

XÁC ĐỊNH ĐỒNG THỜI HYDROCHLOROTHIAZIDE VÀ LOSARTAN POTASSIUM TRONG ĐƯỢC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ UV-VIS KẾT HỢP CHEMOMETRICS

Đến tòa soạn 05-03-2021

Trần Thúc Bình, Nguyễn văn Hợp, Hồ Xuân Anh Vũ, Trần Thị Ái Mỹ

Trường đại học Khoa học, Đại học Huế

Nguyễn Thị Quỳnh Trang

Đại học Sài Gòn

SUMMARY

In this paper, Hydrochlorothiazide (HCT) and Losartan potassium (LSP) in tablet were simultaneously determined by UV-Vis spectroscopy and chemometrics without separation. The spectra of standard and sample solutions were measured in the wavelengths from 220 nm to 300 nm at 1.0 nm intervals. Concentrations of HCT and LSP in sample solutions were computed by Classical Least Squares method (CLS). Method validation was proved via recovery and repeatability of the results when analyzing HCT and LSP in the sample of Splozarsin Plus tablet and comparing the mean results of their contents in the sample with that by HPLC method. The built process for analyzing tablet sample containing HCT and LSP was not only simple to implement but also reduced the cost of analysis compared to the standard method of high-performance liquid chromatography (HPLC).

Từ khóa: Hydrochlorothiazide, Losartan potassium, Simultaneous spectrophotometry, Classical Least Squares method.

1. MỞ ĐẦU

Các phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis kết hợp chemometrics sử dụng dữ liệu phổ toàn phần kết hợp các thuật toán, thống kê và sử dụng máy tính đã được nghiên cứu để xác định đồng thời các cấu tử trong các hỗn hợp có phổ xen phủ nhau. Ưu điểm nổi bật của các phương pháp này là quy trình phân tích đơn giản, qua ít công đoạn, không cần tách chiết nên tiết kiệm được thời gian, hóa chất. Mặt khác, do sử dụng toàn bộ dữ liệu phổ để tính toán kết hợp với các thuật toán nên làm tăng độ chính xác của phép xác định. Các thuật toán ở đây liên quan đến các phương pháp xử lý số liệu như phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển CLS, phương pháp lọc Kalman, phương pháp hồi quy cấu tử chính (PCR), phương pháp mạng nơtron nhân tạo (ANN), ... Một số tác giả đã nghiên cứu ứng dụng các phương pháp này để phân tích các đối tượng thực tế [1-6].

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu xác định đồng thời Hydrochlorothiazide (HCT) and Losartan potassium (LSP) trong thuốc viên nén Splozarsin Plus và các thuốc chứa hai thành phần HCT và LSP. HCT với công thức phân tử $C_7H_8ClN_3O_4S_2$, $M = 297,7$ g/mol là một loại thuốc lợi tiểu giúp cơ thể đào thải bớt muối và nước ra khỏi cơ thể từ đó cải thiện một số bệnh lý về thận như thận ứ nước, suy thận hay chứng thận hư ở người bệnh. Ngoài ra, HCT còn được sử dụng hiệu quả trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh tăng huyết áp, bệnh gan, nhồi máu cơ tim, suy tim hay đột quỵ ở các bệnh nhân gặp vấn đề về tim mạch. LSP với công thức phân tử $(C_{22}H_{22}ClKN_6O)$, $M = 461,0$ g/mol, thuộc nhóm thuốc ức chế thụ thể angiotensin, hoạt động bằng cách giãn các mạch máu để máu có thể lưu thông dễ dàng hơn. Thuốc được sử dụng để điều trị tăng huyết áp và giúp bảo vệ thận khỏi tổn thương do bệnh tiểu đường. Thuốc cũng được sử dụng

để giảm nguy cơ đột quỵ ở bệnh nhân tăng huyết áp và tim phì đại. Điều trị sớm bệnh tăng huyết áp giúp ngăn ngừa đột quỵ, đau tim và các vấn đề về thận. Để phân tích các thành phần này, có thể sử dụng riêng lẻ hay kết hợp các phương pháp phân tích khác nhau như phương pháp quang phổ [7-9], phương pháp HPLC [10-12]. Các quy trình phân tích riêng lẻ đòi hỏi nhiều thời gian, phức tạp, phương pháp HPLC có ưu điểm nổi bật nhưng giá thành cao. Theo [7-9] phổ hấp thụ của HCT và LSP xen phủ nhau nên chúng tôi chọn phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển sử dụng phổ toàn phần [1] để xác định đồng thời chúng trong thuốc viên nén. Phương pháp đề xuất mở ra khả năng phân tích nhanh, rẻ tiền và có thể được áp dụng trong thực tiễn phân tích và kiểm nghiệm được.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

2.1.1. Thiết bị

(1) Máy quang phổ UV - Vis hiệu Cary 60, hãng Agilent của phòng thí nghiệm Hóa học Ứng dụng, Khoa Hóa, Đại học Khoa Học - Đại học Huế, có khả năng quét phổ nhanh trong khoảng bước sóng từ 190 – 990 nm, kết nối với máy tính và phần mềm Cary WinUV lưu trữ số liệu phổ ở file dưới dạng bảng tính excel.

