NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI FT-IR ĐỂ PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG AMOXICILLIN TRONG THUỐC

RESEARCH AND APPLICATION OF FT-IR SPECTROPHOTOMETRY FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF AMOXICILLIN IN DRUGS

Nguyễn Phi Hùng[1]*, Nguyễn Thị Diệu Hằng[2]

[1]Trung tâm kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm tỉnh Quảng Ngãi, Việt Nam
[2]Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: hung1980qng@gmail.com

(Nhận bài / Received: 24/4/2023; Sửa bài / Revised: 05/8/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 23/8/2023)

Tóm tắt - Nghiên cứu này mô tả việc ứng dụng phương pháp phân tích mới để định lượng Amoxicillin trong viên nang, bằng cách sử dụng phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR). Đây là phương pháp nhanh, tiết kiệm và thân thiện với môi trường vì không sử dụng dung môi hữu cơ, nên được xem là một giải pháp "xanh" trong phân tích định lượng thuốc so với các phương pháp hóa phân tích thông thường khác. Phương pháp đã được kiểm chứng theo hướng dẫn của Hiệp hội những nhà hóa học phân tích (Association of Official Analytical Collaboration - AOAC) và Dược điển Việt Nam 5. Phương pháp dựa trên phép đo độ hấp thụ trong dải 1815 đến 1730 cm^{-1}, tương ứng với nhóm cacbonyl trong phân tử Amoxicillin. Kết quả thu được như sau: độ tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 1,0 đến 10,0 mg/ viên nén 200mg, hệ số tương quan tuyến tính r^2= 0,9992, có độ chính xác và độ ổn định cao, tỷ lệ thu hồi từ 99,2 đến 101,2%. Kết quả này chứng minh có thể định lượng Amoxicillin trong viên nang thuốc bằng quang phổ FT-IR.

Từ khóa - Amoxicillin; thuốc; phân tích định lượng; quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier; môi trường

Abstract - This study describes the application of a new quantitative analytical method of Amoxicillin in capsules, by using Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. This is a fast, economical, and environmentally friendly method because it does not use organic solvents. Therefore, it is considered a "green" solution in drug quantification, which is one great advantage over the most common analytical methods. This method was investigated according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC) and Vietnam Pharmacopoeia 5 guidelines. The method involved absorbance measurements of the band 1815 to 1730 cm^{-1} corresponding to the carbonyl groups in Amoxicillin molecule. Results method validation are linear over a concentration range of 1.0 to 10.0 mg/200mg pellet, linear correlation coefficient of r^2 = 0.9992 with high accuracy and stability, and recovery rates from 99.2 to 101.2%. Thus, it is concluded that the validated FT-IR spectrophotometric method is able to quantify amoxicillin in capsules.

Key words - Amoxicillin; drug; quantitative analysis; FT-IR spectroscopy; environment

1. Đặt vấn đề

Thuốc là loại hàng hoá đặc biệt, có ảnh hưởng trực tiếp đến sức khoẻ con người cũng như chất lượng, hiệu quả trong công tác phòng bệnh và chữa bệnh. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), ngày càng có nhiều báo cáo về tình trạng thuốc giả, thuốc kém chất lượng. Do đó, chất lượng thuốc cần được kiểm tra, kiểm soát chặt chẽ từ khâu sản xuất, tồn trữ, lưu thông, phân phối đến tay người dùng.

Ở Việt Nam hiện nay, trong cơ chế thị trường, ngành dược có thay đổi căn bản tạo ra thị trường thuốc phong phú, đa dạng, thuận lợi cho người sử dụng. Tuy nhiên, bên cạnh đó đã nảy sinh nhiều vấn đề phức tạp mới cần phải giải quyết, nổi cộm là chất lượng và đảm bảo chất lượng thuốc. Thuốc kém chất lượng, thuốc giả, thuốc hết hạn dùng, thuốc không được phép lưu hành vẫn xuất hiện trên thị trường và đang có chiều hướng gia tăng.

Việc kiểm tra, giám sát chất lượng thuốc là nhiệm vụ hết sức quan trọng của Bộ Y tế, Cục quản lý Dược và đặc biệt là hệ thống kiểm nghiệm trong cả nước. Hiện nay, các quy trình kiểm tra chất lượng thuốc ngày càng được hoàn thiện. Cùng với các nước trên thế giới, Việt Nam đã ban hành và thường xuyên sửa đổi, bổ sung Dược điển, quy định chất lượng thuốc được sản xuất và lưu hành trên phạm vi toàn quốc.

Một vấn đề quan trọng khác được thế giới quan tâm hiện nay là tìm cách làm giảm tác động của các hoạt động đến môi trường. Vì vậy, việc giảm thiểu, ngăn ngừa hoặc loại bỏ chất thải trong quá trình hoạt động là điều hết sức cần thiết. Nhu cầu phát triển trong lĩnh vực hóa học xanh đang tăng lên đáng kể và trở thành một thách thức lớn cho các nhà hóa học để tạo ra sản phẩm mới, quy trình và dịch vụ đạt được các yêu cầu mục tiêu xã hội, kinh tế và môi trường cấp thiết do sự tăng nhận thức về an toàn môi trường, kiểm tra ô nhiễm môi trường, bền vững sinh thái công nghiệp và công nghệ sản xuất sạch hơn trên toàn thế giới.

