

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI PARACETAMOL, CAFEIN VÀ CODEIN PHOSPHAT TRONG CHẾ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN

Nguyễn Thị Minh Phương¹, Trương Tuyết Ngân¹, Nguyễn Đức Tuấn¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Paracetamol, cafein và codein phosphat thường được phối hợp trong chế phẩm. Việc ứng dụng điện di mao quản (CE) để định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat có nhiều ưu điểm và vẫn đảm bảo các yêu cầu của một quy trình định lượng dùng trong kiểm nghiệm dược phẩm.

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong chế phẩm bằng CE sử dụng đầu dò DAD.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là chế phẩm viên nang chứa paracetamol 400 mg, cafein 30 mg và codein phosphat 30 mg (Di-Ansel). Phương pháp nghiên cứu: định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong chế phẩm bằng CE – DAD.

Kết quả: Điều kiện điện di: cột mao quản silicagel nung chảy chiều dài 56 cm, chiều dài hiệu lực 50 cm, đường kính trong 50 μm ở 25 °C 20 kV, bước sóng phát hiện 214 nm, áp suất tiêm mẫu 50 mbar, thời gian tiêm mẫu 5 s, BGE là đệm phosphat, nồng độ 40 mM, pH 8,5, bổ sung methanol 20% (tt/tt). Quy trình định lượng được thẩm định đạt tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

Kết luận: Quy trình định lượng đồng thời hỗn hợp paracetamol, cafein và codein phosphat trong chế phẩm bằng CE đã được xây dựng và thẩm định.

Từ khóa: Định lượng đồng thời, paracetamol, cafein, codein phosphat, điện di mao quản

ABSTRACT

SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF PARACETAMOL, CAFFEINE AND CODEINE PHOSPHATE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Nguyen Thi Minh Phuong, Truong Tuyet Ngan, Nguyen Duc Tuan

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 4 - 2021: 93 - 101

Background: Paracetamol, caffeine and codeine phosphate are usually combined in pharmaceutical formulations. The application of capillary electrophoresis (CE) method for simultaneous determination of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in preparations not only has many advantages, but also guarantee all requirement of assay in quality control of drug.

Objectives: The aim of this study was to develop a simple and rapid CE method with DAD detector for simultaneous quantitation of paracetamol, cafein and codein phosphat in pharmaceutical formulations.

Materials and Methods: Materials: a marketed product containing paracetamol 400 mg, caffeine 30 mg and codeine phosphate 30 mg (Di-Ansel). Methods: Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and codeine phosphate by CE – DAD.

Results: The CE was performed through a fused silicagel capillary (length of 56 cm, effective length of 50 cm, inner diameter 50 μm) at 25 °C with a potential of 20 kV, detection wavelength of detector was set at 214 nm, with the application of 5 s of injection at 50 mbar pressure. The BGE contained phosphat buffer 40 mM at pH 8.5, with the addition of 20% methanol (v/v). The procedure has been validated for system suitability, specificity,

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: ThS.DS. Nguyễn Thị Minh Phương ĐT: 0909810668 Email: ntmphuong@ump.edu.vn

linearity, precision and accuracy.

Conclusion: A CZE method has been developed and evaluated for simultaneous determination of paracetamol, caffeine and codeine phosphate.

Keywords: simultaneous quantitative determination, paracetamol, caffeine, codeine phosphate, capillary electrophoresis

ĐẶT VẤN ĐỀ

Paracetamol, hoạt chất chính trong nhiều biệt dược có tác dụng giảm đau, hạ sốt, là thuốc được chỉ định phổ biến nhất cho các cơn đau ở mức độ nhẹ đến vừa phải. Với những cơn đau trên ngưỡng này, paracetamol có hiệu lực kém⁽¹⁻³⁾. Codein- alcaloid thu được từ thuốc phiện hoặc từ sự methyl hóa morphin, có tác động giảm đau trung ương và giảm ho. Sự phối hợp giữa paracetamol và codein cho tác dụng giảm đau mạnh hơn rất nhiều so với từng hoạt chất riêng biệt, thời gian tác dụng cũng dài hơn^(1,2,4). Cafein có tác dụng kích thích nhẹ hệ thần kinh trung ương, làm giảm cảm giác mệt mỏi và buồn ngủ, gây co mạch, làm giảm cường độ và thời gian đau. Do vậy, khi được phối hợp với paracetamol và codein, cafein giúp làm tăng hiệu quả giảm đau^(1,2,5). Mặc dù có nhiều ưu điểm, việc áp dụng thực tiễn CE để định lượng vẫn còn khá mới và ít được áp dụng rộng rãi như kỹ thuật HPLC, đặc biệt ở Việt Nam. Đã có một số công trình trên thế giới nghiên cứu định lượng đồng thời các dạng phối hợp của paracetamol, cafein và codein phosphat⁽⁶⁻¹⁰⁾. Tuy nhiên, nghiên cứu ứng dụng CE để phân tích đồng thời cả ba thành phần paracetamol, codein và cafein chưa được tác giả nào trong nước nghiên cứu và công bố. Đề tài “Xây dựng quy trình định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong dược phẩm bằng phương pháp điện di mao quản” được thực hiện với mong muốn tìm ra một phương pháp định lượng đồng thời 3 dược chất nói trên nhanh và hiệu quả.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm viên nang trên thị trường chứa paracetamol 400 mg, cafein 30 mg và codein phosphat 30 mg (Di-Ansel). Nơi sản xuất: Công ty Roussel Việt Nam.