(2) Các thiết bị và dụng cụ khác: Cân phân tích hiệu Precisa XB 2204 độ chính xác 0,0001 g; Máy cất nước hai lần bằng thạch anh, hiệu Fistreem Cyclon và Aquatron; Micropipet 100 μ L, 1000 μ L của hãng HTL; Các dụng cụ thủy tinh: pipet, bình định mức, cốc, bình tam giác nút nhám, đĩa thủy tinh, giấy lọc, phễu thủy tinh,...

2.1.2. Hóa chất

- Chất chuẩn HCT công thức phân tử $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ có hàm lượng 99,8% từ Viện kiểm thuốc Trung ương, chuẩn được điển Việt Nam, số SKS: C0219308.02.

- Chất chuẩn LSP công thức phân tử $C_{22}H_{22}ClKN_6O$ hàm lượng 99,9% từ Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh, chuẩn được điển Việt Nam, số lô QT 166090520.

- Pha chế các dung dịch chuẩn gốc HCT, LSP: Dung dịch chuẩn gốc HCT 50 μ g/mL: cân chính xác 12,5 mg chất chuẩn HCT, thêm 150 mL nước cất, rung siêu âm 15 phút, định mức thành 250 mL.

Dung dịch làm việc HCT 12,5 μ g/mL: lấy 25 mL dung dịch gốc HCT 50 μ g/mL pha loãng bằng nước cất đến 100 mL.

Dung dịch chuẩn gốc LSP 50 μ g/mL: cân 12,5 mg chất chuẩn LSP, hòa tan trong nước, định mức bằng nước cất thành 250 mL. Đây cũng là dung dịch làm việc.

2.2. Phương pháp phân tích

Để xác định đồng thời HCT và LSP trong các dung dịch hỗn hợp chúng tôi sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển sử dụng phổ toàn phần [1] và chương trình tính được viết trên Microsoft Excel 2016 và Visual Basic for Applications (VBA). Chương trình này được đặt tên là CLS-Excel.

Quy trình đo và tính nồng độ HCT và LSP theo các bước như sau:

- Bước 1: Chuẩn bị các dung dịch chuẩn của mỗi cấu tử cần xác định và các dung dịch hỗn hợp của chúng.

- Bước 2: Quét phổ các dung dịch trong khoảng bước sóng thích hợp được file đuôi csv dưới dạng bảng tính excel.

- Bước 3: Chạy chương trình CLS-Excel [5] dùng số liệu từ file excel trên để tính toán nồng độ các cấu tử trong dung dịch hỗn hợp và sai số tương đối của chúng.

2.3. Các đại lượng thống kê

2.3.1. Sai số tương đối

Sai số tương đối giữa nồng độ xác định được và nồng độ pha chế (RE %) được tính:

$$RE(\%) = (C - C_0) \cdot 100 / C_0 \quad (1)$$

Trong đó C là nồng độ xác định được, (μ g/mL) và C_0 là nồng độ của dung dịch chuẩn đã biết, (μ g/mL).

2.3.2. Độ lặp lại

Độ lặp lại được đánh giá qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD%:

$$RSD(\%) = SD \cdot 100 / C_{tb} \quad (2)$$

Ở đây SD là độ lệch chuẩn và C_{tb} là nồng độ trung bình sau n lần đo (μ g/mL). Cho việc kiểm soát chất lượng nội bộ phòng thí nghiệm, độ lặp lại của phương pháp đạt được khi các giá trị RSD% nhận được nhỏ hơn $1/2RSD_{Horwitz}$ [13, 14]

$$RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0.5 \cdot \lg C)} \quad (3)$$

với C nồng độ được biểu diễn ở dạng phân số. (Ví dụ: $C = 5 \mu$ g/mL = $5 \cdot 10^{-6}$)

2.3.3. Độ đúng của phương pháp

Kiểm chứng độ đúng của phương pháp thông qua xác định độ thu hồi và so sánh giá trị trung bình của kết quả phân tích mẫu của phương

pháp nghiên cứu với phương pháp tiêu chuẩn HPLC.