Trong lĩnh vực dược phẩm, việc thay thế phương pháp phân tích sử dụng nhiều dung môi hữu cơ bằng các phương pháp khác không sử dụng chúng; thay thế quá trình tổng hợp bởi một quá trình an toàn, ít độc hại hơn luôn được quan tâm.

Trong những năm gần đây, kỹ thuật phân tích quang phổ hồng ngoại đã trở thành một kỹ thuật phân tích có tính ứng dụng cao cho ngành công nghiệp dược phẩm bởi vì đây là một phương pháp phân tích nhanh, không cần phá hủy mẫu, không sử dụng các hóa chất và dung môi độc hại [1], [2]. Trên thế giới đã có những nghiên cứu ứng dụng

[1] Quang Ngai Centre for Drug, Cosmetic and Food Quality Control, Vietnam (Nguyen Phi Hung)
[2] The University of Danang - University of Science and Technology, Vietnam (Nguyen Thi Dieu Hang)

phương pháp quang phổ hồng ngoại để định lượng một số hoạt chất trong thuốc [3], [4], [5], [6]. Ở Việt Nam hiện nay, đã có những nghiên cứu phương pháp quang phổ hồng ngoại trong kiểm nghiệm Dược phẩm [7], tuy nhiên việc ứng dụng chỉ mới thực hiện ở phép thử định tính.

Hiện nay, trong các tài liệu đã công bố các phương pháp phân tích Amoxicilin trong các nền mẫu khác nhau như: sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC), phương pháp đo Iod [8], [9]. Tuy nhiên, các phương pháp này đều sử dụng dung môi có khả năng gây độc cho người sử dụng và môi trường.

Nghiên cứu này với mục đích phát triển phương pháp quang phổ hồng ngoại để xác định nhanh hàm lượng Amoxicillin trong viên nang tại Việt Nam tiết kiệm thời gian, hóa chất và đặc biệt là góp phần phát triển kỹ thuật phân tích xanh trong kiểm nghiệm thuốc.

2. Thực nghiệm

Quá trình thực nghiệm được tiến hành tại Phòng kiểm nghiệm dược phẩm, Trung tâm kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm tỉnh Quảng Ngãi.

2.1. Thiết bị, hóa chất

Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu gồm: Máy quang phổ hồng ngoại Shimadzu IRAffinity-1S (Japan) và máy ép viên (lực ép tối đa 10 tấn); Cân phân tích Mettler Toledo MS205DU, d=0,01mg (Switzerland); Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Dionex Thermo Ultimate 3000 (USA).

Chất chuẩn Amoxicillin từ Viện kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh, số lô QT010 140719, hàm lượng 87,2%.

Mẫu thử là viên nang Amoxicillin 500mg (Mekophar), số đăng ký VD-20020-13, số lô 19035AN với tá dược Magnesi stearat.

Các chất tá dược thường được sử dụng trong viên nang Amoxicillin: Natri lauryl sulfat (Merck, 98,5%), Magnesi stearat (Sigma Aldrich, loại tinh khiết phân tích), Natri croscarmellose (Himedia, loại tinh khiết phân tích).

KBr tinh khiết cho phân tích IR (Merck, Prolabo).

Methanol tinh khiết cho phân tích HPLC (Merck).

2.2. Khảo sát các điều kiện định lượng Amoxicillin

Tất cả các thử nghiệm được thực hiện trong phòng thí nghiệm với điều kiện: nhiệt độ 25±1°C, độ ẩm: 50-55%RH.

2.2.1. Lựa chọn vùng phổ hồng ngoại để định lượng Amoxicillin

+ Chuẩn bị mẫu:

- Mẫu chuẩn: cân chính xác 4,0 mg chuẩn Amoxicillin, đồng nhất với 196mg KBr, nén thành viên đường kính 13 mm với áp suất 800 KPa trong điều kiện chân không.

- Mẫu thử: cân bột thuốc tương ứng 4,0 mg Amoxicillin, đồng nhất với 196,0 mg KBr và tiến hành ép viên tương tự mẫu chuẩn.

- Các mẫu tá dược: 3 viên nén độc lập chứa mỗi tá dược Natri croscarmellose, Natri lauryl sulfat và Magnesi stearat với nồng độ 1,0 mg đồng nhất với 199,0 mg KBr.

+ Quét phổ của các mẫu ở vùng từ 4000 đến 400 cm^{-1}.

+ Chọn vùng phổ đặc trưng của Amoxicillin mà không bị ảnh hưởng bởi các tá dược, lấy giá trị độ hấp thụ theo chiều cao đỉnh peak đặc trưng để tiến hành định lượng Amoxicillin.

