenylephrin HCl 10 mg, acetaminophen 500 mg, guaifenesin 200 mg, dextromethorphan HBr 15 mg), Glotadol Flu (mỗi viên chứa phenylephrin HCl 10 mg, paracetamol 500 mg, guaifenesin 200 mg, dextromethorphan HBr 15 mg). Deflucold Day (mỗi viên chứa phenylephrin HCl 5 mg, paracetamol 500 mg, dextromethorphan HCl 15 mg).

2.1.2 Thiết bị: máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (Shimadzu, Japan); Cân phân tích (Shimadzu, Japan) với độ chính xác 0,0001 g; Bộ lọc rút chân không (Agilent, USA); Bể siêu âm (Elma, Germany); Cột sắc ký RP-18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μm) (Shimadzu, Japan).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện tối ưu quy trình phân tích

2.2.1.1 Khảo sát chương trình rửa giải gradient

Nghiên cứu dựa vào các thông số lý hóa của các hoạt chất trên gồm công thức phân tử, giá trị pKa, độ tan, và tính phân cực nên đã tiến hành khảo sát tỷ lệ thành phần pha động với điều kiện sắc ký như sau:

Cột sắc ký: C18 (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột 35 $^{\circ}\text{C}$, dùng đầu dò PDA phát hiện bước sóng 220 nm đối với phenylephrin, guaifenesin và dextromethorphan HBr, 245 nm đối với axit ascorbic và acetaminophen, tốc độ dòng 1,4 mL.phút⁻¹, thể tích tiêm 20 μL .

Pha động A: pha đệm phosphat pH = 3,0 bằng cách hòa tan 2,72 g KH_2PO_4 và 3 mL triethylamin vừa đủ 1 000 mL nước, điều chỉnh bằng axit H_3PO_4 đến pH = 3,0.

Pha động B : ACN.

Dung môi pha mẫu: ACN/pha động A (10:90; v/v).

Dung dịch chuẩn gốc axit ascorbic: cân chính xác khoảng 50 mg chuẩn axit ascorbic vào bình định mức 50 mL, thêm nước cất tới vạch, trộn đều.

Dung dịch chuẩn gốc acetaminophen: cân chính xác khoảng 50 mg chuẩn acetaminophen vào bình định mức 10 mL, thêm nước cất tới vạch, trộn đều.

Dung dịch chuẩn gốc phenylephrin HCl: cân chính xác khoảng 25 mg chuẩn phenylephrin HCl vào bình định mức 25 mL, thêm nước cất tới vạch, trộn đều.

Dung dịch chuẩn gốc guaifenesin: cân chính xác khoảng 40 mg chuẩn guaifenesin vào bình định mức 20 mL, thêm nước cất tới vạch, trộn đều.

Dung dịch chuẩn gốc dextromethorphan HBr: cân chính xác khoảng 30 mg chuẩn dextromethorphan vào bình định mức 20 mL, thêm nước cất tới vạch, trộn đều.

Dung dịch hỗn hợp chuẩn: lấy chính xác 1 mL mỗi chuẩn gốc gồm axit ascorbic, acetaminophen, guaifenesin, và 2 mL chuẩn gốc gồm phenylephrin HCl, dextromethorphan HBr gốc vào bình định mức 50 mL, thêm dung môi pha mẫu tới vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm (loại PTFE - polytetrafluoroethylene).

2.2.1.2 Khảo sát pH của dung dịch đệm

Tối ưu giá trị pH các dung dịch đệm (3,0, 5,0 và 7,0) được đánh giá thông qua hình dạng peak sắc ký đối xứng với hệ số bất đối xứng trong khoảng (0,8-1,5), độ phân giải giữa hai peak liền kề nhau ($R_s \geq 2$), và diện tích peak.

Hòa tan 2,72 g KH_2PO_4 và 3 mL triethylamin vừa đủ 1 000 mL nước, điều chỉnh bằng axit H_3PO_4 đến pH = 3,0; pH = 5,0 và pH = 7,0.

Pha hỗn hợp chuẩn tại 3 mức đệm pH = (3,0, 5,0 và 7,0) gồm axit ascorbic (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), acetaminophen (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và dextromethorphan HBr (60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.1.3 Khảo sát dung môi pha mẫu

Dung môi pha mẫu theo tỉ lệ thể tích ACN/dung môi (3:97, v/v), (10:90, v/v) và (50:50, v/v) được tối ưu dựa trên hình dạng peak sắc ký đối xứng với hệ số bất đối xứng (0,8-1,5), độ phân giải giữa hai peak liền kề nhau ($R_s \geq 2$), và diện tích peak.

Pha hỗn hợp chuẩn gồm axit ascorbic ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), acetaminophen ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và dextromethorphan HBr ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.2 Xây dựng phương pháp định lượng

Các tiêu chuẩn của quy trình thẩm định theo ICH với các quy định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng [7,8].

2.2.2.1 Tính tương thích hệ thống sắc ký

Hỗn hợp chuẩn gồm axit ascorbic ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), acetaminophen ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), dextromethorphan HBr ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) tiêm vào máy HPLC, thực hiện tiêm lặp 6 lần. Yêu cầu đạt được gồm % RSD của hệ số kéo đuôi các peak và các lần tiêm lặp $< 2,0$, hệ số phân giải của hai peak (R_s) $\geq 2,0$ và số đĩa lý thuyết $\geq 3\,000$.

2.2.2.2 Tính tuyến tính

Khảo sát dãy mẫu chuẩn có nồng độ khác nhau để xác định khoảng nồng độ tuyến tính. Pha các dung dịch chuẩn axit ascorbic có nồng độ tương ứng (8, 16, 20, 24, 40 và 56) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, phenylephrin HCl (16, 32, 40, 64, 80 và 104) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, acetaminophen (40, 80, 100, 120, 200 và 240) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, guaifenesin (16, 32, 40, 48, 64 và 80) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dextromethorphan HBr (24, 48, 60, 97, 121 và 146) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Xây dựng đường chuẩn $S = aC_x + b$ với trục [x] biểu thị nồng độ và trục [S] là diện tích peak của mỗi mẫu chuẩn. Xác định hệ số tương quan (R) giữa diện tích peak (S) và nồng độ (x). Yêu cầu $R^2 \geq 0,99$.