a. Độ thu hồi

Độ thu hồi của phương pháp được tính dựa trên mẫu thêm chuẩn theo công thức sau:

$$\text{Rev}(\%) = (C_2 - C_1) \cdot 100 / C_t \quad (5)$$

trong đó C_2 ($\mu\text{g/mL}$) là nồng độ xác định được của dung dịch mẫu sau khi thêm chuẩn, C_1 ($\mu\text{g/mL}$) là nồng độ xác định được của dung dịch mẫu trước khi thêm chuẩn, C_t ($\mu\text{g/mL}$) là nồng độ thêm chuẩn [15].

b. So sánh giá trị trung bình của kết quả phân tích mẫu của phương pháp nghiên cứu với phương pháp tiêu chuẩn

Theo [16], để xác định độ đúng của phương pháp, có thể phân tích lặp lại cùng một mẫu theo phương pháp nghiên cứu và phương pháp tiêu chuẩn và so sánh 2 giá trị trung bình mẫu của hai phương pháp bằng cách sử dụng chuẩn student.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{\sqrt{(s_A^2/n_A) + (s_B^2/n_B)}}$$

Trong đó: t_{exp} : giá trị student thực nghiệm.

$\bar{X}_A$, $\bar{X}_B$: giá trị trung bình của phương pháp A và B; n_A , n_B : số lần đo lặp lại của 2 phương pháp A và B; s_A^2 , s_B^2 : phương sai của hai phương pháp.

Nếu phương sai của hai phương pháp đồng nhất ($F_{\text{exp}} < F_{(\alpha, n_1-1, n_2-1)}$) thì tính phương sai chung s_{pool} và t_{exp} được tính theo biểu thức:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{s_{\text{pool}} \sqrt{(1/n_A) + (1/n_B)}}$$

Với s_{pool} được tính:

$$s_{\text{pool}} = \sqrt{\frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{n_A + n_B - 2}}$$

Trong đó $n_A + n_B - 2 = v$, với v là số bậc tự do chung của hai phương pháp.

Nếu phương sai hai phương pháp không đồng nhất thì số bậc tự do chung được tính theo biểu thức với giá trị v được làm tròn số:

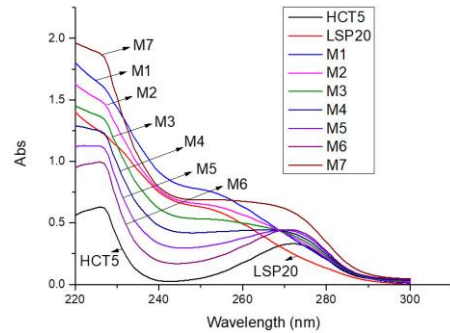
$$v = \frac{[(s_A^2/n_A) + (s_B^2/n_B)]^2}{[(s_A^2/n_A)^2/(n_A + 1)] + [(s_B^2/n_B)^2/(n_B + 1)]}$$

Cuối cùng so sánh giá trị t_{exp} với giá trị $t_{(\alpha, v)}$. Nếu $t_{\text{exp}} < t_{(\alpha, v)}$ thì giá trị trung bình của hai phương pháp khác nhau không có ý nghĩa.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp phân tích trên mẫu thử phòng thí nghiệm

Từ các dung dịch chuẩn làm việc của HCT 12,5 $\mu\text{g/mL}$ và LSP 50 $\mu\text{g/mL}$, pha các dung dịch trong bình định mức 25 mL: Các dung dịch chuẩn của HCT và LSP nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$ 20 $\mu\text{g/mL}$ tương ứng và các dung dịch hỗn hợp có nồng độ của HCT và LSP trong dung dịch theo các tỷ lệ nồng độ khác nhau. Mỗi dung dịch chuẩn và hỗn hợp được pha chế và đo 3 lần. Tiến hành quét phổ các dung dịch trong khoảng bước sóng từ 220 – 300 nm, bước đo 1,0 nm. Tính nồng độ của sai số nồng độ của HCT và LSP trong các dung dịch hỗn hợp theo chương trình CLS - Excel, và tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) tương ứng của các kết quả phân tích. Phổ hấp thụ của các dung dịch được biểu diễn ở hình 1. Kết quả phân tích HCT và LSP trong các dung dịch hỗn hợp pha chế ở phòng thí nghiệm cùng các đại lượng thống kê được trình bày ở bảng 1.