2.2.2. Khảo sát khối lượng mẫu dùng để nén viên và độ lặp lại của quá trình nén viên

Lượng mẫu ép viên ảnh hưởng đến bề dày viên, do đó có ảnh hưởng trực tiếp đến độ hấp thụ quang của hoạt chất. Để thu được viên nén có đường kính 13 mm, tiến hành khảo sát lượng mẫu dùng ép viên để thu được viên nén bền, chắc, đồng nhất và có độ hấp thụ phù hợp.

2.2.3. Khảo sát tỉ lệ khối lượng mẫu /KBr

Tiến hành trộn chất chuẩn Amoxicillin với KBr theo tỷ lệ khối lượng Amoxicillin/KBr là x/y với x= 1→10 và y = 100 - x. Từ đó lựa chọn tỷ lệ x/y có độ hấp thụ phù hợp.

2.3. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

Tiến hành xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp phân tích với các thông số: tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, độ ổn định và độ chọn lọc [10], theo các yêu cầu của AOAC [11].

2.3.1. Độ tuyến tính

Chuẩn bị các viên chuẩn có nồng độ khác nhau. Đo độ hấp thụ, xây dựng đường hồi quy tuyến tính, tính hệ số tương quan và phân tích phương sai để xác định sự phù hợp dựa trên kết quả khảo sát của 3 ngày khác nhau.

2.3.2. Độ chụm

Độ chụm được đánh giá dựa trên độ lặp lại (trong ngày) và độ chính xác trung gian (giữa các ngày phân tích).

Xác định độ lặp lại: đồng nhất KBr và mẫu thử Amoxicillin theo tỷ lệ khảo sát. Ép thành 06 viên nén khác nhau, đo độ hấp thụ trong cùng điều kiện phòng thí nghiệm và cùng một ngày. Xác định hàm lượng Amoxicillin trong mẫu thử dựa trên độ hấp thụ của viên thử và viên chuẩn được chuẩn bị trong cùng điều kiện. Tính giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) giữa các kết quả thu được.

Hàm lượng Amoxicillin được tính theo công thức:

$$HL(\%) = \frac{A_T}{A_C} \times m_C \times HL_C \times \frac{\bar{m}}{m_T} \times \frac{100}{HL_N} \quad (1)$$

Trong đó:

A_T là độ hấp thụ của viên thử;

A_C: độ hấp thụ của viên chuẩn;

m_C: khối lượng Amoxicillin trong viên chuẩn (mg);

m_T: khối lượng bột thuốc trong viên thử (mg);

HL_C: khối lượng của chất chuẩn (%);

$\bar{m}$: khối lượng trung bình của mẫu thử (mg);

HL_N: khối lượng Amoxicillin trên nhãn mẫu thử (mg).

Độ chính xác trung gian giữa các ngày được thực hiện bằng cách phân tích lặp lại 06 mẫu thử Amoxicillin vào hai ngày khác nhau, ở cùng điều kiện thí nghiệm. Tương quan về hàm lượng Amoxicillin trong mẫu thử giữa các ngày được đánh giá bằng phân tích phương sai ANOVA.

2.3.3. Độ đúng

Đo chiều cao độ hấp thụ của các mẫu thử thêm chuẩn. Tính khối lượng (KL) Amoxicillin định lượng được theo công thức (1).

Tính KL chuẩn thu hồi và tỷ lệ thu hồi:

KL chuẩn thu hồi (mg)= KL Amoxicillin định lượng (mg) – KL Amoxicillin trong mẫu thử (mg)

$$\text{Tỷ lệ thu hồi (\%)} = \frac{\text{KL chuẩn thu hồi (mg)}}{\text{KL chuẩn thêm vào (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

2.3.4. Tính chọn lọc (tính đặc hiệu)

Tính chọn lọc được phân tích để xác minh khả năng của phương pháp định lượng thuốc khi có mặt các tá dược trong dạng bào chế của viên nang. Phương pháp được sử dụng đã được mô tả trong phần lựa chọn vùng phổ hồng ngoại để định lượng Amoxicillin.

2.3.5. Độ ổn định

Các thông số được sử dụng để đánh giá độ ổn định là điều kiện đo: nhiệt độ của phòng làm việc (25ºC và 31ºC), thời gian nén của viên (± 2 phút so với thời gian nén làm việc), và hãng sản xuất KBr (Merck và Prolabo).

Tiến hành phân tích lặp lại 06 lần mẫu thử Amoxicillin trong mỗi điều kiện trên. Đánh giá kết quả dựa trên so sánh các điều kiện thí nghiệm bằng t-test.

2.3.6. Độ không đảm bảo đo của phương pháp

Độ không đảm bảo đo (KĐBĐ) của phương pháp được tính dựa trên kết quả thẩm định độ đúng và độ thu hồi. Đánh giá độ KĐBĐ theo phương pháp Top – Down [12].

$$u_{bias} = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u_{Cref}^2} \qquad RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum (bias)^2}{n}}$$

$$u = \sqrt{(u_{RW})^2 + (u_{bias})^2} \qquad U = 2u$$

Trong đó:

U: Độ KĐBĐ (độ tin cậy 95%);

u_{RW}: Độ lệch chuẩn tái lập tương đối ở phòng thí nghiệm

u_{bias}: Độ KĐBĐ chuẩn tương đối do độ chệch của kết quả

u_{cref}: ĐKĐBĐ của chất chuẩn sử dụng (thường ít ảnh hưởng nên có thể lấy bằng 0)

RMS_{bias}: Trung bình bình phương của các giá trị độ chệch

bias: Độ chệch.