Chất chuẩn đối chiếu

Bảng 1. Danh mục chất chuẩn đối chiếu

Hoạt chất	Số lô	Hàm lượng tính trên nguyên trạng (%)	Nguồn gốc
Paracetamol	QT009 180718	99,5	Viện Kiểm nghiệm TP. Hồ Chí Minh
Cafein	QT028 120917	99,9	
Codein phosphat	QT090 060218	97,5	
Natri diclofenac	QT005 130318	99,5	

Dung môi, hóa chất

Acetonitril, methanol, acid phosphoric đậm đặc, natri hydroxyd, dinatri hydrophosphat đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck).

Thiết bị

Cân phân tích Satorius độ chính xác 0,1 mg (Đức); máy đo pH Neomet 240 L (Hàn Quốc); máy điện di mao quản đầu dò DAD Agilent CE 7100 (Đức); cột mao quản Silicagel nung chảy chiều dài 56 cm, chiều dài hiệu lực 50 cm, đường kính trong 50 µm.

Phương pháp nghiên cứu

Bảng 2. Công thức, phân tử khối và pKa của các chất

Hoạt chất	Công thức	Phân tử khối (g/mol)	pKa (25°C)
Paracetamol	C ₈ H ₉ NO ₂	151,2	9,4
Cafein	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,2	14,0
Codein phosphat	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃ .H ₃ PO ₄ .1/2H ₂ O	406,4	10,6
Natri diclofenac	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₂ Na	318,1	4,2

Dựa vào tính chất của paracetamol, cafein, codein phosphat và tài liệu tham khảo định lượng đồng thời các hoạt chất bằng phương pháp CE, điều kiện điện di được chọn để khảo sát là:

Điều kiện điện di cố định: nhiệt độ cột 25 °C, bước sóng phát hiện 214 nm, áp suất tiêm mẫu 50 mbar, thời gian tiêm mẫu 5 s.

Một số điều kiện điện di được tiến hành khảo sát: khảo sát điện thế trong khoảng 15 – 25 kV, khảo sát pH dung dịch điện ly nền trong khoảng 7,5 – 9,5; khảo sát nồng độ dung dịch điện ly nền trong khoảng 25 – 45 mM; khảo sát nồng độ acetonitril thêm vào dung dịch điện ly nền trong khoảng 10 – 25 %; khảo sát nồng độ methanol thêm vào dung dịch điện ly nền trong khoảng 10 – 25 %^(7,9,10).

Chuẩn bị dung dịch điện ly nền (BGE) phosphat gốc nồng độ 100 mM: Cân chính xác 1,78 g muối $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ cho vào bình định mức 100 ml, thêm 30 ml nước, siêu âm 5 phút. Thêm 50 ml nước, để nguội, bổ sung nước tới vạch, lắc đều. Pha loãng dung dịch điện ly nền gốc thành các nồng độ cần khảo sát, điều chỉnh pH bằng dung dịch natri hydroxyd 0,1 M và acid phosphoric 0,1 M.

Chuẩn bị dung dịch nội chuẩn (IS) gốc natri diclofenac 600 µg/ml pha trong nước cất.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gồm paracetamol nồng độ 800 µg/ml, cafein nồng độ 60 µg/ml, codein phosphat nồng độ 60 µg/ml và natri diclofenac nồng độ 60 µg/ml pha trong nước cất. Dung dịch trước khi điện di được lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Chuẩn bị dung dịch thử: Nghiền lượng thuốc lấy từ 20 viên thuốc thành phẩm (hàm lượng paracetamol 400 mg, codein phosphat 30 mg, cafein 30 mg) thành bột. Cân lượng bột thuốc tương ứng với 1 viên pha với nước cất vừa đủ 100 ml. Lọc thu dịch lọc, lấy chính xác 10ml dịch lọc cho vào bình định mức 50 ml, thêm 5 ml dung dịch nội chuẩn gốc natri diclofenac, pha loãng với nước cất vừa đủ 50 ml, thu được dung dịch thử gồm paracetamol nồng độ xấp xỉ 800 µg/ml, cafein nồng độ xấp xỉ 60 µg/ml, codein phosphat nồng độ 60 µg/ml và natri diclofenac nồng độ xấp xỉ 60 µg/ml, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Cột mao quản mới được hoạt hóa theo trình tự: dung dịch NaOH 1 M trong 30 phút, nước cất khử khoáng trong 30 phút, dung dịch điện ly nền trong 10 phút. Đầu ngày, cột mao

quản được xử lý theo trình tự: nước cất khử khoáng trong 10 phút, dung dịch NaOH 0,1 M trong 10 phút, nước cất khử khoáng trong 10 phút, dung dịch điện ly nền trong 10 phút. Giữa các lần tiêm mẫu, rửa cột theo trình tự: dung dịch NaOH 0,1 M trong 2 phút, nước cất khử khoáng trong 2 phút, dung dịch điện ly nền trong 5 phút.

Thăm định quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của ICH⁽¹¹⁾.