Hình 1. Phổ hấp thụ UV của các dung dịch chuẩn HCT, LSP và các dung dịch hỗn hợp của chúng ở các tỉ lệ nồng độ khác nhau:

HCT5: Dung dịch chuẩn HCT 5 $\mu\text{g/mL}$;

LSP20: Dung dịch chuẩn LSP 20 $\mu\text{g/mL}$

M1: Dung dịch chứa HCT 1 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 24 $\mu\text{g/mL}$; M2: Dung dịch chứa HCT 2 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 20 $\mu\text{g/mL}$;

M3: Dung dịch chứa HCT 3 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 16 $\mu\text{g/mL}$; M4: Dung dịch chứa HCT 4 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 12 $\mu\text{g/mL}$;

M5: Dung dịch chứa HCT 5 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 8 $\mu\text{g/mL}$; M6: Dung dịch chứa HCT 6 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 4 $\mu\text{g/mL}$;

M7: Dung dịch chứa HCT 5 $\mu\text{g/mL}$ + LSP 20 $\mu\text{g/mL}$;

Bảng 1. Kết quả phân tích HCT và LSP trong hỗn hợp phòng thí nghiệm theo phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển CLS cùng các đại lượng thống kê

Ký hiệu mẫu	Tỉ lệ nồng độ (theo $\mu\text{g/mL}$) HCT/LSP	Lần đo	HCT			LSP		
			C_{HCT} ($\mu\text{g/mL}$)	RE (%)	Đại lượng thống kê	C_{LSP} ($\mu\text{g/mL}$)	RE (%)	Đại lượng thống kê
M1	1:24	1	1,002	0,20	$C_{\text{tb}} = 0,999$	24,197	0,82	$C_{\text{tb}} = 24,214$
		2	0,996	-0,40	$\text{RSD}(\%) = 0,30$	24,227	0,95	$\text{RSD}(\%) = 0,06$
		3	0,999	-0,10	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 8,00$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -0,10$	24,218	0,91	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 4,96$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = 0,89$
M2	2:20	1	1,980	-1,00	$C_{\text{tb}} = 1,978$	20,105	0,53	$C_{\text{tb}} = 20,108$
		2	1,980	-1,00	$\text{RSD}(\%) = 0,18$	20,101	0,50	$\text{RSD}(\%) = 0,05$
		3	1,974	-1,30	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 7,21$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -1,10$	20,119	0,60	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 5,10$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = 0,54$
M3	3:16	1	2,981	-0,63	$C_{\text{tb}} = 2,976$	15,958	-0,26	$C_{\text{tb}} = 15,968$
		2	2,973	-0,90	$\text{RSD}(\%) = 0,16$	15,971	-0,18	$\text{RSD}(\%) = 0,06$
		3	2,973	-0,90	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 6,78$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -0,81$	15,975	-0,16	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 5,27$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -0,18$
M4	4:12	1	3,973	-0,68	$C_{\text{tb}} = 3,967$	12,064	0,53	$C_{\text{tb}} = 12,067$
		2	3,964	-0,90	$\text{RSD}(\%) = 0,14$	12,068	0,57	$\text{RSD}(\%) = 0,03$
		3	3,963	-0,92	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 6,49$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -0,83$	12,070	0,58	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 5,50$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = 0,56$
M5	5:8	1	5,004	0,08	$C_{\text{tb}} = 4,993$	8,017	0,21	$C_{\text{tb}} = 8,026$
		2	4,987	-0,26	$\text{RSD}(\%) = 0,20$	8,033	0,41	$\text{RSD}(\%) = 0,10$
		3	4,987	-0,26	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 6,28$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -0,15$	8,029	0,36	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 5,85$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = 0,33$
M6	6:4	1	5,919	-1,35	$C_{\text{tb}} = 5,906$	4,063	1,57	$C_{\text{tb}} = 4,071$
		2	5,895	-1,75	$\text{RSD}(\%) = 0,21$	4,074	1,85	$\text{RSD}(\%) = 0,18$
		3	5,903	-1,62	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 6,11$ $\text{RE}(\%) = -1,57$	4,077	1,93	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 6,49$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = 1,78$
M7	5:20	1	4,983	-0,34	$C_{\text{tb}} = 4,974$	20,187	0,93	$C_{\text{tb}} = 20,200$
		2	4,967	-0,66	$\text{RSD}(\%) = 0,16$	20,207	1,04	$\text{RSD}(\%) = 0,05$
		3	4,973	-0,54	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 6,28$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = -0,51$	20,205	1,03	$1/2\text{RSD}_{\text{H}} = 5,10$ $\text{RE}_{\text{tb}}(\%) = 1,00$

Bảng 1 cho thấy với các tỉ lệ nồng độ khác nhau, các sai số của các nồng độ của HCT và LSP xác định được theo phương pháp CLS đều nằm trong khoảng $-1,57 \div 1,78\%$, đồng thời các giá trị RSD% đều rất nhỏ ($RSD\%_{\max} = 0,30$) và tất cả đều nhỏ hơn $1/2RSD_H$. Do đó phương pháp đảm bảo độ đúng và độ lặp lại khi phân tích các dung dịch mẫu hỗn hợp phòng thí nghiệm với các tỉ lệ nồng độ khác nhau.

