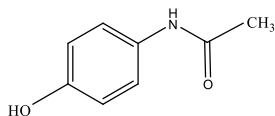


XÁC ĐỊNH PARACETAMOL TRONG MẪU DƯỢC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ UV-VIS SỬ DỤNG HIỆN TƯỢNG CỘNG HƯỞNG PLASMON BỀ MẶT CỦA DUNG DỊCH NANO VÀNG

LÊ PHƯƠNG THẢO ⁽¹⁾, NGUYỄN THỊ NGUYỆT ⁽¹⁾, PHẠM THỊ NGỌC MAI ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Paracetamol hay acetaminophen (N-(4-hydroxyphenyl) acetamid) là thuốc giảm đau và hạ sốt được sử dụng phổ biến nhất trong số các loại thuốc giảm đau hạ sốt hiện nay do có ít tác dụng phụ và có thể mua được ở hầu hết các hiệu thuốc mà không cần kê đơn. Cấu tạo của paracetamol bao gồm một vòng nhân benzen, được thế bởi một nhóm hydroxyl và một nguyên tử nito của một nhóm amid (acetamid) theo kiểu para (1,4). Với liều thông thường, paracetamol không gây kích ứng niêm mạc dạ dày, không ảnh hưởng đến đông máu cũng như ảnh hưởng đến chức năng của thận. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy sử dụng paracetamol với liều cao (trên 200mg/ ngày) có thể làm tăng nguy cơ biến chứng dạ dày, liều cấp tính (trên 10g) làm thương tổn gan dẫn đến tử vong, những vụ ngộ độc paracetamol đã tăng lên một cách đáng lo ngại trong những năm gần đây.



Hình 1. Công thức cấu tạo của paracetamol

Ngày nay, có rất nhiều phương pháp xác định hàm lượng paracetamol trong mẫu dược phẩm cũng như mẫu sinh học như phương pháp quang học [1, 2], sắc ký [3, 4], và điện di mao quản [5, 6],... Các phương pháp này còn tồn tại một số nhược điểm như quy trình phân tích phức tạp, hóa chất và thiết bị đắt tiền. Vì vậy, việc xây dựng phương pháp mới để xác định paracetamol nhanh, chính xác, khắc phục được các hạn chế nêu trên vẫn luôn thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học.

Mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển phương pháp phân tích paracetamol có độ nhạy và độ chính xác cao nhưng đơn giản và có chi phí thấp dựa trên sự thay đổi tính chất cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance - SPR) của dung dịch nano vàng khi có mặt paracetamol. Do nhóm NH- trong phân tử paracetamol có ái lực mạnh với bề mặt hạt Au, các phân tử paracetamol dễ dàng hấp phụ lên bề mặt Au gây nên hiện tượng co cụm của các hạt nano Au. Khi đó, trên phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của dung dịch nano Au có sự dịch chuyển bước sóng hấp thụ cực đại tương ứng với tần số dao động cộng hưởng plasmon bề mặt của các hạt nano Au từ 520 nm sang 690 nm. Đây chính là cơ sở để phát hiện sự có mặt của paracetamol cũng như để định lượng paracetamol bằng phương pháp phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Phương pháp được ứng dụng để phân tích hàm lượng paracetamol trong một số mẫu dược phẩm hiện có trên thị trường.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất và thiết bị

Các hoá chất tinh khiết phân tích: paracetamol, natri citrat, natri clorua, natri hydroxit, acid chlohiric, $\text{HAuCl}_4.3\text{H}_2\text{O}$, caffein, natri cacbonat, saccaroz, dextromethorphan (Merk, Đức).

Máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS 1601 PC-Shimadzu (Nhật Bản), bước sóng làm việc từ 400-800 nm, chiều dày cuvet 1 cm.

2.2. Điều chế nano vàng

Dung dịch nano Au được điều chế dựa theo phương pháp Turkevich sử dụng natri citrat làm chất khử để khử HAuCl_4 xuống Au (0) đồng thời các ion citrat hấp phụ trên bề mặt hạt Au cũng có tác dụng bảo vệ và làm ổn định các hạt Au [7].