2.4. Định lượng một số mẫu viên nang Amoxicillin trên thị trường bằng 02 phương pháp HPLC và FT-IR

Để đánh giá tính ứng dụng của phương pháp FT-IR, phương pháp phổ biến là HPLC được sử dụng để đối chứng trong định lượng Amoxicillin, bằng cách định lượng 10 mẫu thuốc viên nang Amoxicillin của các hãng sản xuất khác nhau đang lưu hành trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi.

Điều kiện chạy HPLC: theo quy trình Dược điển Việt Nam 5 (DĐVN 5) và USP 43 [13],[14]; cột Purospher Star Rp18e (250 × 4 mm, 5 µm); Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 230 nm; tốc độ dòng 1,5 ml/min; thể tích tiêm 10 µl; nhiệt độ cột 25ºC.

Việc đánh giá khả năng định lượng Amoxicillin giữa hai phương pháp thông qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối.

2.5. Các phương pháp đánh giá kết quả

Nghiên cứu này sử dụng các phương pháp đánh giá sau:

- Đánh giá kết quả trên cơ sở các yêu cầu của AOAC về xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp.

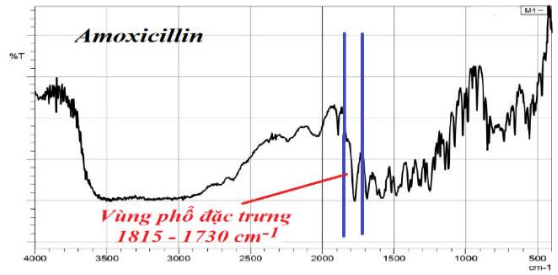
- Phương pháp kiểm định T-Test được sử dụng trong kiểm định sự khác biệt về giá trị trung bình của tổng thể với một giá trị cho trước, hoặc kiểm định sự khác biệt về giá trị trung bình giữa hai tổng thể.

Dựa vào các giá trị t_{Stat} và $t_{Critical}$ để đánh giá sự tương đồng giữa 2 kết quả phân tích [15]. Phân tích phương sai ANOVA để so sánh các bộ dữ liệu.

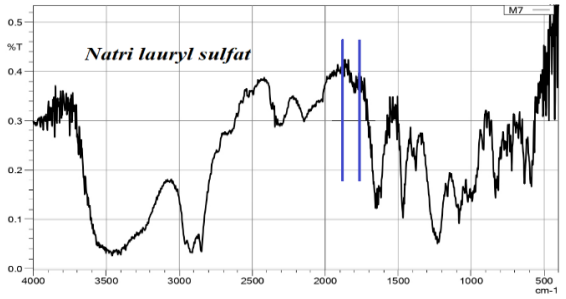
3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Khảo sát các điều kiện định lượng Amoxicillin

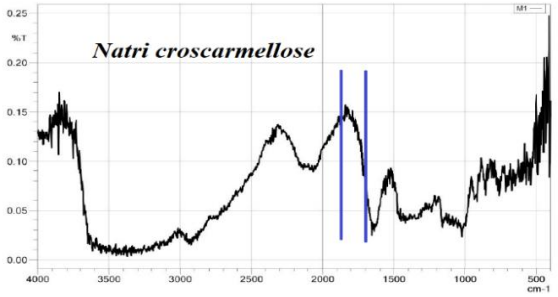
3.1.1. Lựa chọn vùng phổ hồng ngoại để định lượng Amoxicillin



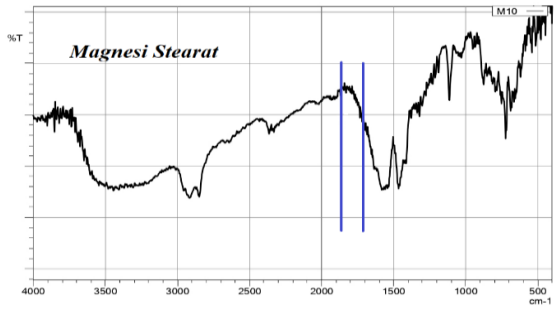
Hình 1. *Phổ FT-IR của chuẩn Amoxicillin*



Hình 2. *Phổ FT-IR của Natri lauryl sulfat*



Hình 3. *Phổ FT-IR của Natri Croscarmellose*



Hình 4. *Phổ FT-IR của Magnesi stearat*

Quan sát thấy vùng phổ 1815-1730 cm^{-1}, xuất hiện peak đại diện cho nhóm cacbonyl của Amoxicillin, không có sự ảnh hưởng của các tá dược. Do đó, đây là dải phổ được chọn để phân tích định lượng.