3.2. Xây dựng quy trình phân tích mẫu thực tế

3.2.1. Xử lý mẫu

Cân 20 viên thuốc, tính khối lượng trung bình của mỗi viên (M), nghiền thành bột mịn và trộn đều. Cân 1 khối lượng bột thuốc bằng khối lượng trung bình của 1 viên trên cân phân tích, cho vào cốc 250 mL, thêm khoảng 150 mL nước cất 2 lần, sau đó cho vào máy siêu âm rung 15 phút, lọc, rửa qua giấy lọc băng xanh, toàn bộ nước lọc và nước rửa cho vào bình định mức 250 mL, định mức bằng nước cất đến vạch mức (dung dịch 1). Lấy 10 mL dung dịch 1 cho vào bình định mức 100 mL và thêm nước cất đến vạch mức (dung dịch 2), lắc đều ta được dung dịch mẫu.

Để đối chiếu kết quả, lấy 20 viên thuốc (cùng số lô, NSX và HSD) gửi đến Trung tâm kiểm nghiệm thuốc, thực phẩm, mỹ phẩm Thừa Thiên Huế phân tích.

3.2.2. Tính toán hàm lượng các chất

Hàm lượng các hoạt chất trong một viên:

$$\text{mg/viên} = C_m \cdot 100 \cdot (250/10) \cdot (M/m) \cdot (1/1000) = 2,5 \cdot C_m \cdot (M/m) \quad (1)$$

Trong đó : C_m ($\mu\text{g/mL}$): nồng độ của từng hoạt chất xác định được trong dung dịch mẫu.

m: khối lượng mẫu được cân đem phân tích (mg)

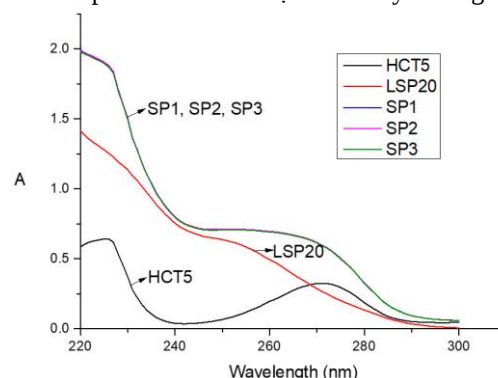
M: khối lượng trung bình của một viên thuốc (m).

3.2.3. Định lượng đồng thời Hydrochlorothiazide và Losartan potassium trong mẫu thuốc

Chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng của HCT và LSP trong thuốc viên nén Splozarsin Plus được sản xuất bởi Công ty TNHH DP SHINPOONG DAEWOO, địa chỉ số 13,

đường 9A KCN Biên Hòa 2, Đồng Nai, Việt Nam với hàm lượng ghi trên nhãn là 50 mg LSP và 12,5 mg HCT trên một viên. Số lô sản xuất: 9003, ngày sản xuất: 05/06/2019, hạn sử dụng: 05/06/2021. Khối lượng trung bình của một viên là: $M = 253,4$ mg. Xử lý mẫu như quy trình đã trình bày ở 3.2.1. Cân chính xác 253,4 mg bột thuốc rồi tiến hành xử lý mẫu thành dung dịch mẫu. Quét phổ của dung dịch mẫu trong khoảng bước sóng từ 220 – 300 nm, mỗi nm ghi một điểm. Dùng chương trình CLS-Excel để xác định nồng độ của HCT và LSP trong các dung dịch mẫu. Tính hàm lượng của HCT và LSP trong thuốc Splozarsin Plus theo công thức (1).

Phổ hấp thụ của các dung dịch mẫu thuốc Splozarsin Plus ở hình 2. Kết quả phân tích thuốc Splozarsin Plus được trình bày ở bảng 2.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV của các dung dịch chuẩn HCT, LSP và các dung dịch mẫu thuốc Splozarsin Plus

HCT5: Dung dịch chuẩn HCT 5 $\mu\text{g/mL}$;

LSP20: Dung dịch chuẩn LSP 20 $\mu\text{g/mL}$ SP1, SP2, SP3: các dung dịch mẫu thuốc Splozarsin Plus

Bảng 2. Nồng độ của HCT và LSP trong các dung dịch mẫu và hàm lượng của chúng trong thuốc Splozarsin Plus

Mẫu	HCT		LSP	
	C_{HCT} ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng (mg/viên)	C_{LSP} ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng (mg/viên)
SP1	4,966	12,42	20,033	50,08
SP2	4,963	12,41	20,014	50,04
SP3	4,941	12,35	19,914	49,79
Kết quả	$C_{tb} = 4,957$ RSD% = 0,28	$H_{tb} = 12,39$ RSD% = 0,31	$C_{tb} = 19,987$ RSD% = 0,32	$H_{tb} = 49,97$ RSD% = 0,31