2.2.2.3 Tính đặc hiệu

Chuẩn bị 4 loại mẫu cho thử nghiệm gồm dung dịch mẫu trắng (dung môi), mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn được tiêm vào hệ thống HPLC trong cùng các điều kiện thử nghiệm, sắc ký đồ được ghi lại cho từng dung dịch và hình dạng của các peak.

Mẫu thử gốc: lấy 20 viên, cân tính khối lượng trung bình của 20 viên, nghiền mịn, trộn đều. Cân chính xác một lượng thuốc đã nghiền mịn tương ứng với 1 viên thuốc chứa 500 mg (acetaminophen), 200 mg (guaifenesin), 100 mg (axit ascorbic), 15 mg (dextromethorphan HBr) và 10 mg (phenylephrin HCl) vào bình định mức 100 mL, hòa tan, siêu âm 10 phút và định mức đến vạch bằng nước cất.

Chuẩn bị mẫu làm việc đối với acetaminophen, guaifenesin và axit ascorbic: Lấy chính xác 1 mL mẫu thử gốc vào bình định mức 50 mL và định mức tới vạch bằng dung môi pha mẫu, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Chuẩn bị mẫu làm việc đối với phenylephrin HCl, dextromethorphan HBr: lấy chính xác 10 mL mẫu thử gốc vào bình định mức 25 mL và định mức tới vạch bằng dung môi pha mẫu, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu thêm chuẩn acetaminophen, guaifenesin và axit ascorbic vào mẫu thử: lấy chính xác 1 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm acetaminophen ($5\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), axit ascorbic ($1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 1 mL dung dịch mẫu thử gốc vào bình định mức 50 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu thêm chuẩn phenylephrin HCl, dextromethorphan HBr vào mẫu thử: lấy chính xác 1 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm dextromethorphan HBr ($1\,500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 10 mL dung dịch mỗi thử gốc cho vào bình định mức 25 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

2.2.2.4 Độ chính xác

Tiến hành phân tích mẫu theo quy trình phân tích đã xây dựng, thực hiện hai ngày phân tích khác nhau, mỗi ngày tiến hành đánh giá sáu mẫu thử khác nhau trên cùng một quy trình phân tích, với nồng độ mẫu thử axit ascorbic ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), acetaminophen ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), dextromethorphan HBr ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Yêu cầu phần trăm hàm lượng so với hàm lượng ghi trên nhãn của axit ascorbic khoảng (95-110) %, acetaminophen (95-105) %, phenylephrin HCl (90-110), dextromethorphan HBr (90-110) %, guaifenesin (90-110) % và phần trăm độ lệch chuẩn tương đối không quá 2,0 % [9, 10]. Độ lặp lại tính trên kết quả ngày thử nghiệm thứ nhất, độ chính xác trung gian tính trên kết quả của hai ngày thực hiện.

2.2.2.5 Độ đúng

Độ đúng được xác định bằng cách thêm ở các mức (80, 100 và 120) % so với nồng độ lý thuyết của chất chuẩn vào lượng mẫu thử đã biết về hàm lượng.

Độ đúng 80 %: lấy chính xác 4 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm acetaminophen ($1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), axit ascorbic (200

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 1 mL dung dịch mẫu thử gốc vào bình định mức 50 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Lấy chính xác 2 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm dextromethorphan HBr ($600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 10 mL dung dịch mẫu thử gốc cho vào bình định mức 25 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Độ đúng 100 %: lấy chính xác 1 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm acetaminophen ($5\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($2\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), axit ascorbic ($1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 1 mL mẫu thử gốc vào bình định mức 50 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Lấy chính xác 1 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm dextromethorphan HBr ($1\,500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 10 mL dung dịch mẫu thử gốc cho vào bình định mức 25 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Độ đúng 120 %: lấy chính xác 6 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm acetaminophen ($1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), guaifenesin ($400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), axit ascorbic ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 1 mL dung dịch mẫu thử gốc vào bình định mức 50 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Lấy chính xác 3 mL mỗi dung dịch chuẩn gốc gồm dextromethorphan HBr ($600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), phenylephrin HCl ($400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và 10 mL dung dịch mẫu thử gốc cho vào bình định mức 25 mL, bổ sung dung môi pha mẫu đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Yêu cầu tỉ lệ phục hồi nằm trong khoảng (98-102) %.

3 Kết quả nghiên cứu

3.1 Khảo sát điều kiện tối ưu cho quy trình phân tích

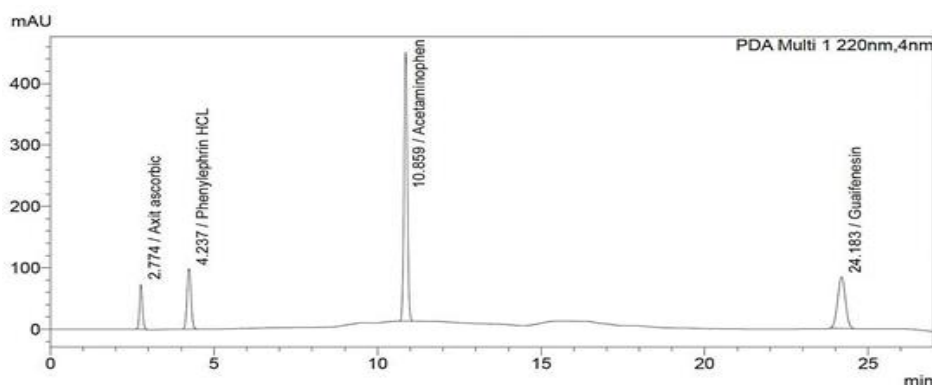
3.1.1. Khảo sát chương trình rửa giải gradient

Trong một nghiên cứu trước đây cho thấy có sự khác biệt về độ phân cực giữa các hợp chất thuốc trong khi “xác định đồng thời paracetamol, phenylephrin, chlorpheniramin và hợp chất liên quan 4-aminophenol trong dược phẩm bằng HPLC” [6] nên chương trình rửa giải gradient được lựa chọn, dùng dung dịch đệm photphat pH 3,0 và ACN làm pha động, tốc độ dòng 1,4 mL·phút⁻¹ và cột C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), bước sóng phát hiện 220 nm để xác định phenylephrin HCl, guaifenesin, dextromethorphan và 245 nm đối với các hợp chất axit ascorbic, acetaminophen. Nghiên cứu khảo sát điều kiện sắc ký theo gradient 1 như Bảng 1.