2.3. Nguyên tắc xác định paracetamol

Dung dịch nano vàng ổn định bằng natri citrat có màu đỏ tươi với một đỉnh hấp thụ cực đại tại bước sóng 520 nm đối với kích thước hạt 20 nm. Khi thêm paracetamol vào dung dịch, chúng sẽ hấp phụ lên bề mặt các hạt nano vàng nhờ ái lực giữa Au và nhóm amit (-NH) trong phân tử paracetamol. Sự hấp phụ này làm giảm điện tích âm trên bề mặt hạt Au dẫn đến giảm lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt nano Au khiến chúng co cụm lại. Sự thay đổi về kích thước, hình dạng, trạng thái tập hợp và khoảng cách giữa các hạt nano vàng gây nên sự thay đổi tính chất cộng hưởng plasmon bề mặt cục bộ (LSPR) của chúng làm dịch chuyển bước sóng hấp thụ cực đại về phía bước sóng dài hơn (690 nm). Sự dịch chuyển bước sóng này gây nên sự thay đổi rõ rệt màu của dung dịch từ đỏ sang xanh.

Thiết lập mối quan hệ giữa tỷ lệ độ hấp thụ quang ở hai bước sóng 690 nm và 520 nm (A_{690}/A_{520}) với logarit nồng độ paracetamol làm cơ sở để định lượng paracetamol.

2.4. Xử lý mẫu phân tích

Các mẫu thuốc có chứa paracetamol được mua ngẫu nhiên trên thị trường Hà Nội.

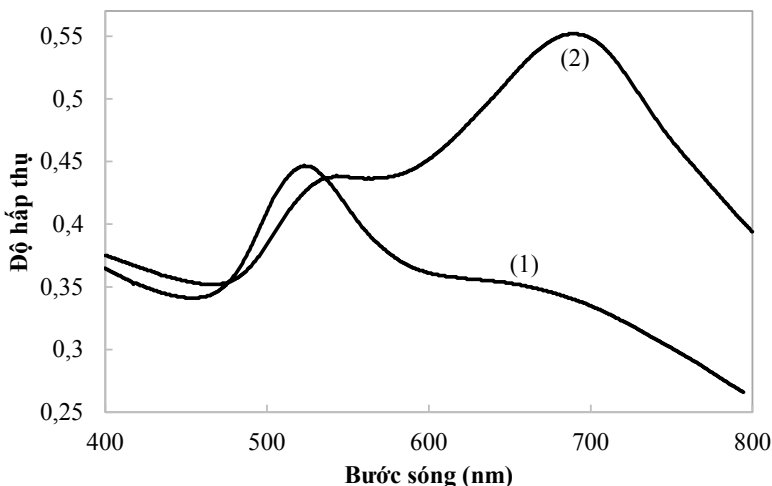
Cân chính xác 13,4 mg thuốc có chứa paracetamol bằng cân phân tích, sau đó hòa tan bằng nước cất. Cho vào bình định mức 25 ml và định mức đến vạch bằng nước cất thu được dung dịch mẫu 1. Tiếp tục pha loãng dung dịch mẫu 1 vào bình định mức 25 ml để được dung dịch mẫu 2 có nồng độ 10^{-4} M. Cho 2,50 ml dung dịch nano Au vào bình định mức dung tích 5 ml, thêm 190 μL dung dịch NaCl 1M, điều chỉnh pH 4; thêm 125 μL dung dịch mẫu 2, định mức đến vạch. Đợi 17 phút và đo tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{690}/A_{520} . Hàm lượng paracetamol được xác định bằng phương pháp đường chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Các điều kiện tối ưu

3.1.1. Khảo sát lựa chọn bước sóng cực đại (λ_{max})

Trên hình 2 là các phổ hấp thụ phân tử được ghi trong khoảng 400-800 nm của dung dịch nano vàng khi không có mặt paracetamol (1) và khi có mặt paracetamol (2).