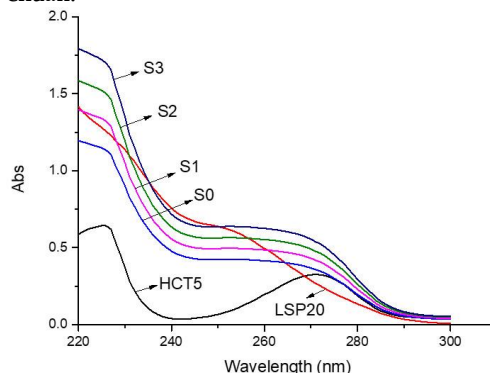
Kết quả thu được khi định lượng đồng thời HCT và LSP trong thuốc viên nén Splozarsin Plus cho thấy phương pháp phân tích có độ lặp lại cao với cả hai thành phần ($RSD\% = 0,31$). Hàm lượng của mỗi chất trong thuốc viên nén Splozarsin Plus: HCT: $12,39 \text{ mg} \pm 0,09 \text{ mg}$, LSP: $49,97 \pm 0,39 \text{ mg}$. Kết quả này phù hợp với hàm lượng các thành phần thuốc ghi trên nhãn, đồng thời phù hợp tiêu chuẩn chất lượng của Bộ Y tế cho phép hàm lượng của các thành phần trong loại viên nén này: HCT: $12,50 \text{ mg} \pm 5\%$ ($13,13 \text{ mg} \div 11,88 \text{ mg}$), LSP: $50,00 \text{ mg} \pm 5\%$ ($52,5 \text{ mg} \div 47,5 \text{ mg}$).

3.3. Kiểm chứng độ đúng của quy trình phân tích

3.3.1. Độ thu hồi

Cân 4 lượng bột mẫu bằng 3/5 khối lượng trung bình của một viên thuốc. Mẫu thử nhất không thêm chuẩn, các mẫu còn lại thêm chuẩn đồng thời cả HCT và LSP với lượng thêm chuẩn tăng dần. Xử lý các mẫu theo quy trình được mô tả ở phần 3.2.1 được dung dịch mẫu chưa thêm chuẩn và 3 dung dịch mẫu thêm chuẩn. Ghi phổ của các dung dịch chuẩn HCT $5 \text{ } \mu\text{g/mL}$, LSP $20 \text{ } \mu\text{g/mL}$, phổ của dung dịch mẫu khi chưa thêm chuẩn S0 và các dung dịch mẫu sau khi thêm chuẩn S1, S2, S3. Sử dụng chương trình CLS-Excel để tính toán nồng độ của HCT và LSP trong các dung dịch mẫu và dung dịch mẫu đã được thêm chuẩn. Phổ của các dung dịch chuẩn và mẫu phân tích thêm

chuẩn được biểu diễn ở hình 3. Nồng độ thêm chuẩn, nồng độ tính toán được của mẫu chưa và có thêm chuẩn được biểu diễn ở bảng 3. Áp dụng công thức (5) tính được độ thu hồi của nồng độ hai chất trong các trường hợp thêm chuẩn.



Hình 4. Phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn, dung dịch mẫu và các dung dịch mẫu thêm chuẩn

HCT5: Dung dịch chuẩn HCT $5 \text{ } \mu\text{g/mL}$;

LSP20: dung dịch chuẩn LSP $20 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

S0: mẫu chưa thêm chuẩn;

S1: mẫu thêm chuẩn lần 1 ($HCT_{ad} = 0,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $LSP_{ad} = 2,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$);

S2: mẫu thêm chuẩn lần 2 ($HCT_{ad} = 1,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $LSP_{ad} = 4,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$);

S3: mẫu thêm chuẩn lần 3 ($HCT_{ad} = 1,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $LSP_{ad} = 6,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$);

Bảng 3. Độ thu hồi của phương pháp cho HCT và LSP trong mẫu thuốc Splozarsin Plus

Mẫu lặp lại	HCT				LSP			
	$C_{thêm}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{đo}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Rev (%)	RSD (%)	$C_{thêm}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{đo}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Rev (%)	RSD (%)
S01	0	3,001	-	0,152	0	11,966	-	0,086
S02		3,007	-			11,986	-	
S03		3,010	-			11,972	-	
S11	0,500	3,508	101,40	0,049	2,000	13,953	99,35	0,018
S12		3,505	99,60			13,956	98,50	
S13		3,505	99,00			13,958	99,30	
S21	1,000	3,990	98,90	0,100	4,000	15,873	97,68	0,019

(Ghi chú: Số con số thập phân được lấy để thể hiện kết quả tính toán)

S22		3,998	99,11			15,867	97,03	
S23		3,994	98,40			15,871	97,48	
S31	1,500	4,509	100,53	0,044	6,000	17,958	99,87	0,031
S32		4,513	100,40			17,965	99,65	
S33		4,511	100,06			17,954	99,70	

Từ kết quả tính độ thu hồi Rev%, nhận thấy độ thu hồi của phương pháp 98,40-101,40% đối với HCT và từ 97,03-99,87% đối với LSP.