Bảng 1 Chương trình rửa giải gradient 1

Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi (%)	
	Dung dịch đệm photphat pH 3,0 (A)	Acetonitril (B)
1	97	3
5	95	5
6	90	10
11	90	10
12	85	15
23	85	15
24	97	3
30	97	3

Kết quả thu được thể hiện ở Hình 1, đối với chương trình gradient 1, hai hợp chất gồm axit ascorbic và phenylephrin HCl, tách tốt với hệ số kéo đuôi lần lượt là 1,19 và 1,07 và độ phân giải giữa hai peak 7,61 nên giữ lại tỉ lệ ban đầu trong gradient tuyến tính với khoảng thời gian từ 1 đến 5 phút tương ứng tỷ lệ % ACN (tăng từ 3 đến 5). Bên cạnh đó, với điều kiện sắc ký trên, hai hợp chất còn lại acetaminophen và guaifenesin tách nhau hoàn toàn với độ phân giải giữa hai peak 34 và 78. Đối với dextromethorphan HBr là hợp chất ít phân cực nhất (log_k 3,75) so với bốn hợp chất còn lại, nên không được rửa giải ra khỏi cột sắc ký.

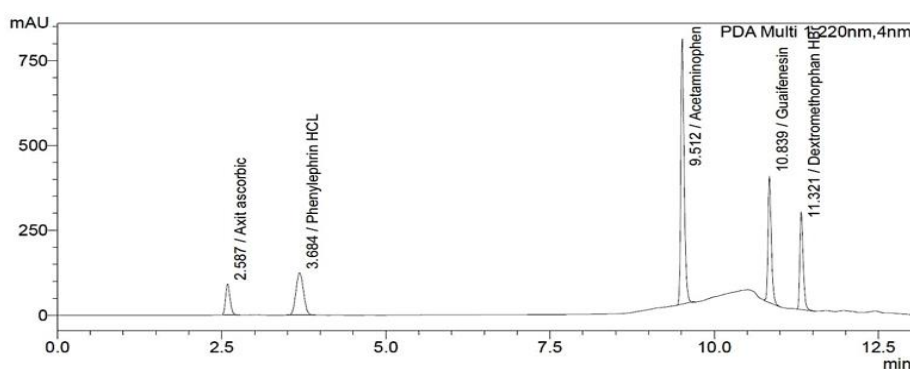


Hình 1 Sắc ký đồ của axit ascorbic và phenylephrin HCl, acetaminophen và guaifenesin tại λ_{max} 220 nm

Nghiên cứu tiếp tục điều chỉnh thành phần pha động bằng cách tăng tỉ lệ (%) dung môi hữu cơ ACN từ 10 % lên 60 % để đẩy chất ít phân cực còn lại ra khỏi cột sắc ký. Chương trình pha động sau khi điều chỉnh được thể hiện ở chương trình gradient 2 (Bảng 2).

Bảng 2 Chương trình rửa giải gradient 2

Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi (%)	
	Dung dịch đệm photphat pH 3,0 (A)	Acetonitril (B)
1	97	3
5	95	5
10	40	60
12	40	60
15	97	3
20	97	3

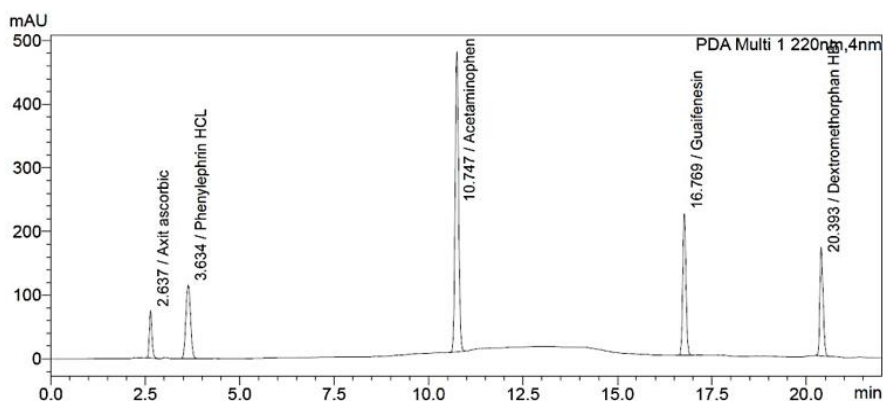


Hình 2 Sắc ký đồ của axit ascorbic, phenylephrin HCL, acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan tại $\lambda_{\max}$ 220 nm

Nghiên cứu nhằm mục đích giảm hiện tượng trôi đường nền và kéo đuôi nên giảm tỉ lệ % ACN từ 60 % xuống 50 % và kéo dài thời gian chạy gradient bằng cách tăng thêm thời gian chạy gradient 20 phút (thay đổi khoảng thời gian gradient từ (5-10) phút (thời gian = 5 phút) tại gradient 2 bằng khoảng thời gian từ (5-25) phút (thời gian = 20 phút) ở gradient 3). Cuối cùng đưa về tỷ lệ ban đầu để tiếp tục sắc ký các mẫu sau đó, kết quả được thể hiện tại gradient 3.

Bảng 3 Chương trình rửa giải gradient 3

Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi (%)	
	Dung dịch đệm photphat pH = 3,0 (A)	Acetonitril (B)
1	97	3
5	95	5
25	50	50
26	50	50
27	97	3
30	97	3



Hình 3 Sắc ký đồ axit ascorbic, phenylephrin HCL, acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan HBr tại $\lambda_{\max}$ 220 nm

Đối với chương trình gradient 3, sau khi đã điều chỉnh, sắc ký đồ đã tách được năm hợp chất, hệ số kéo đuôi giảm lần lượt gồm axit ascorbic (1,20), phenylephrin HCl (1,04), acetaminophen (1,07), guaifenesin (1,07), dextromethorphan HBr (1,27) và hiện tượng trôi đường nền giảm rõ rệt so với gradient 2. Do đó, chương trình này được lựa chọn làm chương trình rửa giải gradient của thành phần pha động để phân tích đồng thời năm hoạt chất khảo sát và thời gian lưu của các chất được thể hiện ở Hình 3.