Công thức tính hàm lượng paracetamol, cafein và codein phosphat trong chế phẩm.

$$X \text{ (mg)} = \frac{S_t/S_{IS}}{S_c/S_{IS}} \times C_c \times \text{độ pha loãng dung dịch thử} \times \frac{P}{m} \times \frac{1}{1000}$$

$$C_c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \frac{a \times C\% \times 1000}{\text{độ pha loãng dung dịch chuẩn}}$$

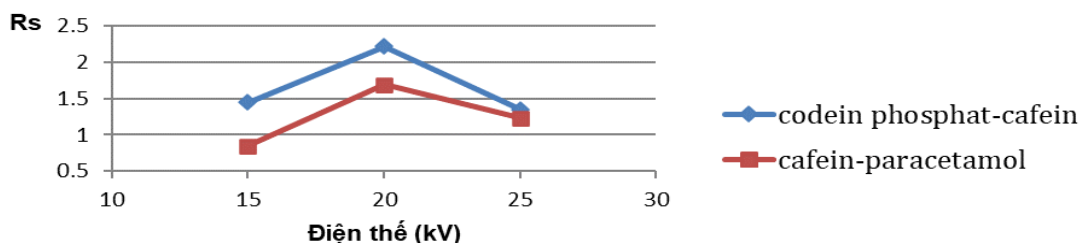
X: hàm lượng hoạt chất trong 1 viên thuốc (mg); S_t/S_{IS}: Diện tích đỉnh chuẩn hóa (CorrA) của hoạt chất trong mẫu thử / CorrA của nội chuẩn; S_c/S_{IS}: CorrA của chất chuẩn tương ứng trong mẫu chuẩn / CorrA của nội chuẩn; C_c: Nồng độ chất chuẩn tương ứng trong dung dịch chuẩn (µg/ml); P: khối lượng trung bình bột thuốc trong 1 viên nang (mg); m: khối lượng bột thuốc cân (mg); a: khối lượng cân chất chuẩn tương ứng (mg); C%: độ tinh khiết của chất chuẩn đối chiếu tương ứng

KẾT QUẢ

Qua quá trình thực nghiệm, trong khoảng khảo sát của các điều kiện điện di khác nhau, trên điện di đồ nhận được các tín hiệu theo thứ tự là codein phosphat, cafein, paracetamol và natri diclofenac (IS), trong đó kết quả giá trị độ phân giải (R_s) giữa đỉnh paracetamol và nội chuẩn lớn (>30). Vì vậy, việc lựa chọn điều kiện điện di dựa vào khả năng phân tách của các đỉnh paracetamol, cafein và codein phosphat.

Ảnh hưởng của điện thế đến kết quả điện di

Tiến hành khảo sát điện thế ở các giá trị 15 kV, 20 kV và 25 kV, với bước sóng phát hiện 214 nm, dung dịch điện ly nền phosphat, nồng độ 25 mM, pH 8,5, bổ sung methanol 10% (tt/tt) (Hình 1).



Hình 1. Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa điện thế và độ phân giải giữa các đỉnh (N = 2)

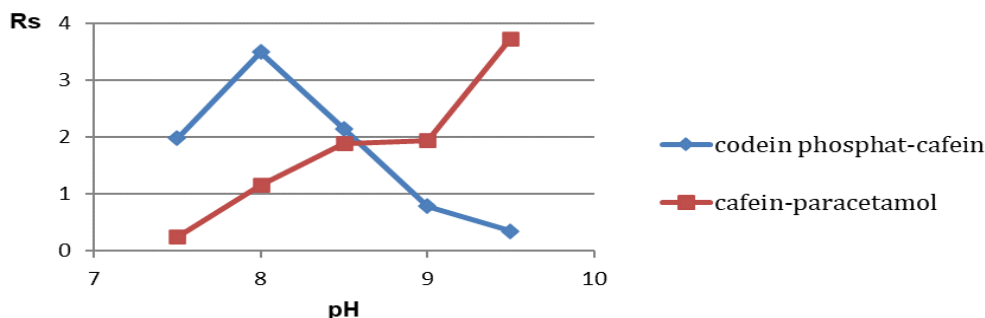
Cường độ dòng điện phát sinh trong quá trình điện di khi áp 3 giá trị điện thế đều nhỏ hơn 40 μ A. Thời gian di chuyển của các chất tăng dần khi giảm điện thế từ 25 kV xuống 15 kV, nhưng đều trong khoảng từ 5-11 phút.

Độ phân giải giữa các đỉnh tăng khi giảm điện thế từ 25 kV xuống 20 kV, nhưng giảm khi giảm điện thế xuống 15kV (do ở 15 kV đỉnh

caffeine bị giãn rộng). Chọn điện thế 20 kV là điện thế để tiếp tục khảo sát các điều kiện của quy trình định lượng.

Ảnh hưởng pH của BGE đến độ phân giải

Tiến hành khảo sát pH dung dịch BGE ở các giá trị 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; với hệ điện ly nền phosphat nồng độ 25 mM, bổ sung methanol 10% (tt/tt) (Hình 2).