3.1.2. Khảo sát khối lượng mẫu dùng để nén viên và độ lặp lại của quá trình nén viên

Lượng mẫu đem ép viên tăng kéo theo độ hấp thụ tăng. Khi ép viên là 150 mg, thì viên dễ bị rạn, nứt. Với viên 250 mg thì bề dày lớn, độ lặp lại của độ hấp thụ kém (độ lệch chuẩn tương đối RSD > 2%). Vì vậy, lượng mẫu đem ép viên để được viên nén có độ hấp thụ phù hợp là 200 mg.

Bảng 1. *Kết quả khảo sát khối lượng nén viên*

TT	Độ hấp thụ	
	200 mg	**250 mg**
1	0,399	0,568
2	0,408	0,516
3	0,405	0,574
4	0,407	0,522
5	0,396	0,540
6	0,394	0,582
Trung bình	0,402	0,550
%RSD	1,48	5,12

3.1.3. Khảo sát tỉ lệ khối lượng Amoxicillin/KBr

Tiến hành cân chất chuẩn Amoxicillin với hàm lượng thay đổi trong khoảng 2-20 mg và KBr sao cho hàm lượng tổng gồm mẫu bột và KBr là 200 mg. Các mẫu được trộn đều và đồng nhất trên cối mã não. Chuyển toàn bộ vào bộ dụng cụ ép viên, nén viên trong 10 phút, tiến hành đo chiều cao đỉnh peak trong vùng 1815-1730 cm^{-1}.

Bảng 2. *Kết quả khảo sát tỷ lệ Amoxicillin/KBr*

Tỷ lệ Amoxicillin/KBr	Hàm lượng Amoxicilin (mg/viên)	Độ hấp thụ
1:99	2,03	0,141
2:98	4,05	0,292
3:97	5,90	0,410
4:96	8,10	0,563
5:95	10,02	0,680
6:94	12,39	0,839
7:93	14,37	0,985
8:92	16,11	1,086
9:91	16,84	1,146
10:90	17,66	1,220

Kết quả Bảng 2 cho thấy, độ hấp thụ A có sự thay đổi giữa các lần đo. Khi tăng tỷ lệ khối lượng Amoxicillin/KBr thì độ hấp thụ quang cũng tăng dần. Nếu độ hấp thụ quang A lớn thì dẫn đến sai số phép đo lớn còn nếu lượng mẫu quá nhỏ thì lượng cân không chính xác.

Với tỷ lệ Amoxicillin/KBr là 3/97 ta có độ hấp thụ A khoảng 0.4 (phù hợp với giá trị độ hấp thụ của các phép đo quang phổ theo yêu cầu của DĐVN 5). Do đó, tỷ lệ khối lượng Amoxicillin/KBr = 3/97 là phù hợp nhất cho phép phân tích.

Qua các khảo sát trên, các điều kiện để định lượng Amoxicillin được xác định là:

- Tỉ lệ Amoxicillin/KBr: 3/97;

- Lượng mẫu để ép thành viên nén có đường kính 13 mm: 200 mg với thời gian ép viên là 10 phút;

- Vùng phổ định lượng: 1815-1730 cm^{-1};

- Điều kiện phòng thí nghiệm: nhiệt độ 25 ± 1°C, độ ẩm 50 – 55%RH.

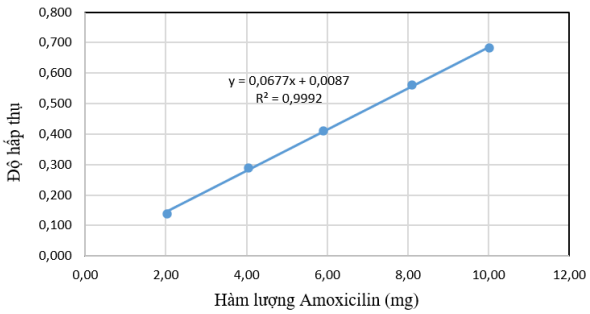
3.2. Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp

3.2.1. Độ tuyến tính

Chuẩn bị 5 viên chuẩn có hàm lượng Amoxicillin lần lượt: 2, 4, 6, 8, 10 mg/viên. Đo độ hấp thụ vào 3 ngày khác nhau.

Đường chuẩn thu được bằng cách lấy trung bình ba đường chuẩn, ta có phương trình hồi quy: $y = 0,0677x + 0,0087$ (với y là chiều cao độ hấp thụ, x là khối lượng Amoxicillin), hệ số tương quan $r^2 = 0,9992$.

Giá trị r^2 phù hợp với các yêu cầu về giá trị r^2 theo hướng dẫn thẩm định đã được chấp nhận của AOAC (r^2>0.99).



Hình 5. *Đường hồi quy tuyến tính*

Kết quả phân tích phương sai cho thấy:

Giá trị Significance F = 9,919E - 06 < 5%. Do đó, phương trình hồi quy phù hợp với thực nghiệm.