3.1.2 Khảo sát pH của dung dịch đệm

Bảng 4 Kết quả khảo sát ở đệm pH = 3,0; pH = 5,0; pH = 7,0

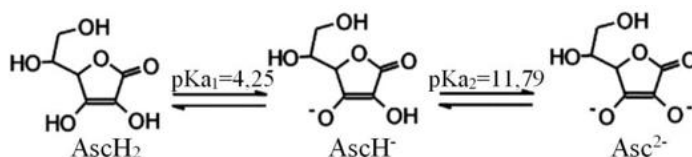
Tên hoạt chất	pH = 3,0				pH = 5,0				pH = 7,0			
	t _R	S	As	Rs	t _R	S	As	Rs	t _R	S	As	Rs
Axit ascorbic	2,64	906 605	1,20		2,42	710 359	1,26		2,29	618 457	1,65	
Phenylephrin HCl	3,63	994 843	1,04	5,15	3,64	995 779	1,06	6,43	4,03	972 442	1,05	8,35
Acetaminophen	10,75	6 049 198	1,07	33,25	10,70	6 031 310	1,07	33,49	10,64	6 020 517	1,06	30,09
Guaifenesin	16,77	1 302 176	1,07	33,51	16,75	1 310 600	1,07	33,77	16,72	1 307 604	1,08	33,98
Dextromethorphan HBr	20,38	1 006 754	1,27	20,58	20,45	1 011 695	1,33	21,03	23,44	1 002 910	1,60	31,65

(*)t_R: thời gian lưu (phút), S: diện tích peak, As: hệ số kéo đuôi, Rs: hệ số phân giải giữa hai peak liền kề nhau

Kết quả khảo sát ảnh hưởng pH đệm (Bảng 4) cho thấy khi tăng độ pH dung dịch đệm pha động từ 3,0 đến 7,0 thì trong 5 hợp chất, axit ascorbic có sự khác biệt nhất. Sự lưu giữ của axit ascorbic trong cột sắc ký và tín hiệu đo (diện tích peak) đều giảm khi càng tăng pH của dung dịch rửa giải. Bên cạnh đó, dextromethorphan HBr chỉ thay đổi thời gian lưu khi tăng lên pH = 7,0. Tuy nhiên, khả năng lưu giữ phenylephrin HCL, acetaminophen và guaifenesin hầu như thay đổi không đáng kể trong khoảng pH được nghiên cứu do giá trị pKa cao (phenylephrin HCl (pKa = 9,34), acetaminophen (pKa 9,46 và 14,17),

Nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của pH pha động đến khả năng lưu giữ và độ phân giải của acetaminophen, guaifenesin, axit ascorbic, phenylephrin HCl và dextromethorphan HBr. Mức độ ion hóa của các hoạt chất phụ thuộc vào pKa và pH của thành phần pha động. Hoạt tính axit bazơ của các hợp chất này liên quan đến sự proton hóa hoặc khử proton của axit ascorbic pKa bằng (4,25 và 11,79), acetaminophen pKa bằng (9,46 và 14,17), guaifenesin (pKa 13,6), phenylephrin HCl (pKa = 9,34), dextromethorphan HBr (pKa = 8,85) [9-11]. Tiến hành khảo sát các đệm pH = 3,0; pH = 5,0; và pH = 7,0 và kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

guaifenesin (pKa = 13,6). Nguyên nhân có sự khác biệt là do theo phương trình Henderson-1-Hasselbalch biểu diễn mối quan hệ giữa pH dung dịch và pKa của 1 hợp chất khi pH dung dịch lớn hơn 2 đơn vị giá trị pKa, thì dung dịch gần như khử proton hoàn toàn (99 %) [12,13] nên khi axit ascorbic trong môi trường đệm pH = 7,0 thì dạng chiếm ưu thế là ascorbate AscH⁻ (99,8 %) trình bày ở Hình 4. Điều đó có nghĩa axit ascorbic tồn tại dạng anion, điều này sẽ làm giảm sự tương tác giữa axit ascorbic và cột sắc ký, do đó làm giảm tín hiệu (diện tích peak) và sẽ rửa giải ra sớm (2,29 phút) so với tại đệm pH = 3,0 (2,64 phút).



Hình 4 Mức độ ion hoá của axit ascorbic

Về mặt cấu trúc, axit ascorbic (H₂A) là một axit 2 nấc phân ly (pKa₁ = 4,25 và pKa₂ = 11,79). Tại pH = (4-5) của dung dịch đệm pha động với sự khử proton của nhóm O(3)-H thì hình thành dạng monoanion (AscH⁻) và tại pH = (11-12) với sự khử proton của nhóm O(2)-H thì hình thành dạng dianion (Asc²⁻) [14]. Ngược lại, pH < pKa (4,25), dạng tồn tại chính là acid ascorbic. Vì vậy, độ pH = 3,0 được chọn vì giá trị này

mang lại sự phù hợp tốt nhất giữa hình dạng peak đối xứng, độ phân giải (Rs ≥ 2), và diện tích peak cao hơn so với giá trị pH còn lại.

3.1.3. Khảo sát dung môi pha mẫu

Tiến hành khảo sát dung môi pha mẫu theo tỉ lệ ACN-đệm (3:97, v/v), (10:90, v/v) và (50:50, v/v). Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5 Kết quả khảo sát tỉ lệ dung môi pha mẫu giữa ACN – đệm

Tên hoạt chất	ACN – đệm (3:97, v/v)			ACN – đệm (10:90, v/v)			ACN – đệm (50:50, v/v)		
	tr	A	Rs	tr	A	As	tr	A	Rs
Axit ascorbic	2,62	941 407		2,64	906 376		2,62	402 868	
Phenylephrin HCl	3,88	990 351	6,20	3,63	997 019	5,15	2,87	535 380	1,20
Acetaminophen	10,85	6 037 929	36,25	10,74	6 097 490	33,25	10,59	6 046 717	39,39
Guaifenesin	16,53	1 216 820	56,98	16,76	1 304 724	33,51	16,78	1 303 073	47,29
Dextromethorphan	20,22	1 002 601	22,99	20,39	1 005 119	22,42	22,28	1 000 527	22,43