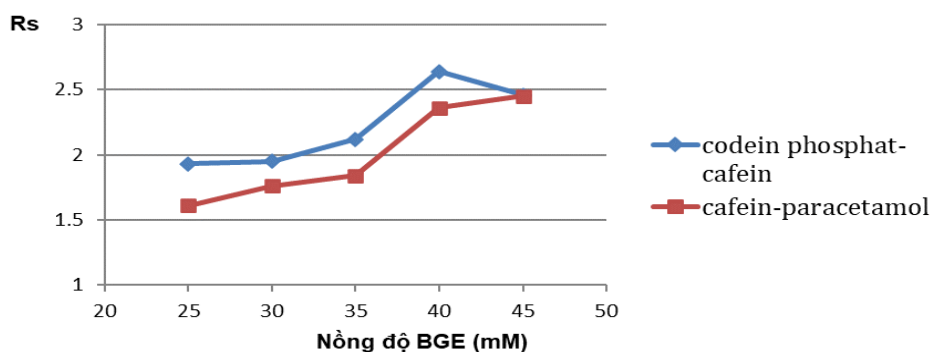
Hình 2. Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa pH dung dịch điện ly nền và độ phân giải giữa các đỉnh (N = 2)

Độ phân giải giữa 2 đỉnh codein phosphat và caffeine giảm dần trong khoảng pH 8-9,5 (với độ phân giải ở pH 7,5 < pH 8 và pH 8,5 do các đỉnh bị giãn rộng). Độ phân giải giữa 2 đỉnh caffeine và paracetamol tăng dần trong khoảng pH 7,5 - 9,5.

Chọn pH 8,5 là pH của dung dịch điện ly nền để tiếp tục khảo sát các điều kiện khác.

Ảnh hưởng của nồng độ BGE đến độ phân giải

Tiến hành khảo sát nồng độ dung dịch điện ly nền ở các giá trị 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM; với hệ điện ly nền phosphat, pH 8,5, bổ sung methanol 10% (tt/tt) (Hình 3).



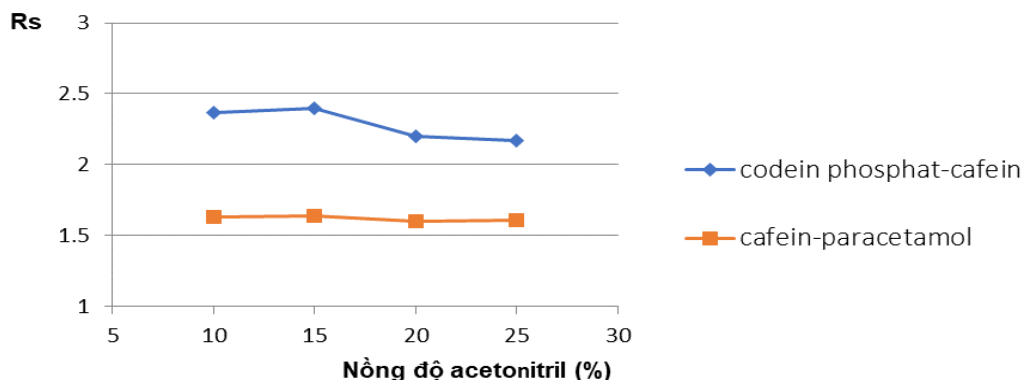
Hình 3. Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa nồng độ BGE và độ phân giải giữa các đỉnh (N = 2)

Độ phân giải giữa 2 đỉnh codein phosphat và cafein chênh lệch không đáng kể trong khoảng nồng độ 25-35 mM và tăng nhanh trong khoảng nồng độ 30 – 40 mM, giảm xuống ở nồng độ 45 mM. Độ phân giải giữa 2 đỉnh cafein và paracetamol tăng dần trong khoảng nồng độ 25-45 mM. Chọn nồng độ 40 mM là nồng độ của

dung dịch điện ly nền để tiếp tục khảo sát các điều kiện khác.

Ảnh hưởng dung môi hữu cơ đến độ phân giải

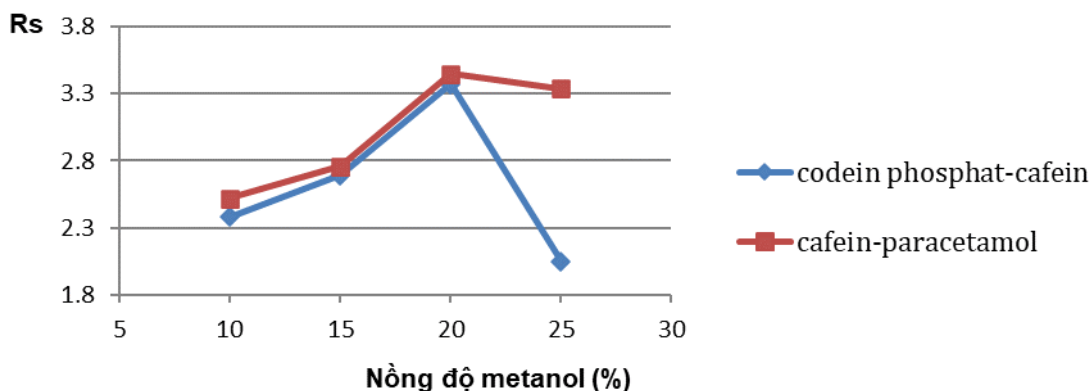
Tiến hành khảo sát sự có mặt của acetonitril trong dung dịch điện ly nền ở các nồng độ 10%, 15%, 20%, 25% (tt/tt); với hệ điện ly nền phosphat nồng độ 40 mM, pH 8,5.