3.2.2. Độ chụm

❖ Độ lặp lại

Bảng 3. *Kết quả độ lặp lại và độ chính xác trung gian*

	Ngày 1	**Ngày 2**	**Ngày 3**
Hàm lượng Amoxicilin	97,5	96,7	95,2
	96,3	95,5	96,7
	97,0	97,9	96,7
	98,3	95,9	95,5
	98,2	97,1	98,4
	98,3	98,2	97,8
Trung bình	**97,6**	**96,9**	**96,7**
RSD (%)	**0,84**	**1,09**	**1,27**
PRSD(%)	**1,10**		

Kết quả cho thấy hàm lượng Amoxicillin trong mẫu thử đạt theo yêu cầu về hàm lượng của DĐVN 5. Hàm lượng Amoxicillin từ 90,0 đến 110,0% so với hàm lượng ghi trên nhãn. Độ lặp lại của 06 viên mẫu thử đạt theo yêu cầu của AOAC (RSD% ≤ 1,3)

❖ Độ chính xác trung gian

Kết quả định lượng Amoxicillin trên 06 mẫu thử trong cùng một ngày và giữa 03 ngày khác nhau (Bảng 3) có giá trị %RSD ≤ 1,3 và %PRSD ≤ 2,0, cho thấy độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp đạt yêu cầu theo quy định của AOAC.Phân tích thống kê ANOVA cũng cho thấy sự khác nhau của các kết quả thu được giữa các ngày phân tích cũng không có ý nghĩa thống kê ($F_{calculated}$ = 1,26 < $F_{critical}$ = 3,68).

3.2.3. Độ đúng (Độ thu hồi)

Chuẩn bị các viên nén thử thêm chuẩn trong KBr với lượng ép viên 200mg ở các nồng độ 80, 100, 120% so với

nồng độ định lượng (mỗi nồng độ thực hiện trên 3 viên)

Dựa vào độ hấp thụ thu được, hàm lượng Amoxicillin trong mẫu thử, hàm lượng chất chuẩn, tính độ thu hồi mẫu chuẩn thêm vào. Kết quả thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. *Kết quả độ thu hồi*

TT	% so với định lượng	Lượng cân thử (mg)	KL chuẩn thêm vào (mg)	Lượng Amoxicilin định lượng (mg)	Tỷ lệ thu hồi (%)
1	80%	3,48	1,43	4,28	**99,7**
2		3,40	1,58	4,38	**100,8**
3		3,38	1,65	4,41	**99,2**
4	100%	3,70	3,07	6,12	**100,6**
5		3,58	3,43	6,39	**100,8**
6		3,46	3,12	5,94	**99,3**
7	120%	3,68	4,09	7,15	**101,2**
8		3,89	4,81	8,05	**100,9**
9		3,76	4,25	7,31	**99,6**

Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi trung bình ở các nồng độ là 100,24% (từ 99,2% đến 101,2%), phù hợp với yêu cầu thẩm định phương pháp của AOAC (98,0 – 102,0%).

3.2.4. Độ ổn định

Phân tích trên 06 viên mẫu thử bằng cách thay đổi các điều kiện so với điều kiện đã được khảo sát. Đánh giá các giá trị thực nghiệm thu được bằng t-Test, so sánh các giá trị độ hấp thụ giữa điều kiện bình thường và điều kiện khác.

Bảng 5. *Kết quả khảo sát độ ổn định*

Điều kiện thử nghiệm	Nhiệt độ phòng		Thời gian nén viên			Hãng sản xuất KBr	
	25°C *	31°C	8 phút	10 phút*	12 phút	Merck *	Prolabo
Độ hấp thụ	0,409	0,431	0,413	0,409	0,420	0,409	0,419
	0,417	0,438	0,421	0,417	0,415	0,417	0,407
	0,399	0,426	0,406	0,399	0,396	0,399	0,408
	0,397	0,427	0,410	0,397	0,405	0,397	0,415
	0,419	0,438	0,398	0,419	0,417	0,419	0,422
	0,410	0,433	0,406	0,410	0,408	0,410	0,420

** : điều kiện phân tích bình thường (đã được khảo sát)*

- Đối với điều kiện môi trường của phòng làm việc, khi thay đổi từ nhiệt độ 25°C lên 31°C (tương ứng độ ẩm thay đổi từ 50 - 55%RH lên 65-70%RH), độ hấp thụ của mẫu tăng. Kết quả phân tích t-Test cho thấy t_{Stat}=5,57 cao hơn $t_{Critical}$=2,23, có nghĩa là phương pháp này không ổn định khi thay đổi điều kiện môi trường phòng làm việc. Do đó, môi trường của phòng làm việc ph8ải được kiểm soát chặt chẽ để thực hiện phương pháp. Khi tắt máy điều hòa và máy hút ẩm, độ ẩm của môi trường tăng lên, và đây có thể là nguyên nhân chính khiến thông số này không ổn định.