(*) tr: thời gian lưu (phút), S: diện tích peak, As: hệ số kéo đuôi, Rs: hệ số phân giải giữa hai peak liền kề nhau

Sau khi chọn dung dịch đệm pH = 3,0, tỷ lệ dung môi pha mẫu được tối ưu hóa trong nghiên cứu tiếp theo. Khi càng tăng độ phân cực tỉ lệ ACN thì axit ascorbic và phenylephrin HCl bị rửa giải nhanh hơn so với các hợp chất còn lại, gây ra hiện tượng chồng lấp các peak giữa axit ascorbic và phenylephrin HCl được thể hiện rõ thông qua độ phân giải giảm dần từ 6,20 xuống còn 1,20 tương ứng ACN tăng từ 3 % lên 50 %. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chọn dung môi pha mẫu gồm pha động 20 mM KH_2PO_4 pH 3,0:ACN (90:10, v/v) vì kết quả chỉ ra hình dạng đỉnh đối xứng, hệ số tách và tín hiệu tốt hơn so với các tỉ lệ còn lại nên được chọn cho quy trình định lượng đồng thời các hợp axit ascorbic, acetaminophen, phenylephrin HCl, guaifenesin và dextromethorphan HBr trong thuốc viên bằng phương pháp HPLC.

Năm 2020, nghiên cứu của Sridevi và cộng sự dùng phương pháp HPLC để định lượng đồng thời axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen và levocetirizin HCl bằng phương pháp HPLC, dùng kiểu rửa giải gradient, thành phần pha động gồm dung dịch đệm photphat pH = 4,0 và acetonitril và thể tích tiêm khá lớn là 50 μL , dùng đầu dò UV để phát hiện các hợp chất ở bước sóng 220 nm [4]. Kết quả thu được khoảng nồng độ tuyến tính của axit ascorbic (101-304) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, phenylephrin HCl (15-40) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, acetaminophen (125-375) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cao hơn so với phương pháp nghiên cứu đề xuất axit ascorbic (8-56) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, phenylephrin HCl (16-104) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, acetaminophen (40-240) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Qua đó, để tăng sự tương tác giữa axit ascorbic và cột sắc ký, làm tăng diện tích peak nên chọn đệm photphat pH = 3,0 thay vì đệm pH = 4,0. Bên cạnh đó, nghiên cứu chọn đầu dò PDA để xác định phenylephrin HCl, guaifenesin, dextromethorphan ở bước sóng phát hiện 220 nm và axit ascorbic, acetaminophen tại 245 nm.

Hơn nữa, trong quy trình xử lý mẫu của nghiên cứu đã thực hiện bằng cách cân chính xác 1 lượng thuốc

tương ứng 1 viên thuốc chứa axit ascorbic 200 mg, phenylephrin HCl 5 mg, acetaminophen 500 mg, levocetirizin 5 mg vào bình định mức 200 mL, hòa tan và định mức tới vạch bằng dung môi pha mẫu. Sau đó, lấy 5 mL trên vào bình định mức 50 mL và pha loãng đến vạch bằng dung dịch pha mẫu. Sự chênh lệch nồng độ các hoạt chất có trong mẫu thử gồm axit ascorbic (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), acetaminophen (250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) cao gấp hơn 40 lần so với phenylephrin HCl (2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), levocetirizin (2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) nên dẫn tới hình dạng peak của phenylephrin HCl, levocetirizin rất bé so với hình dạng peak axit ascorbic, acetaminophen. Do đó, phương pháp nghiên cứu đề xuất đã khắc phục bằng cách chuẩn bị một mẫu thử gốc. Sau đó, pha riêng mẫu làm việc đối với acetaminophen, guaifenesin và axit ascorbic và pha riêng mẫu làm việc đối với phenylephrin HCl, dextromethorphan HBr từ mẫu thử gốc. Sau đó, tiêm hai mẫu này vào hệ thống máy sắc ký giúp quan sát được rõ ràng hình dạng của từng peak sắc ký được thể hiện Hình 8, Hình 9 và Hình 10.

Ưu điểm phương pháp đề xuất định lượng đồng thời 5 hoạt chất gồm axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan HBr có trong thuốc viên trên cùng một qui trình phân tích, giúp tiết kiệm thời gian và kinh tế. Các hợp chất phân tách hoàn toàn khi dùng kiểu rửa giải gradient, dùng thành phần pha động đệm photphat và ACN để tìm và qui trình xử lý mẫu đơn giản phù hợp với điều kiện thực tế của công ty dược phẩm thay vì định lượng từng hoạt chất một tốn thời gian và kinh phí. Hơn nữa, phương pháp được thẩm định và đáp ứng các yêu cầu của ICH về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ đúng, độ chính xác.

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

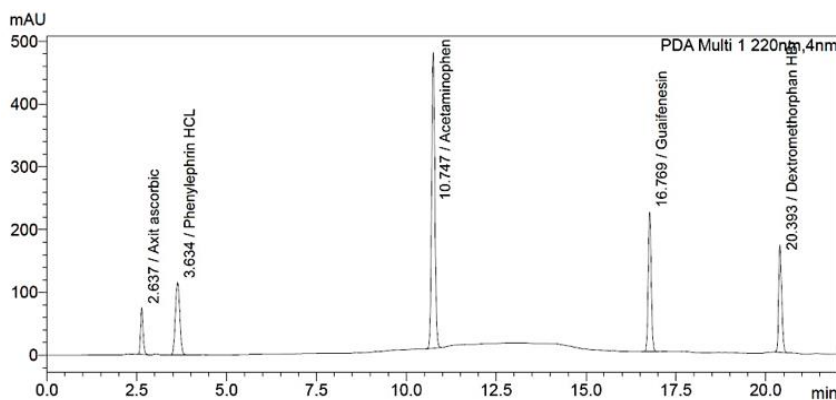
3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc ký

Tiêm lặp 06 lần liên tiếp dung dịch chuẩn để đánh giá tính tương thích hệ thống.