Điều đó khẳng định phương pháp phân tích có độ đúng tốt. Độ lặp lại của các kết quả thí

nghiệm khi xác định độ thu hồi cũng rất tốt, thể hiện qua các giá trị $RSD\% \leq 0,152$.

3.3.2. So sánh kết quả phân tích của phương pháp nghiên cứu với phương pháp HPLC

Để tiếp tục đánh giá khách quan độ đúng của phương pháp đang nghiên cứu, chúng tôi so sánh kết quả phân tích hàm lượng các hoạt chất trong mẫu thuốc Splozarsin Plus của phương

pháp nghiên cứu với kết quả phân tích cùng mẫu theo phương pháp tiêu chuẩn HPLC do Trung tâm kiểm nghiệm thuốc, thực phẩm, mỹ phẩm Thừa Thiên Huế thực hiện. So sánh kết quả phân tích của hai phương pháp được đánh giá bằng thống kê [15]. Kết quả xử lý số liệu bằng thống kê được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. So sánh kết quả phân tích mẫu thuốc Splozarsin Plus theo phương pháp CLS và phương pháp HPLC

Hàm lượng của HCT trong thuốc được xác định theo hai phương pháp (mg/viên)		Hàm lượng của LSP trong thuốc được xác định theo hai phương pháp (mg/viên)	
<i>Phương pháp CLS</i>	<i>Phương pháp HPLC</i>	<i>Phương pháp CLS</i>	<i>Phương pháp HPLC</i>
12,42	12,45	50,08	49,93
12,41	12,38	50,04	50,30
12,35	12,42	49,79	50,45
H ₁ = 12,39 SD ₁ = 0,034	H ₂ = 12,42 SD ₂ = 0,035	H ₁ = 49,97 SD ₁ = 0,157	H ₂ = 50,23 SD ₂ = 0,268
F _{tính} = 1,162		F _{tính} = 2,900	
F _{lt} (0,05; 2; 2) = 39,00		F _{lt} (0,05; 2; 2) = 39,00	
SD _{pool} = 0,0365		SD _{pool} = 0,2195	
t _{tính} = 0,783		t _{tính} = 1,432	
t _{lt} (0,05; 4) = 2,776		t _{lt} (0,05; 4) = 2,776	

Các kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy các giá trị $t_{\text{tính}}$ đều nhỏ hơn t_{lt} , do đó kết quả phân tích 2 hoạt chất HCT và LSP trong thuốc Splozarsin Plus theo phương pháp nghiên cứu và phương pháp HPLC là đồng nhất về mặt thống kê với mức ý nghĩa $\alpha = 0.05$. Các kết quả này cho phép khẳng định phương pháp đạt được độ đúng tốt. Mặt khác các giá trị $F_{\text{tính}}$ đều nhỏ hơn F_{lt} ở mức $\alpha = 0.05$ nên phương pháp phân tích và phương pháp tiêu chuẩn HPLC có độ chính xác tương đương nhau.

4. KẾT LUẬN

Với mục tiêu đặt ra là nghiên cứu áp dụng phương pháp trắc quang dùng phổ toàn phần kết hợp chemometrics sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển CLS để xác định đồng thời Hydrochlorothiazide (HCT) and Losartan Potassium (LSP) trong thuốc viên nén, chúng tôi đã đạt được những kết quả như sau:

1. Đã nghiên cứu và lựa chọn các điều kiện thích hợp để xác định đồng thời HCT và LSP trong các dung dịch hỗn hợp phòng thí nghiệm chứa hai chất HCT và LSP với các tỉ lệ nồng độ khác nhau của chúng bằng phương pháp

CLS, cụ thể là: Chọn nước làm dung môi hòa tan; Khoảng bước sóng thích hợp để quét phổ: từ 220 nm đến 300 nm với bước đo 1.0 nm. Với các tỉ lệ nồng độ khảo sát khác nhau của HCT và LSP trong dung dịch hỗn hợp của chúng, các sai số của phương pháp nằm trong khoảng $-1,57 \div 1,78\%$ với HCT và LSP, đồng thời các giá trị $RSD\%$ đều rất nhỏ ($\leq 0,30$). Do đó phương pháp đảm bảo độ đúng và độ lặp lại.