Hình 4. Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa nồng độ % acetonitril trong BGE và độ phân giải giữa các đỉnh (N = 2)

Kết quả khảo sát cho thấy độ phân giải giữa các đỉnh chênh lệch không đáng kể khi không có mặt acetonitril và khi thay đổi nồng độ acetonitril trong dung dịch điện ly nền.

Tiến hành khảo sát sự có mặt của methanol trong dung dịch điện ly nền ở các nồng độ 10%, 15%, 20%, 25% (tt/tt); với hệ điện ly nền phosphat nồng độ 40 mM, pH 8,5.



Hình 5. Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa nồng độ % methanol trong BGE và độ phân giải giữa các đỉnh (N = 2)

Kết quả khảo sát cho thấy thời gian lưu của các chất tăng dần khi tăng nồng độ % methanol trong dung dịch điện ly nền. Độ phân giải giữa các đỉnh tăng khi nồng độ methanol tăng từ 15% lên 20%. Khi tăng nồng độ methanol từ 20% lên 25%: độ phân giải giữa 2 đỉnh codein phosphat và cafein chênh lệch không đáng kể, còn độ phân giải giữa 2 đỉnh cafein và paracetamol giảm. Chọn nồng

độ 20% (tt/tt) là nồng độ của methanol trong dung dịch điện ly nền để tiếp tục tiến hành thẩm định quy trình.

Thẩm định quy trình

Qua khảo sát đã chọn được quy trình định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong chế phẩm bằng phương pháp điện di mao quản: cột mao quản silica nung chảy, đường kính trong 50 µm, chiều dài tổng

cộng 56 cm, chiều dài hiệu quả 50 cm; nhiệt độ mao quản 25 °C; điện thế 20 kV; tiêm mẫu bằng chương trình áp suất 50 mbar × 5 giây; bước sóng phát hiện 214nm; dung dịch điện ly nền: phosphat 40 mM, pH 8,5, có chứa 20% MeOH. Tiến hành thẩm định quy trình theo

hướng dẫn của ICH thu được kết quả về tính phù hợp hệ thống thể hiện trong *Bảng 3*, *Bảng 4*.

Tính đặc hiệu được thể hiện khi tiến hành điện di mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn với điều kiện đã khảo sát được thể hiện ở *Hình 6*, *7*.

Bảng 3. Kết quả tính phù hợp hệ thống của mẫu chuẩn (N = 6)

	Codein phosphat		Cafein			Paracetamol			Natri diclofenac (ISO)		
	t _{co} /t _{is}	S _{co} /S _{is}	t _{caf} /t _{is}	S _{caf} /S _{is}	R _s	t _{pa} /t _{is}	S _{pa} /S _{is}	R _s	t _m	CorrA	R _s
1	0,567	0,623	0,597	1,111	4,370	0,615	5,692	2,470	14,395	2,643	51,60
2	0,567	0,627	0,597	1,116	4,370	0,614	5,710	2,500	14,410	2,662	52,59
3	0,567	0,627	0,597	1,100	4,350	0,614	5,646	2,430	14,424	2,668	51,23
4	0,569	0,630	0,599	1,112	4,350	0,616	5,685	2,450	14,349	2,636	52,09
5	0,567	0,629	0,598	1,106	4,320	0,615	5,667	2,400	14,397	2,630	51,54
6	0,567	0,633	0,597	1,107	4,350	0,614	5,672	2,400	14,430	2,649	51,60
TB	0,567	0,628	0,598	1,109	4,352	0,615	5,679	2,442	14,401	2,648	51,78
RSD %	0,121	0,485	0,110	0,511		0,105	0,391				

Bảng 4. Kết quả tính phù hợp hệ thống của mẫu thử

	Codein phosphat		Cafein			Paracetamol			Natri diclofenac (ISO)		
	t _{co} /t _{is}	S _{co} /S _{is}	t _{caf} /t _{is}	S _{caf} /S _{is}	R _s	t _{pa} /t _{is}	S _{pa} /S _{is}	R _s	t _m	CorrA	R _s
1	0,576	0,618	0,605	1,171	3,990	0,623	5,885	2,320	14,211	2,869	50,32
2	0,575	0,618	0,604	1,179	3,960	0,621	5,867	2,330	14,242	2,864	50,23
3	0,573	0,612	0,602	1,166	4,050	0,619	5,876	2,370	14,271	2,840	51,13
4	0,574	0,610	0,603	1,160	3,970	0,620	5,820	2,350	14,252	2,901	49,93
5	0,573	0,613	0,603	1,158	4,090	0,620	5,822	2,300	14,244	2,899	49,86
6	0,576	0,631	0,606	1,191	4,090	0,623	6,009	2,300	14,155	2,806	50,00
TB	0,574	0,617	0,604	1,171	4,025	0,621	5,880	2,328	14,229	2,863	50,25
RSD %	0,215	1,235	0,231	1,086		0,215	1,177				