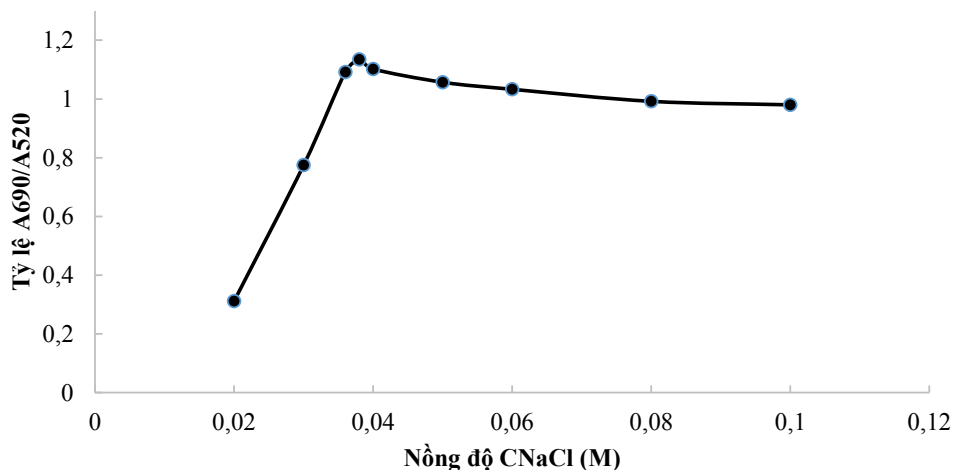


Hình 2. Phổ hấp thụ của dung dịch nano vàng (1) và phổ hấp thụ khi có thêm paracetamol (2)

Phổ hấp thụ của dung dịch nano vàng cho thấy một đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 520 nm, tương ứng với bước sóng cộng hưởng plasmon bề mặt của các hạt nano vàng có kích thước từ 10-20 nm. Khi thêm paracetamol (10^{-5} M), độ hấp thụ quang tại 520 nm giảm xuống, đồng thời trên phổ hấp thụ xuất hiện thêm một đỉnh cực đại thứ hai ở bước sóng 690 nm. Sự dịch chuyển cực đại hấp thụ này cũng kéo theo sự đổi màu rõ rệt có thể quan sát thấy bằng mắt thường của dung dịch từ đỏ tươi (khi không có paracetamol) sang xanh (khi có paracetamol). Từ kết quả thí nghiệm trên, chúng tôi lựa chọn hai bước sóng hấp thụ cực đại là 520 nm và 690 nm và sử dụng tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{690}/A_{520} làm tín hiệu phân tích để định lượng paracetamol.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl và nồng độ dung dịch nano vàng

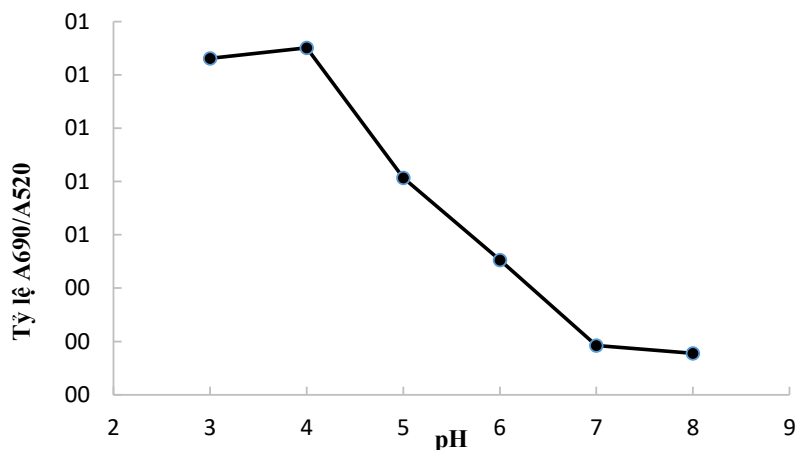
Nồng độ muối nền có thể ảnh hưởng đến khả năng co cụm của dung dịch nano Au thông qua việc tác động đến chiều dày lớp điện kép tạo thành bởi các ion citrat xung quanh bề mặt hạt Au. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl trong khoảng từ 0,02-0,1 M lên tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{690}/A_{520} (hình 3) cho thấy, khi tăng nồng độ NaCl từ 0,02 M đến 0,1 M, tỷ lệ A_{690}/A_{520} tăng và đạt bão hòa tại nồng độ 0,038 M. Như vậy, nồng độ muối cao giúp thuận lợi cho khả năng co cụm của các hạt nano Au và làm tăng tín hiệu phân tích. Nồng độ NaCl 0,038 M cho tỷ lệ A_{690}/A_{520} cao nhất nên sẽ được chọn là nồng độ tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến tỷ lệ hấp thụ quang

3.1.3. Ảnh hưởng của pH

Lực đẩy tĩnh điện giữa các hạt nano citrat-Au tích điện âm là động lực chính gây nên sự phân tán hoặc co cụm của các hạt nano Au. Do ion citrat và phân tử paracetamol đều có điện tích phụ thuộc vào pH, pH của dung dịch có thể ảnh hưởng tương đối lớn đến lực tĩnh điện giữa các hạt nano Au và thay đổi tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{690}/A_{520} của dung dịch.