2. Đã xây dựng được quy trình phân tích xác định đồng thời HCT và LSP trong thuốc viên nén theo phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử dùng phổ toàn phần kết hợp phương pháp CLS và đã áp dụng thành công quy trình phân tích để xác định đồng thời HCT và LSP trong thuốc viên Splozarsin Plus.

3. Đã chứng minh độ tin cậy của quy trình phân tích xác định đồng thời HCT và LSP trong mẫu thuốc viên Splozarsin Plus. Kết quả phân tích theo quy trình có độ lặp lại rất tốt với $RSD\%$ nhỏ (≤ 0.30). Độ thu hồi thu được đối với cả hai chất nằm trong khoảng 97,03% đến 101,40%. Kết quả hàm lượng của HCT và LSP trong thuốc Splozarsin Plus được phân tích

bằng phương pháp CLS đồng nhất với kết quả phân tích của phương pháp HPLC ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tran Thuc Binh, Nguyen Thi Quynh Trang, Vo Thi Kim Truc, Ngo Van Tu. Simultaneous spectrophotometric determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical product by least-square method using full spectra. *Conference proceeding, The 5th Analytica Vietnam Conference 2017*, pp. 14-21, 2017.
2. H. R. Pouretedal*, B. Shafiee , M. H. Keshavarz. Simultaneous determination of trace amounts of thorium and zirconium using spectrophotometric partial least-squares calibration method. *Bulgarian Chemical Communications*, Vol. 41, No. 3, pp. 230–235, 2009.
3. Severino Grangeiro Jr., Miracy M. Albuquerque e Davi P. Santana, Maria Fernanda Pimentel e Reniere H. da Silva, Simone S. Simões*. Simultaneous spectrophotometric determination of lamivudine and zidovudine in fixed dose combinations using multivariate calibration. *Química. Nova*, Vol. 34, No. 5, pp. 859-863, 2011.
4. Radhika Bhaskar , Rahul Bhaskar *, Mahendra K Sagar , Vipin Saini and KM Bhat. UV-Spectrophotometric-Assisted Chemometric Methods for the Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride and Gliclazide in Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 3:4, 2012, <http://dx.doi.org/10.4172/2153-2435.1000158>.
5. Nguyen Thi Quynh Trang, Nguyen Van Hop, Nguyen Dang Giang Chau and Thuc Binh Tran*. “Simultaneous Determination of Amlodipine, Hydrochlorothiazide and Valsartan in Pharmaceutical Products by a Combination of Full Spectrum Measurement and Kalman Filter Algorithm”. *Advances in Materials Science and Engineering*, Vol. 2019, Article ID 5719651, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/5719651>.
6. Hany W. Darwish* , Ahmed H. Bakheit , Ali S. Abdelhameed and Ramzi A. Mothana. Application of Classical Least Squares, Principal Component Regression and Partial Least Squares Methods for Simultaneous Spectrophotometric Determination of Rutin and Ascorbic Acid in Their Combined Dosage Form. *Life Science Journal*;10(4), 2013.

7. Rubén M. Maggio & Patricia M. Castellano & Teodoro S. Kaufman. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391:2949–2955, 2008 DOI 10.1007/s00216-008-2180-z
8. M. B. Sankar et al. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Losartan Potassium and Hydrochlorothiazide in Tablets, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 65(2): 167-170.
9. Kareti Srinivasa Rao, Minakshi Panda, Nargesh Kumar Keshar. Spectrophotometric methods for the simultaneous estimation of losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablet dosage forms. *Chronicles of Young Scientists*, 2011, Vol. 2, Issue 3, 155-160.
10. Nidhal M. Sher Mohammed *, Hasan R. Abdo and Hassan M. Hassan. Method development and validation of simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 10(1): 227-231, 2019.
11. Savaj Bhadresh V*, Hasumati A. Raj and Sojitra Rajanit. Analytical Techniques for Determination of Hydrochlorothiazide and its Combinations: A Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis*. Vol. 5 Issue 2, pp 23-35, 2015.
12. Topalli Srinivasu* and Mukthinuthalapati Mathrusri Annapurna. A new stability indicating RP-HPLC method for the analysis of Losartan and Hydrochlorothiazide Tablets. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 10 Issue 2, pp 798-802, 2017.
13. M. Thompson and P. J. Lowthian, “A Horwitz-like function describes precision in a proficiency test,” *Analyst*, vol. 120, no. 2, pp. 271-272, 1995.
14. AOAC International, AOAC ® *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 2012.
15. R. G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2003.
16. David Harvey, *Morden analytical chemistry*, 1st ed McGraw Hill, pp 80-93, 2000.