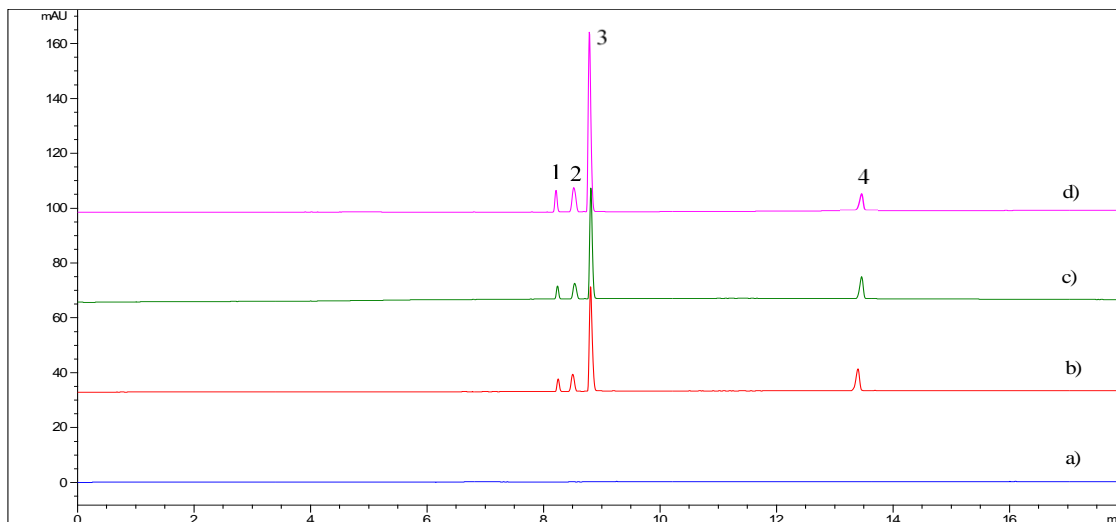
* S/S_s được tính bằng tỷ lệ CorrA của đỉnh hoạt chất và CorrA của đỉnh nội chuẩn natri diclofenac; * t/t_{is} được tính bằng tỷ lệ thời gian di chuyển của đỉnh hoạt chất và thời gian di chuyển của đỉnh nội chuẩn natri diclofenac

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy điện di đồ mẫu trắng không xuất hiện đỉnh trong thời gian di chuyển tương ứng với đỉnh các hoạt chất trong mẫu chuẩn. Điện di đồ mẫu thử và thử thêm chuẩn xuất hiện các đỉnh có thời gian di chuyển tương ứng với các đỉnh của chất chuẩn trong điện di đồ mẫu chuẩn và phổ UV tại các thời gian di chuyển này tương đồng giữa mẫu thử và thử thêm chuẩn so với mẫu chuẩn, diện tích đỉnh tăng lên trong mẫu thử thêm chuẩn. Vậy quy trình có tính đặc hiệu.

Kết quả khoảng tuyến tính được thể hiện trong *Bảng 5*.

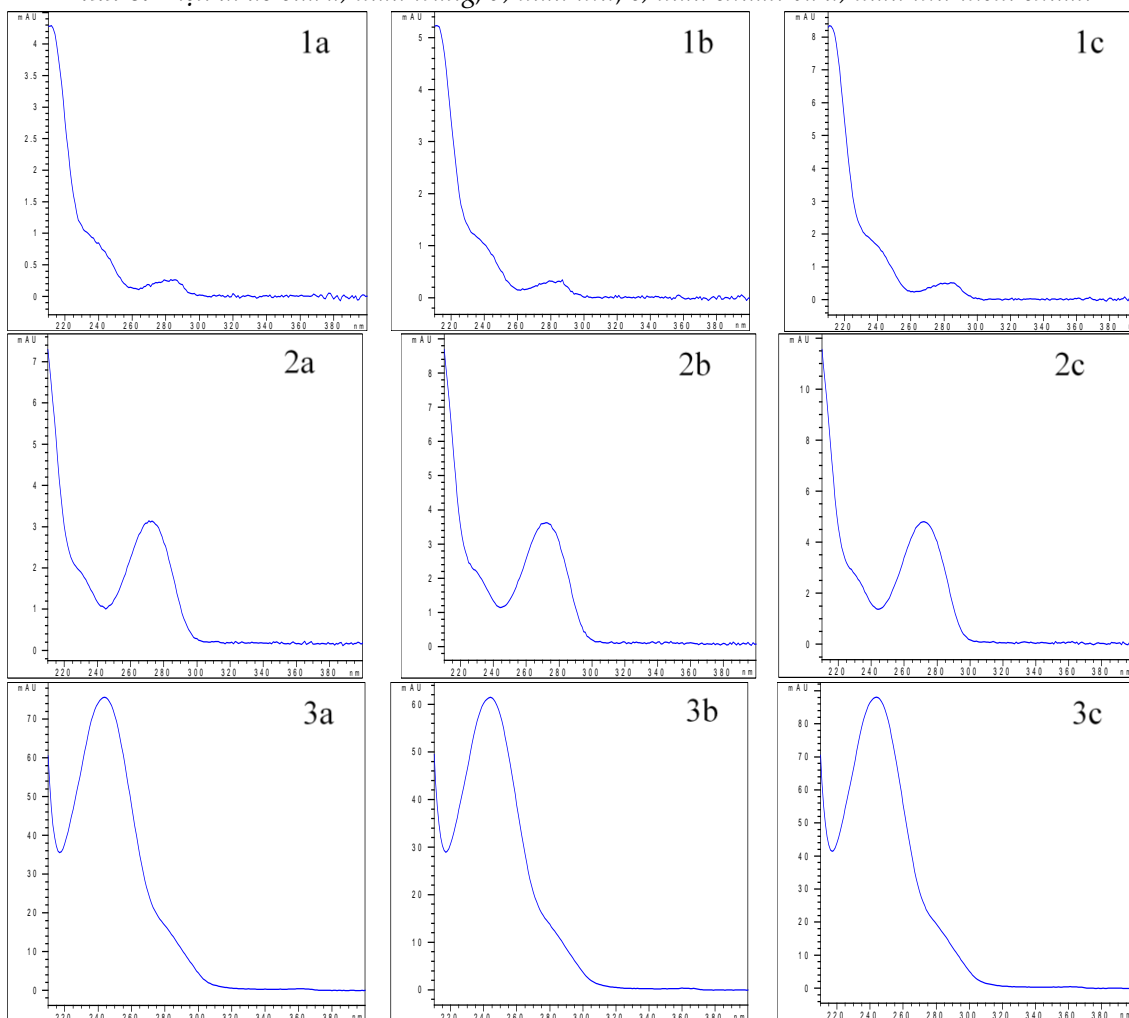
Kết quả xử lý thống kê cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa S/S_s (diện tích đỉnh hiệu chuẩn của đỉnh hoạt chất / diện tích đỉnh hiệu chuẩn của đỉnh nội chuẩn natri diclofenac) và khoảng nồng độ khảo sát của các chất với giá trị R > 0,995.