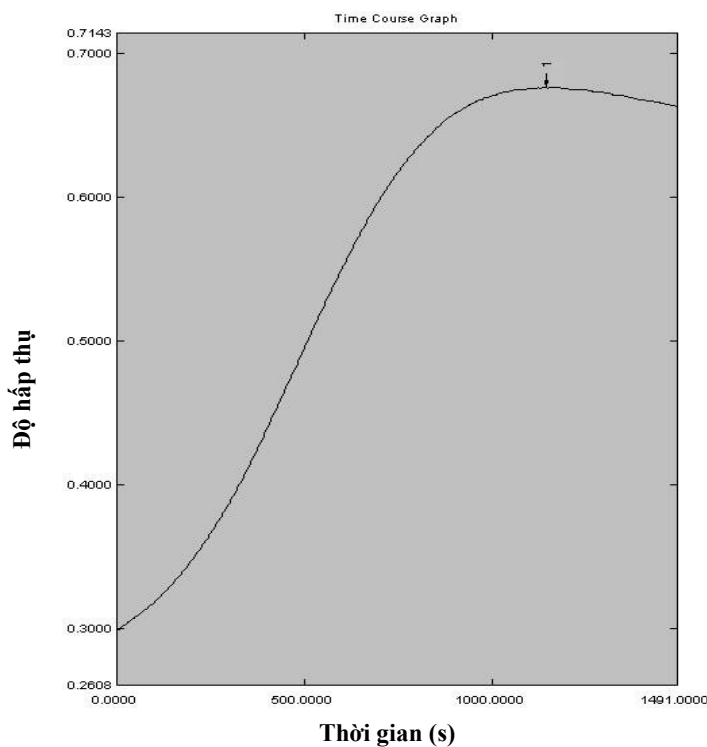
Hình 4. Ảnh hưởng của pH tới tỷ lệ hấp thụ quang

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH dung dịch trong khoảng từ 3,0 đến 8,0 cho thấy, tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{690}/A_{520} tăng trong khoảng pH từ 3,0 đến 4,0, sau đó giảm mạnh trong khoảng pH từ 5,0 đến 8,0 (hình 4). Ở các giá trị pH thấp, paracetamol mang điện tích dương do đó có thể dễ dàng bị hấp phụ trên bề mặt hạt citrat-nano Au tích điện âm thông qua liên kết giữa Au và nhóm -NH. Quá trình này làm giảm điện tích âm trên bề mặt hạt Au khiến chúng co cụm lại và làm tăng tỷ lệ

A_{690}/A_{520} . Ở các giá trị pH lớn hơn 5,0, không có sự khác biệt đáng kể về sự hấp phụ của paracetamol trên bề mặt hạt nano Au do ở pH cao, paracetamol mang điện tích âm và khó hấp phụ trên bề mặt hạt citrat-nano Au cũng mang điện tích âm. Giá trị A_{690}/A_{520} giảm khi tăng pH là do sự tăng điện tích âm của ion citrat dẫn đến tăng độ phân tán của các hạt nano Au. Giá trị pH = 4,0 cho tỷ lệ độ hấp thụ quang A_{690}/A_{520} lớn nhất nên được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.4. Ảnh hưởng của thời gian