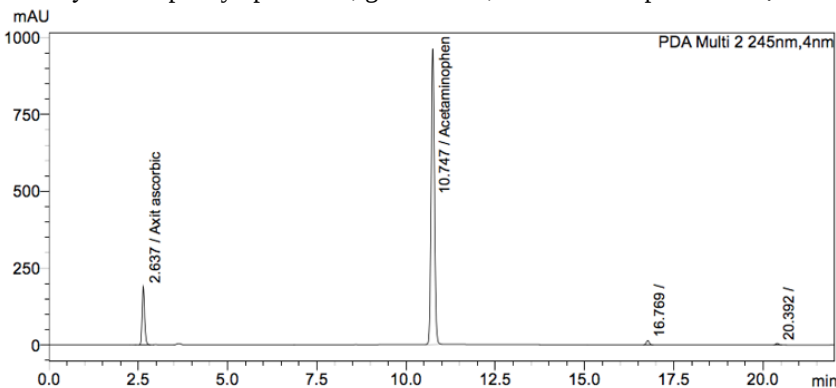
Bảng 6 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng

Tên hoạt chất	Thời gian lưu (n = 6)		Diện tích peak (n = 6)		Hệ số kéo đuôi	Số đĩa lí thuyết	Độ phân giải
	Trung bình (phút)	RSD %	Trung bình (mAU.s)	RSD %			
Axit ascorbic	2,64	0,11	906 376,00	0,17	1,21	5 334,50	
Phenylephrin HCL	3,63	0,08	997 019,50	0,21	1,05	3 576,17	5,15
Acetaminophen	10,74	0,30	6 097 490,50	0,39	1,07	52 956,00	33,25
Guaifenesin	16,77	0,07	1 304 724,67	0,18	1,08	148 199,00	33,51
Dextromethorphan HBr	20,39	0,04	1 005 119,33	0,43	1,22	209 565,83	22,42

(*)n: số lần thí nghiệm, % RSD: % độ lệch chuẩn tương đối



Hình 5 Sắc ký đồ của phenylephrin HCl, guaifenesin, dextromethorphan HBr tại $\lambda_{\max}$ 220 nm



Hình 6 Sắc ký đồ của axit ascorbic, acetaminophen tại $\lambda_{\max}$ 245 nm

Đối với axit ascorbic, acetaminophen, tại bước sóng 220 nm có nhiều đường nền, có thể do ảnh hưởng của tá dược, khi chuyển về bước sóng 245 nm nhiều nền giảm hẳn, sắc ký đồ cho peak đối xứng và tín hiệu đáp ứng cao hơn tại bước sóng 220 nm (Hình 5, 6).

Trên sắc ký đồ thứ tự rửa giải lần lượt là axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin và dextromethorphan HBr. Kết quả cho thấy peak sắc ký các hợp chất đều có % RSD các giá trị thời gian lưu và diện tích peak đều nhỏ hơn 2,0 % và hệ số kéo đuôi của các peak nằm trong khoảng yêu cầu (0,8-1,5) (Bảng 6). Các thông số này đã đáp ứng yêu cầu đặt ra nên hệ thống trên phù hợp cho việc phân tích định tính, định lượng đồng thời năm hợp chất trong thuốc.

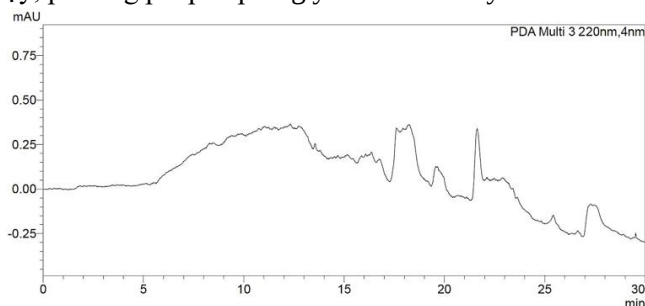
3.2.2 Xác định tính tuyến tính

Pha dãy chuẩn nồng độ các chất axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan HBr tương ứng trong các khoảng (8-56, 16-104, 40-240, 16-80 và 24-146) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Kết quả đánh giá độ tuyến tính của phương pháp được trình bày ở Bảng 7.

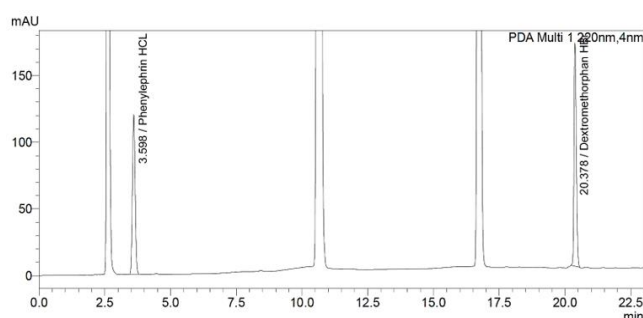
Bảng 7 Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Chất chuẩn	Phương trình hồi quy	R^2
Axit ascorbic	$S = 44\,726.Cx + 686,48$	1,0000
Phenylephrin HCl	$S = 25\,149.Cx - 352,58$	0,9991
Acetaminophen	$S = 60\,614.Cx + 60,606$	0,9998
Guaifenesin	$S = 25\,149.Cx - 352,58$	0,9991
Dextromethorphan HBr	$S = 16\,558.Cx + 838,93$	0,9998

Kết quả khảo sát cho thấy $R^2 \geq 0,99$ nên có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak trong khoảng nồng độ khảo sát. Vì vậy, phương pháp đáp ứng yêu cầu tính tuyến tính.