Kết quả độ lặp lại và độ đúng của quy trình phân tích được thể hiện trong *Bảng 6*.



1: codein phosphat; 2: cafein; 3: paracetamol; 4: natri diclofenac

Hình 6. Điện di đồ của a) mẫu trắng, b) mẫu thử, c) mẫu chuẩn và d) mẫu thử thêm chuẩn



Hình 7. Phổ tử ngoại tại thời gian di chuyển của đỉnh (codein phosphat: 1a mẫu thử, 1b mẫu chuẩn, 1c mẫu thử thêm chuẩn; cafein: 2a mẫu thử, 2b mẫu chuẩn, 2c mẫu thử thêm chuẩn; paracetamol: 3a mẫu thử, 3b mẫu chuẩn, 3c mẫu thử thêm chuẩn)

Bảng 5. Kết quả thống kê hồi quy tuyến tính của 3 hoạt chất theo quy trình (N = 5)

Thông số	Codein phosphat	Cafein	Paracetamol
R	0.996	0.999	0.999
F	773,017	3253,15	3313,75
F 0,05	6,608		
Hệ số b	0,0119	0,023	0,0086
t của b	27,803	57,036	57,565
Hệ số b ₀	-0,0374	-0,121	-0,326
t của b ₀	1,108	3,738	2,077
t 0,05	2,571		
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 0,0119x$	$\hat{y} = 0,0235x - 0,1212$	$\hat{y} = 0,0086x$
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	14,625 – 131,625	14,985 – 134,865	199 - 1791

Bảng 6. Kết quả độ lặp lại và độ đúng của quy trình phân tích

	Codein phosphat	Cafein	Paracetamol
Độ lặp lại (n = 6)	TB = 29,8mg RSD = 0,694%	TB = 30,6mg RSD = 0,939%	TB = 405,6mg RSD = 0,930%
Độ chính xác trung gian (n = 18) (liên ngày)	TB = 29,5 mg RSD = 1,150%	TB = 30,8 mg RSD = 1,341%	TB = 403,9 mg RSD = 0,796%
Độ đúng (n = 9)	98,79% – 103,65% TB = 100,84% RSD = 1,832%	96,63% – 101,34% TB = 99,28% RSD = 1,658%	98,74% – 101,39% TB = 99,83% RSD = 1,044%
Khoảng xác định (µg/ml)	14,625 – 131,625	14,985 – 134,865	199 - 1791

Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác cho thấy quy trình định lượng có RSD% của hàm lượng các chất codein phosphat, cafein và paracetamol trong viên đều nhỏ hơn 2% và tỷ lệ thu hồi ở 3 mức thêm chuẩn 80%, 100%, 120% nồng độ khảo sát (theo phương pháp thử thêm chuẩn) của 3 chất cần phân tích nằm trong khoảng 96,63% – 103,65%. Vậy quy trình có tính chính xác và độ đúng tốt.

Ứng dụng

Ứng dụng quy trình để định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong chế phẩm thuốc viên nang Di-Ansel (paracetamol 400 mg, codein phosphat 30 mg, cafein 30 mg) của Công ty Roussel Việt Nam, số lô: 0140618 thu được kết quả thể hiện trong **Bảng 7**.