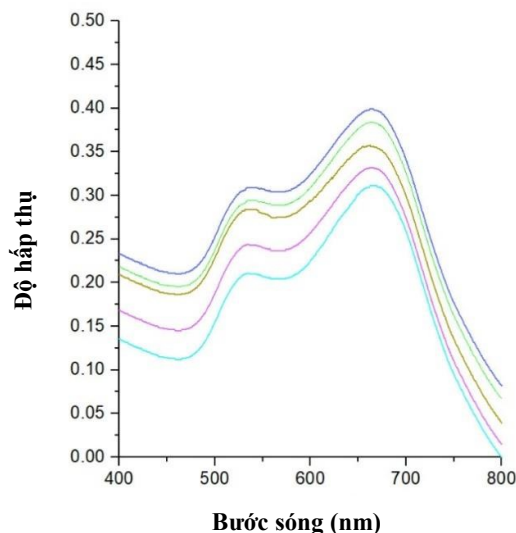
Tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian đến độ ổn định màu của dung dịch tại bước sóng 690 nm khi thêm paracetamol trong 30 phút. Như có thể thấy trên Hình 5, giá trị A_{690} tăng mạnh trong 17 phút đầu tiên sau đó đạt bão hòa, cho thấy hiện tượng co cụm của các hạt nano Au bắt đầu xảy ra ngay khi trộn và kết thúc sau khoảng thời gian 17 phút. Bằng mắt thường có thể quan sát thấy dung dịch chuyển từ màu đỏ sang màu xanh ngay sau khi thêm paracetamol và màu bền vững ở khoảng phút thứ 17. Do đó, chúng tôi đã chọn thời gian tối ưu để phát hiện và định lượng paracetamol là 17 phút.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian

3.1.5. Ảnh hưởng của nồng độ paracetamol

Phổ hấp thụ quang phân tử UV-Vis của dung dịch AuNPs với các nồng độ paracetamol khác nhau, lần lượt là: $5 \times 10^{-7} \text{ M}$; $7,5 \times 10^{-7} \text{ M}$; 10^{-6} M ; $5 \times 10^{-6} \text{ M}$; $7,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ được trình bày trong hình 6.



Hình 6. Phổ hấp thụ quang của dung dịch nano Au tại các nồng độ paracetamol khác nhau

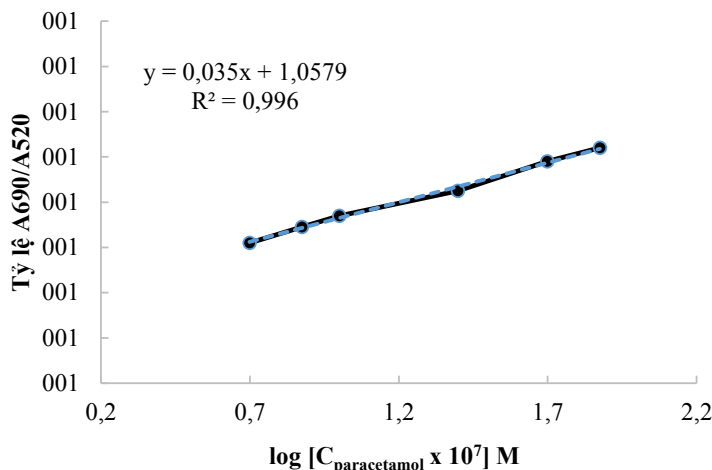
Khi tăng nồng độ paracetamol, độ hấp thụ quang tại bước sóng 690 nm cũng tăng tương ứng. Khi xây dựng mối quan hệ giữa tỷ lệ A_{690}/A_{520} và nồng độ paracetamol, chúng tôi nhận thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, tỷ lệ A_{690}/A_{520} tăng tuyến tính với logarit của nồng độ paracetamol. Như vậy, có thể xác định paracetamol bằng phương pháp hấp thụ phân tử UV-Vis trong những điều kiện đo tối ưu sau: Tín hiệu phân tích: tỷ lệ độ hấp thụ quang ở 2 bước sóng: A_{690}/A_{520} , $C_{NaCl} = 0,038$ M, pH 4,0, thời gian phản ứng: 17 phút.

3.2. Đánh giá phương pháp

Giá trị sử dụng của phương pháp được đánh giá thông qua việc xác định khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ đúng và độ lặp của phương pháp.

Tiến hành đo các dung dịch paracetamol có nồng độ khác nhau từ $2,5 \times 10^{-7}$ - $2,5 \times 10^{-5}$ M tại các điều kiện tối ưu vừa xác định ở trên. Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ độ hấp thụ quang tăng tuyến tính theo logarit nồng độ của paracetamol trong khoảng từ 5×10^{-7} - $7,5 \times 10^{-6}$ M. Phương trình đường chuẩn có dạng $A_{690}/A_{520} = 0,035 \times \log [C_{\text{paracetamol}} \times 10^7] + 1,058$ với hệ số hồi quy $R^2 = 0,9996$, cho thấy đường chuẩn có độ tuyến tính cao, phù hợp để ứng dụng phân tích trong thực tế.