Hình 7 Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 9 Sắc ký đồ mẫu thử của phenylephrine HCl và dextromethorphan HBr tại $\lambda_{\max}$ 220 nm

Trong sắc ký đồ dung dịch thử tại 220 nm và 245 nm đều xuất hiện peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện các peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các chất trên. Kết quả đã chỉ ra quy trình định lượng đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

Bảng 8 Hàm lượng các hoạt chất trong thuốc viên

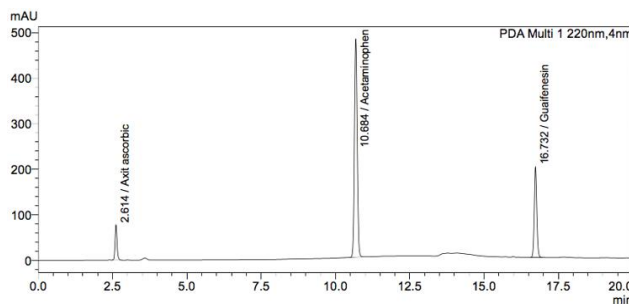
Tên chất	Axit ascorbic	Phenylephrin HCL	Acetaminophen	Guaifenesin	Dextromethorphan HBr
Độ lặp lại (tính trên kết quả ngày 1, n = 6)					
Hàm lượng (mg)	99,81	9,93	500,41	198,86	15,01
Hàm lượng so nhãn (%)	99,81	99,34	100,08	99,43	100,04
% RSD	0,43	0,58	0,78	0,82	0,49
Độ chính xác trung gian (tính trên kết quả ngày 2, n = 12)					
Hàm lượng (mg)	99,91	10,01	500,64	200,26	15,02
Hàm lượng so nhãn (%)	99,91	100,07	100,13	100,13	100,15
% RSD	0,40	0,45	0,32	0,64	0,62

Cả độ lặp lại và độ chính xác trung gian phương pháp đều cho % RSD tất cả các kết quả định lượng không quá 2,0 %. Vậy quy trình đạt độ chính xác cao.

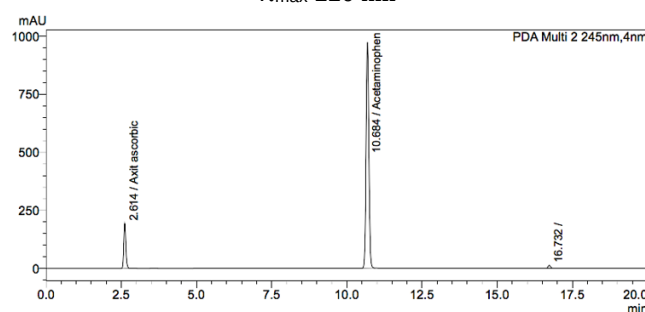
3.2.5 Độ đúng

3.2.3 Độ đặc hiệu

Tiêm vào hệ thống sắc ký các dung dịch mẫu và kết quả tính đặc hiệu được thể hiện ở Hình 7, Hình 8 và Hình 9.



Hình 8 Sắc ký đồ mẫu thử của guaifenesin phát hiện tại $\lambda_{\max}$ 220 nm



Hình 10 Sắc ký đồ mẫu thử của axit ascorbic và acetaminophen tại $\lambda_{\max}$ 245 nm

3.2.4 Độ chính xác

Tiến hành phân tích mẫu thử theo quy trình phân tích đã xây dựng, thực hiện hai ngày phân tích khác nhau, mỗi ngày tiến hành đánh giá sáu mẫu thử khác nhau. Độ lặp lại tính trên kết quả ngày thử nghiệm thứ nhất, độ chính xác trung gian tính trên kết quả hai ngày thực hiện. Độ chính xác phương pháp được thể hiện ở Bảng 8.

Thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử ở ba nồng độ khác nhau (80, 100 và 120) % và xác định lại lượng hoạt chất có trong mẫu và kết quả được trình bày ở Bảng 9.

Bảng 9 Kết quả độ đúng (80, 100 và 120) %

Tên chất	Axit ascorbic	Phenylephrin HCl	Acetaminophen	Guaifenesin	Dextromethorphan HBr
80 %	100,78	99,66	100,49	98,41	99,36
	100,75	99,07	101,01	99,33	101,27
	99,15	99,90	99,46	100,30	99,23
100 %	99,43	99,78	100,19	99,51	100,79
	100,14	99,63	100,41	99,95	100,95
	99,66	99,21	100,67	99,74	100,92
120 %	100,17	98,45	99,95	100,68	100,27
	100,54	100,48	100,21	99,04	98,80
	100,83	99,91	98,76	99,90	99,62
TB	100,16	99,57	100,13	99,65	100,13
% RSD	0,62	0,59	0,67	0,68	0,90

Dựa vào Bảng 9 cho thấy phương pháp đạt yêu cầu có độ phục hồi nằm trong khoảng (98,80-101,27) %, đáp ứng yêu cầu đặt ra (98-102) %.

3.3 Áp dụng quy trình phân tích

Với phương pháp đã xây dựng, nghiên cứu đã áp dụng để định lượng đồng thời axit ascorbic, phenylephrin

HCl, acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan HBr trong thuốc viên và định lượng riêng phần axit ascorbic (vitamin C) và acetaminophen (paracetamol) có trong 6 chế phẩm được dạng viên nang, viên nén và sủi đang được lưu hành trên thị trường và kết quả phân tích ở Bảng 10.

Bảng 10 Kết quả phân tích hàm lượng (%) so với nhãn của một số chế phẩm

STT	Mẫu	Axit ascorbic	Phenylephrin HCl	Acetaminophen	Guaifenesin	Dextromethorphan HBr
1	Ameflu Daytime + C	100,02	99,97	100,15	99,85	100,03
2	Ameflu Day Time		100,01	99,35	99,95	99,99
3	Glotaldol Flu		99,89	99,68	100,10	99,86
4	Deflucold Day		100,12	99,56		99,39
5	Viên sủi vitamin C	98,89				
6	Paracetamol			99,04		

Tỷ lệ hàm lượng trong viên nang của 6 chế phẩm gồm ameflu Daytime + C, ameflu Day Time, glotaldol Flu, deflucold Day, viên sủi vitamin C 1 000 mg và paracetamol 500 mg đều đạt yêu cầu về hàm lượng (%) so với hàm lượng ghi trên nhãn theo tiêu chuẩn Dược điển V.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển một phương pháp phân tích để định lượng đồng thời các hoạt chất axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin và dextromethorphan HBr trong thuốc viên bằng phương pháp HPLC. Chương trình rửa giải gradient được tối ưu như sau: bắt đầu với 97 % đệm pH = 3,0 và 3 % ACN, và ACN được tăng dần lên 5 % trong 4 phút. Sau đó, tiếp tục tăng dần ACN lên 50 % trong 20 phút và chạy đẳng dòng trong 1 phút với tỉ lệ ACN/đệm (50:50, v/v). Cuối cùng, chương trình kết thúc với tỉ lệ ban đầu của ACN/đệm (3:97, v/v) trong 30 phút và phát hiện các hợp chất bằng đầu dò PDA tại 220 nm để xác định