- Về thời gian nén viên, độ hấp thụ thu được ở điều kiện làm việc bình thường (10 phút) được so sánh riêng lẻ với từng điều kiện khác nhau (8 và 12 phút). So sánh giữa 8 và 10 phút cho thấy t_{Stat} và $t_{Critical}$ lần lượt là 0,10 và 2,23. Kết quả này không có ý nghĩa thống kê. Thời gian nén viên lâu hơn (10 và 12 phút), t_{Stat} và $t_{Critical}$ là 0,32 và 2,23, không có ý nghĩa thống kê.

- Liên quan đến nhãn hiệu KBr, độ hấp thụ thu được từ hai nhãn hiệu khác nhau đã được so sánh (Merck và Prolabo). Trong trường hợp này, các giá trị t_{Stat} và và $t_{Critical}$ tương ứng là 1,48 và 2,23, không có ý nghĩa thống kê.

Như vậy, nhiệt độ và độ ẩm của phòng thí nghiệm thay đổi làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Trong khi đó, thời gian nén viên (10 ± 2 phút) và KBr của các hãng sản xuất đã khảo sát (Merck và Prolabo) không ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Để ổn định phương pháp đo, phòng thí nghiệm cần kiểm soát có máy điều hòa hoạt động liên tục.

3.2.5. Tính chọn lọc (Tính đặc hiệu)

Tính đặc hiệu của phương pháp được thể hiện trong phần khảo sát vùng phổ định lượng. Phổ FT-IR của cả 03 loại tá dược Natri croscamellose, Magnesi stearat và natrilaurylsulfat đều không ảnh hưởng đến vùng phổ định lượng Amoxicillin. Phổ của mẫu chuẩn và mẫu thử tương ứng nhau và có peak đặc trưng nằm trong khoảng 1815-1730 cm^{-1}.

Kết quả này chứng minh được tính đặc hiệu của phương pháp.

3.2.6. Ước lượng độ không đảm bảo đo (KĐBĐ)

Độ KĐBĐ được xác định như mô tả ở mục 2.3.6.

Bảng 6. *Độ KĐBĐ từ kết quả độ chính xác trung gian*

	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
Hàm lượng Amoxicillin	97,5	96,7	95,2
	96,3	95,5	96,7
	97,0	97,9	96,7
	98,3	95,9	95,5
	98,2	97,1	98,4
	98,3	98,2	97,8
Trung bình	97,6	96,9	96,7
%RSD	0,84	1,09	1,27
u_{RW}	**1,08**		

Bảng 7. *Độ KĐBĐ đo từ kết quả độ đúng*

TT	Độ thu hồi	Bias	Bias^2	RMS bias	u_{bias}
1	99,73	-0,2740	0,0751	0,76	0,76
2	100,80	0,7951	0,6322		
3	99,24	-0,7580	0,5746		
4	100,58	0,5822	0,3389		
5	100,81	0,8116	0,6586		
6	99,30	-0,7025	0,4935		
7	101,17	1,1749	1,3803		
8	100,93	0,9264	0,8581		
9	99,56	-0,4393	0,1929		

Độ không đảm bảo đo tổng hợp: U = 2,65% với k = 2, p = 95%.

3.3. Định lượng một số mẫu viên nang Amoxicillin trên thị trường

Để xác định hàm lượng Amoxicillin trong viên nang, tiến hành phân tích 10 mẫu thuốc trên thị trưởng của các nhà sản xuất khác nhau bằng phương pháp FT-IR và phương pháp HPLC theo DĐVN 5 (phương pháp đối chứng).

Kết quả Bảng 5 cho thấy, tất cả các mẫu thử đều có hàm lượng Amoxicillin nằm trong giới hạn cho phép của DĐVN 5 (90,0% đến 110,0% so với lượng ghi trên nhãn).

Bảng 8. *Kết quả định lượng Amoxicillin trong viên nang bằng phương pháp FT-IR và phương pháp HPLC*

Thuốc trên thị trường	Kết quả định lượng (%)		Độ chệch tương đối (%)	%PRSD
	FT-IR	HPLC		
Amoxicillin 500mg VD-24602-16	96,6	99,8	3,19	1,88
Amoxicillin 500mg VD-24579-16	92,9	95,0	2,07	1,33
Amoxicillin 250mg VD-20471-14	99,8	101,6	1,78	1,39
Amoxicillin 500mg VN-17099-13	92,1	93,7	1,51	1,42
Amoxicillin 250mg VD-18307-13	97,7	98,6	0,90	0,84
Amoxicillin 500mg VD-14845-11	94,0	97,2	3,19	1,95
Amoxicillin 500mg VN-15238-12	93,7	94,9	1,28	1,18
Amoxicillin 250mg VN-17196-13	92,8	94,5	1,77	1,47
Amoxicillin 500mg VD-25792-16	95,0	97,9	2,83	1,79
Amoxicillin 500mg VD-20020-13	96,3	97,0	0,73	0,79

Độ chệch tương đối giữa 2 phương pháp phân tích từ 0,7 đến 3,2%; kết quả định lượng của 2 phương pháp của tất cả các mẫu thử đều có giá trị %PRSD < 2,0; cho thấy phương pháp phổ hồng ngoại có thể áp dụng để phân tích mẫu thuốc Amoxicillin ngoài thị trường.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thành công trong việc ứng ứng dụng kỹ thuật đo phổ FT-IR để định lượng hoạt chất kháng sinh Amoxicillin trong thuốc viên nang.