Bảng 7. Kết quả định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong viên nang Di-Ansel, số lô: 0140618 (N = 1)

Kết quả	Codein phosphat	Cafein	Paracetamol
Hàm lượng (mg)	29,8	30,6	405,6
% so với hàm lượng nhãn	99,3	102,0	101,4
RSD% (n=6)	0,694	0,939	0,930

BÀN LUẬN

Ở điều kiện phân tích, codein phosphat di chuyển trước cafein rồi tới paracetamol di chuyển cuối cùng (**Hình 6**). Điều này được giải thích là do ở pH 8,5, codein phosphat có giá trị pKa = 10,6 và cafein có giá trị pKa = 14 đã bị ion hóa hoàn toàn và mang điện dương, trong khi đó paracetamol có giá trị pKa = 9,38 chỉ bị ion hóa một phần, dẫn đến linh độ điện di của codein phosphat và cafein lớn hơn paracetamol. Mặt khác codein phosphat có độ tan trong nước lớn hơn cafein và paracetamol nên phân tử codein phosphat có độ phân cực lớn hơn nên có tốc độ điện di lớn hơn phân tử cafein và paracetamol, vì vậy codein phosphat di chuyển ra trước^(3-5,12). Điều này cũng được dùng để giải thích kết quả thu được khi khảo sát ảnh hưởng của BGE pH ở điều kiện phân tích lên khả năng phân tách giữa paracetamol, cafein và codein phosphat. Độ phân giải giữa đỉnh codein phosphat và cafein tăng khi pH giảm. Khi pH giảm, sẽ làm giảm cường độ dòng EOF, vì vậy khi pH giảm tốc độ di chuyển tương đối của chất phân tích sẽ phụ thuộc nhiều hơn bởi tốc độ

điện di của chính nó, codein phosphat và cafein có tốc độ điện di khác nhau nên khi pH giảm tốc độ di chuyển tương đối của hai chất này càng khác nhau. Ngược lại khi pH tăng, dòng EOF tăng, tốc độ di chuyển tương đối của chất phân tích sẽ ít phụ thuộc bởi tốc độ điện di của chính nó, cụ thể ở pH 9,5 codein phosphat và cafein chủ yếu di chuyển theo dòng EOF nên trên điện di đồ hai đỉnh của codein phosphat và cafein gần như trùng nhau. Độ phân giải giữa đỉnh cafein và paracetamol tăng khi pH tăng. Khi pH tăng đến 9,5 làm cho khả năng ion hóa thành cation của paracetamol có giá trị $pK_a = 9,38$ càng giảm trong khi khả năng ion hóa của cafein có giá trị $pK_a = 14$ hầu như không bị ảnh hưởng, nên tốc độ di chuyển tương đối của cafein và paracetamol càng khác nhau. Khi pH giảm đến 7,5 paracetamol cũng bị ion hóa hoàn toàn và mang điện dương, lúc này trên điện di đồ cho thấy cafein và paracetamol có tốc độ di chuyển tương đối gần như nhau, 2 đỉnh của hai chất này gần như trùng nhau, cho thấy tốc độ điện di của cation cafein và paracetamol gần bằng nhau. Như vậy có thể nói ở điều kiện phân tích, sự phân tách của codein phosphat và cafein dựa trên sự khác nhau về linh độ điện di của codein phosphat và cafein dưới dạng ion dương, còn sự phân tách của paracetamol và cafein dựa trên sự khác biệt về khả năng ion hóa trong điều kiện điện di^(3-5,12).

KẾT LUẬN

Quy trình định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat bằng phương pháp điện di mao quản đã được xây dựng và thẩm định. Quy trình có thể được ứng dụng để định lượng đồng thời paracetamol, cafein và codein phosphat trong các chế phẩm phối hợp nhiều thành phần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế (2018). Dược thư quốc gia Việt Nam. *Nhà Xuất Bản Y Học*, Hà Nội.
2. American Society of Health-System Pharmacists (2017). AHFS drug information 2017. American society of health-system pharmacists.
3. Acetaminophen. URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@m+@rel+103-90-2>. (access on 26/5/2019).
4. Cafein. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cafein> (access on 26/5/2019).
5. Codeine phosphate. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Codeine-phosphate>. (access on 26/5/2019).
6. Narayanan VL, Austin A (2016). Determination of acetaminophen and caffeine using reverse phase liquid (RP-LC) chromatographic technique. *Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 3 (4):5-10.
7. Cunha R, Ribeiro M, Munoz R, Richter E (2017). Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 40 (8):1815-1823.
8. Habibi B, Abazari M, Pournaghi-Azar MH (2014). Simultaneous determination of codeine and caffeine using single-walled carbon nanotubes modified carbon-ceramic electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114:89-95.
9. Injac R, Srdjenovic B, Prijatelj M, et al (2008). Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals, and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 46(2):137-143.
10. Cakir K, Erkmen C, Uslu B, Goger NG (2019). Quantitative determination of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical dosage forms by using capillary electrophoresis method. *Academia Romana*, 64(9):801-808.
11. ICH Harmonised Tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology, (2005), Q2 (R1), 6-13. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2-r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology> (access on 26/5/2019).
12. Nguyễn Đức Tuấn (2017). Điện di mao quản. In: Vĩnh Định, Võ Thị Bạch Huệ. Hóa Phân Tích. V2, pp.317-318. *Nhà Xuất Bản Giáo Dục Việt Nam*, Hà Nội.

Ngày nhận bài báo: 15/12/2020

Ngày phản biện nhận xét bài báo: 12/05/2021

Ngày bài báo được đăng: 20/08/2021