Từ phương trình đường chuẩn, sử dụng công thức $LOD = 3S_y/b$ và $LOQ = 10S_y/b$ thu được giá trị $LOD = 1,7 \times 10^{-7}$ (mol/L) = 0,02 mg/L; $LOQ = 5,2 \times 10^{-7}$ (mol/L) = 0,07 mg/L. Giá trị LOD đạt được nhỏ hơn nhiều so với LOD của phương pháp động học quang phổ (0,75 mg/L) [1], nhỏ hơn hoặc tương đương với LOD của phương pháp điện di mao quản (0,08 mg/L) [5] và sắc ký lỏng HPLC-UV (LOD = 0,06 - 0,10 mg/L) [3, 4], cho thấy việc sử dụng dung dịch nano Au có thể cải thiện đáng kể độ nhạy của phương pháp phân tích.



Hình 7. Đường chuẩn xác định paracetamol bằng phương pháp phổ hấp thụ phân tử UV-Vis sử dụng dung dịch nano Au

Độ lệch chuẩn (%RSD) thu được khi đo lặp lại 10 lần dung dịch chuẩn paracetamol tại 3 nồng độ 5×10^{-7} M (~0,075 ppm); 5×10^{-6} M (~0,755 ppm) và 10^{-5} M (~5,11 ppm) lần lượt là 1,16%; 2,87%; 0,58%. Sai số giữa kết quả tính theo đường chuẩn và nồng độ ban đầu nằm trong khoảng từ 0,03% đến 0,1% (< 5%), đáp ứng yêu cầu của AOAC [8] cho phân tích hàm lượng nhỏ cỡ ppm.

3.3. Ứng dụng phân tích mẫu thực tế

3.3.1. Khảo sát các ảnh hưởng của nền mẫu

Hiện nay paracetamol được dùng rất phổ biến ở dạng viên nén đi kèm với tá dược như Na_2CO_3 hay trộn lẫn với một số chất như caffeine, dextromethorphan để tăng tác dụng giảm đau, hạ sốt. Ảnh hưởng của Na_2CO_3 , caffeine, dextromethorphan được khảo sát tại 4 mức nồng độ lớn gấp 10, 50, 100 và 500 lần so với nồng độ paracetamol có trong dung dịch. Kết quả cho thấy phần trăm sai số (%S) dao động trong khoảng từ 0,09-3,43%; 0,92-1,12%; 1,08-5,11%, tương ứng với Na_2CO_3 , caffeine, dextromethorphan. Mức sai số khi có mặt chất ảnh hưởng đều nhỏ hơn 6% cho thấy ảnh hưởng các chất này đến việc xác định paracetamol trong nền mẫu thuốc là không đáng kể và việc loại trừ Na_2CO_3 , caffeine, dextromethorphan ra khỏi mẫu thuốc là không cần thiết.

3.3.2. Kết quả phân tích mẫu thực tế

Các kết quả phân tích 5 mẫu thuốc chứa paracetamol bằng phương pháp phổ hấp thụ phân tử UV-Vis sử dụng dung dịch nano vàng được cho trong bảng 1. Các dung dịch mẫu thuốc đều làm đổi màu dung dịch nano vàng từ đỏ sang xanh. Mỗi mẫu thuốc được đo lặp 3 lần và lấy kết quả trung bình, giá trị RSD (%) dao động trong khoảng từ 0,65 đến 4,75%. Các kết quả đo cho giá trị sai khác với hàm lượng trên bao bì từ 3,75% đến 10,26%, cho thấy khả năng ứng dụng của phương pháp vào việc xác định kiểm tra chất lượng của các loại thuốc có chứa paracetamol trên thị trường.