Mẫu được đo trực tiếp dạng rắn mà không cần phải qua quá trình xử lý mẫu. Vùng phổ IR tối ưu để định lượng từ 1815-1730 cm^{-1} tương ứng với nhóm Carbonyl trong Amoxicillin. Tỷ lệ khối lượng khi trộn mẫu với KBr là 3:97; khối lượng cân đem ép viên có đường kính 13 mm là 200 mg. Phương pháp có sự ổn định khi thay đổi thời gian nén viên (10 ± 2 phút) và thay đổi hãng sản xuất KBr (Merk và Prolabo). Nhiệt độ và độ ẩm phòng thí nghiệm ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Do đó, cần kiểm soát chặt chẽ điều kiện môi trường phòng thí nghiệm trong quá trình đo.

Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp đạt theo yêu cầu của AOAC và hướng dẫn của WHO về phương pháp định lượng trong dược phẩm. Đường chuẩn được thiết lập trong khoảng 2-10 mg Amoxicillin/viên. Phương trình hồi quy tuyến tính của đường chuẩn phù hợp với thực nghiệm: $y = 0{,}0677x + 0{,}0087$ (với y là chiều cao độ hấp thụ, x là khối lượng Amoxicillin), hệ số tương quan $r^2 = 0{,}9992$. Độ lặp lại trong ngày ổn định (%RSD < 1,3) và độ lặp lại giữa các ngày phân tích đạt yêu cầu (%PRSD < 2,0). Tỷ lệ thu hồi mẫu chuẩn từ 99,2 đến 101,1%.

Kết quả định lượng Amoxicillin trong viên nang của các hãng sản xuất khác nhau trên thị trường bằng phương pháp FT-IR và phương pháp đối chứng là sắc ký lỏng cao áp HPLC cho thấy sự khác nhau về kết quả định lượng giữa 2 phương pháp không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Thành công của nghiên cứu này góp phần vào xu hướng phát triển một phương pháp phân tích đơn giản, nhanh, xử lý mẫu đơn giản, không dùng dung môi độc hại, có thể thay thế các phương pháp đang được áp dụng hiện nay.

Trong tương lai gần, các kết quả nghiên cứu sẽ tiếp tục phát triển để xây dựng thành Quy trình thao tác chuẩn (SOP) [16] để đưa vào áp dụng trong phòng thí nghiệm và liên phòng thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] N. T. D. Hang, *Physico-chemical characterization and material structure investigation*, The University of Danang - University of Science and Technology, 2020.

[2] E. W. Ciurczak, *Pharmaceutical and Medical Applications of Near - Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker, 2002.

[3] A. H. Moreno and H. R. N. Salgado, *Development and Validation of the Quantitative Analysis of Ceftazidime in Powder for Injection by Infrared Spectroscopy*, Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State, Araraquara, Brazil, 2012.

[4] D. C. M. Vieir, P. C. Ricarte, and H. R. N. Salgado, *Development and Validation of the Quantitative Analysis of Cefuroxime Sodium in Powder for Injection by Infrared Spectroscopy*, Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – University Estadual Paulista, Araraquara, Brazil, 2012.

[5] E. G. Tótoli and H. R. N. Salgado, *Development and Validation of the Quantitative Analysis of Ampicillin Sodium in Powder for Injection by Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)*, Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP – Univéity Estadual Paulista, Araraquara, Brazil, 2014.

[6] S.T.H. Sherazi, M. Ali, S.A. Mahesar, "Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations", *Vibrational Spectroscopy*, vol. 55, no. 1, pp. 115–118, 2010.

[7] D. T. Huyen, *Quantitative study of some active ingredients in drugs by near and midle infrared Spectroscopy*, Abstract of doctoral thesis in chemistry, University of Natural Sciences - Hanoi National University, 2016.

[8] Ministry of Health, *Vietnamese National Drug Formulary (for grassroots medical levels)*, National formulary - pharmacopoeia center, Ha Noi, 2017.

[9] R. C. Rowe, P. J. Sheskey and M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sixth edition, Pharmaceutical Press, 2009.

[10] National Institute for food control, *Method validation in analysis chemistry and microbiology*, Science and Technics Publishing House, Hanoi, 2010.

[11] Association of Official Analytical Chemists, *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, 2016.

[12] ISO/IEC Guide 98-3:2008, *Uncertainty of measurement - Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement*, 2008.

[13] Ministry of Health, *Pharmacopoeia Vietnamica, Edition V*, Medical Publishing House, Hanoi, 2016.

[14] USP 43/NF38, *The United States Pharmacopeia*, 2020.

[15] C. T. Long, *Statistics in chemical experiments*, The University of Science, Viet Nam National University Ho Chi Minh City, 2001.

[16] ISO/IEC 17025:2017, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*, 2017.