phenylephrin HCl, guaifenesin, và dextromethorphan HBr và tại 245 nm phát hiện hai chất còn lại là axit ascorbic và acetaminophen. Kết quả thu được các hợp chất tách hoàn toàn với độ phân giải cao và thời gian chạy tương đối ngắn là 30 phút, do đó có thể phân tích một số lượng lớn mẫu trong khoảng thời gian ngắn. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ tin cậy cao với khoảng làm việc cho hoạt chất axit ascorbic, phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin và dextromethorphan HBr tương ứng trong các khoảng giá trị lần lượt là (8-56, 16-104, 40-240, 16-80 và 24-146) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Phương pháp đã được thẩm định và đáp ứng các yêu cầu của ICH về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ đúng, độ chính xác. Quy trình đã được áp dụng để kiểm tra các mẫu thuốc lưu hành trên thị trường đều được công bố hàm lượng theo quy định. Vì vậy, kết quả kiểm nghiệm tương đương thì coi như phương pháp này đúng. Áp dụng phương pháp phân tích đề xuất để xác định hàm lượng của viên thuốc ameflu daytime

chứa phenylephrin HCl (100,01 %), acetaminophen (99,35 %), guaifenesin (99,95 %), dextromethorphan HBr (99,99 %) so với mẫu thị trường đã công bố gồm phenylephrin HCl (98,23 %), acetaminophen (99,16 %), guaifenesin (99,28 %), dextromethorphan HBr (100,51 %). Dùng thống kê theo chuẩn Fischer (F) để đánh giá độ chính xác của phương pháp dựa trên hai

dãy dữ liệu của hai phương pháp và xác định $F_{\text{thực nghiệm}}$ của phenylephrin HCl, acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan HBr lần lượt là 1,37; 1,13; 1,12 và 1,31 đều nhỏ hơn $F_{\text{lý thuyết}}$ 5,05 nên độ chính xác của hai phương pháp tương đương nhau với độ tin cậy là 95 %. Vì vậy, kết quả cho thấy các mẫu này đều đạt về tỷ lệ hàm lượng theo yêu cầu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2018). Dược thư Quốc gia Việt Nam. NXB Y học, tr. 49 – 50, tr. 460, tr. 1142
2. Bộ Y tế (2012). *Hóa dược 1*. NXB Giáo dục Việt Nam, tr. 104
3. V.K. Rekulapally and V.U. Rao (2015). A novel stability indicating RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of phenylephrine, acetaminophen, guaifenesin and dextromethorphan in tablet dosage form. *Department of Pharmaceutical Sciences, JNTU, Hyderabad, India Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Bachupally, Hyderabad, India*, vol. 7(7), pp. 329-339
4. R.K. Dagariya, M.B. Barad and U.A. Kalele (2021). Stability indicating method development and validation for simultaneous estimation of dextromethorphan HBr, phenylephrine HCl and chlorpheniramine maleate in their combined syrup dosage form by reverse phase high performance liquid chromatography. *Analytical Development Laboratory, Research and Development Department, Jenburkt Pharmaceuticals Ltd., India*, vol. 8(3), pp. 1-14
5. K. Siddareddy, M.R. Reddy and J. Sreeramulu (2016). Simultaneous estimation of acetaminophen, phenylephrine HCl, guaifenesin and dextromethorphan HBr in reverse phase ultra performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, Vol. 7(6), pp. 2274-2281
6. P.T. Dung and K.X. Hai (2016). Simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine, chlorpheniramine and related compound 4-aminophenol in multi-components pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 43(1), pp. 37-44
7. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm (2010). *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 9-58
8. International Conference on Harmonization (2023). Guideline on validation of analytical procedures. *European Medicines Agency*, pp. 1-33
9. Hội đồng Dược điển (2017). *Dược điển Việt Nam V*. NXB Y học, tr. 129-130
10. The United States Pharmacopoeia 43 (2020). The United States Pharmacopeial Convention, 27th edition, pp. 1-2
11. B. Żumreoglu-Karan (2006). The coordination chemistry of vitamin C: An overview. *Coordination Chemistry Reviews* 250, pp. 2295-2307
12. V. Baliga and K. Kallury (2008). Isocratic separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and dextromethorphan on gemini C18. *Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA*, pp. 1-4
13. Y. Al-Degs et al (2022). Application of different interval variable selectors for quantification of spectrally overlapping pharmaceuticals by multivariate calibration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research* Vol. 9(4), pp. 351-362
14. M.J. Rosenberg et al (2016). Taking the hassle out of hasselbalch. *CourseSource* 3, pp. 1-10



Simultaneous quantification of the compounds ascorbic acid, acetaminophen, phenylephrine HCl, guaifenesin, and dextromethorphan HBr in tablets using high-performance liquid chromatography

Nguyen Thi Thu Thao*, Mai Thanh Nhan

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

*nguyentthao@ntt.edu.vn

Abstract The present study was conducted with two objectives: (1) construction and validation of a simultaneous quantitative process for ascorbic acid, acetaminophen, phenylephrine HCl, guaifenesin, and dextromethorphan HBr in tablet form using the HPLC method, and (2) application to quantify some commercial products containing these compounds. The chromatographic separation of these five pharmaceutical compounds was performed on a C18 reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), using a gradient elution program with mobile phases A (phosphate buffer pH = 3.0) and B (acetonitrile). The research results obtained linear concentration ranges for ascorbic acid, phenylephrine HCl, acetaminophen, guaifenesin, and dextromethorphan HBr as (8-56, 16-104, 40-240, 16-80, and 24-146) μg·mL⁻¹, respectively. The accuracy of the method was determined by recovery rates in the range of (98.80-101.27) %. The repeatability with the relative standard deviation (% RSD) was 0.64 %, which is less than 2.0 %. The proposed method can effectively quantify six types of commercial tablets, all of which meet the content requirements of the Vietnamese Pharmacopoeia V.

Keywords ascorbic acid, acetaminophen, phenylephrine HCl, guaifenesin, dextromethorphan HBr