Bảng 1. Kết quả xác định paracetamol trong mẫu dược phẩm

Mẫu thuốc	Hàm lượng đo được (mg)	Hàm lượng trên nhãn (mg)	Sai khác giữa hàm lượng đo được và hàm lượng trên nhãn (%)	RSD (%)
Napharangan	469	500	6,1	4,75
Panadol Extra	456	500	8,7	4,70
Vadol	457	500	8,5	3,59
Saviday	462	500	7,5	2,34
Panadol	450	500	9,9	0,65

4. KẾT LUẬN

Dung dịch nano vàng đã được sử dụng thành công để phát hiện và xác định hàm lượng paracetamol ở nồng độ thấp dựa trên tính chất cộng hưởng plasmon bề mặt của dung dịch hạt nano vàng với paracetamol. pH của dung dịch, nồng độ muối NaCl, và thời gian phản ứng là các thông số quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến độ nhạy của phương pháp. Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, có độ chính xác cao và giới hạn phát hiện rất thấp, LOD = $1,61 \times 10^{-7}$ M (20 ppb), so với các phương pháp phổ biến hiện nay. Phương pháp đã được áp dụng để xác định paracetamol trong 5 mẫu dược phẩm cho sự sai khác không lớn với hàm lượng trên nhãn và sẽ được tiếp tục nghiên cứu mở rộng để có thể áp dụng được với các đối tượng sinh học như nước tiểu và huyết tương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mouayed Q. Al-Abachi, Sarria A. Al-Safi, Hind S. Al-Ward, *Spectrophotometric kinetic methods for the determination of paracetamol in pure form and pharmaceutical preparations*, Iraqi Journal of Science, 2015, **56**:2704-2717.
2. Mallah M.A., Sherazi S.T., Bhanger M.I., Mahesar S.A., Bajeer M.A., *A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, **141**:64-70.
3. Mahesh Attimarad, *Simultaneous determination of paracetamol and lornoxicam by RP-HPLC in bulk and tablet formulation*, Pharmaceutical Methods, 2011, **2**(1):61-66.
4. Tânia A.P. Fernandes, João P. Aguiara, Ana I. Fernandes, João F. Pintob, *Quantification of theophylline or paracetamol in milk matrices by high-performance liquid chromatography*, Journal of Pharmaceutical Analysis, 2017, **7**(6):401-405.

5. Sonia Di Berardino, Renata Jinationowska, *Rapid and sensitive CZE method for quality control analysis of pharmaceuticals containing pseudoephedrine, triprolidine and paracetamol*, American Journal of Analytical Chemistry, 2014, **5**(9):613-619.
6. Bohnenstengel F., Kroemer H.K., Sperker B., *In vitro cleavage of paracetamol glucuronide by human liver and kidney β -glucuronidase: determination of paracetamol by capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999, **721**(2):295-299.
7. Nguyễn Văn Trang, Dương Minh Ngọc, Nguyễn Thùy Linh, Nguyễn Hoài Thu, Phạm Tiến Đức, Nguyễn Thị Ánh Hoàng, Phạm Thị Ngọc Mai, *Xác định hàm lượng cysteine trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp UV-Vis sử dụng hạt nano vàng*, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, 2018, **23**(5):39-44.
8. AOAC, Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements, *AOAC official methods of Analysis*, 2012.

SUMMARY

DETERMINATION OF PARACETAMOL IN PHARMACEUTICAL SAMPLES BY UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD USING SURFACE PLASMON RESONANCE (SPR) OF NANO GOLD SOLUTION

A highly sensitive molecular absorption UV-VIS method has been developed for the measurement of paracetamol in drug samples, based on the change in surface plasmon resonance (SPR) properties of gold nano particles in the presence of paracetamol. Visual detection of paracetamol trace in nano gold particle solution is possible through color change of solution from red to blue. The optical absorption ratio A_{690}/A_{520} increases linearly with logarithm of paracetamol concentration in the range 5×10^{-7} M - 2.5×10^{-5} M. At the optimum conditions including 0.038 M NaCl, pH 4 with incubation time of 17 minutes, the developed method has very low limit of detection (LOD) of 1.61×10^{-7} M, relative standard deviation %RSD < 5%. The influence of possible coexisting substances (Na_2CO_3 , caffeine, dextromethorphan) in the drug samples is negligible (%S < 6%). The colorimetric method was successfully applied for the determination of paracetamol in several drug samples.

Keywords: Paracetamol, Au nano particles, spectrophotometry, UV-Vis, hạt nano Au, quang phổ.

Nhận bài ngày 26 tháng 5 năm 2021

Phản biện xong ngày 05 tháng 6 năm 2021

Hoàn thiện ngày 07 tháng 6 năm 2021

⁽¹⁾ Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội