

PHƯƠNG PHÁP LỰA CHỌN BƯỚC SÓNG CHO PHỔ UV-VIS KẾT HỢP BÌNH PHƯƠNG TỐI THIỂU RIÊNG PHẦN ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI AMLODIPIN VÀ INDAPAMID DẠNG VIÊN NÉN

Đến toà soạn 10-05-2024

Nguyễn Đình Luyện¹, Nguyễn Quỳnh Giao², Phạm Phú Quốc²,
Nguyễn Hùng Nhật Duy², Nguyễn Duy Lưu^{2,3*}, Trần Thúc Bình^{3*}

¹ Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm Huế

² Khoa Dược, Trường Đại học Kỹ thuật Y – Dược Đà Nẵng

³ Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Huế

*Email: ndluu@dhktyduocdn.edu.vn; ttbinh@hueuni.edu.vn

SUMMARY

WAVELENGTH SELECTION METHOD FOR UV-VIS SPECTROSCOPY TO SIMULTANEOUSLY QUANTIFY AMLODIPINE AND INDAPAMIDE IN TABLET FORM

In this work, we employed the wavelength selection method to construct Partial Least Squares (PLS) models for simultaneous quantification of Amlodipine (AML) and Indapamide (IND) in pharmaceuticals. Three wavelength selection methods, including sensitivity ratio (SR), backward variable elimination (BVE), and genetic algorithm (GA), were utilized. The results demonstrated that the SR method selected the highest number of wavelengths, while the GA method selected the fewest. We also developed calibration models including PLS, SR-PLS, BVE-PLS, and GA-PLS. The statistical values for both the calibration and validation datasets were favorable. Evaluation based on recovery rate indicated that the recovery results were within the range of 90-110% for both AML and IND. The repeatability also yielded satisfactory outcomes, with RSD values < RSD calculated using the Horwitz function. The quantification results of AML and IND fell within the range of 90-110% compared to the labeled content, adhering to the regulations of the Vietnamese Pharmacopoeia V.

Keywords: Wavelength selection, Partial least square, Sensitivity Ratio, Backward Variable Elimination, Genetic Algorithm.

1. MỞ ĐẦU

Quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis đã cho thấy vai trò to lớn trong việc phân tích các mẫu do tính đơn giản, nhanh chóng và các phép đo không phải xử lý mẫu phức tạp. Các phương pháp phân tích đa biến đã được sử dụng rộng rãi trong phân tích định lượng đặc biệt là phương pháp bình phương tối thiểu riêng phần

(PLS). Tuy nhiên, hầu hết phổ UV-Vis thường được quét trong một khoảng bước sóng rộng, bao gồm tất cả các bước sóng mà có thể mang lại những thông tin quan trọng cũng như những thông tin nhiễu, chồng chéo vào trong các mô hình hiệu chuẩn đa biến, điều này tạo ra những thách thức to lớn cho việc xây dựng mô

hình PLS để có khả năng dự báo ở các mẫu chưa biết. Theo đó, nhiều phương pháp chemometric được phát triển để cải thiện độ ổn định dự đoán của các mô hình PLS [1]. Theo Tahir Mehmood và cộng sự, có 17 phương pháp lựa chọn bước sóng trong PLS được phân thành ba nhóm chính, bao gồm phương pháp lọc (filter), phương pháp bọc (wrapper) và phương pháp nhúng (embedded) [2].

Các phương pháp lọc lựa chọn bước sóng theo hai bước, trước tiên dữ liệu được đưa vào mô hình PLS, sau đó lựa chọn bước sóng được thực hiện bằng cách đặt một ngưỡng trên một đại lượng liên quan trong mô hình, từ đó thu được mô hình PLS đã được điều chỉnh. Phương pháp này nhanh chóng, dễ tính toán nhưng đối với tính liên quan đến dự đoán các biến đã được lựa chọn thì phương pháp này không đưa ra bất kỳ thông tin nào. Trong quá trình lựa chọn ngưỡng thì sẽ ảnh hưởng rất lớn đến khả năng dự báo của mô hình nên việc chọn được một ngưỡng tốt là một quá trình thực hiện khó khăn. Trong nhóm phương pháp lọc này bao gồm các phương pháp lựa chọn ngưỡng của vector trọng số tải (loading weight), hệ số hồi quy (RC), kiểm định Jackknife (JT), tỉ lệ độ nhạy (SR)... [2-3].

Phương pháp bọc sử dụng các phương pháp lọc theo cách lặp lại và kết hợp với một thuật toán tìm kiếm nào đó để điều chỉnh mô hình PLS [4]. Các thuật toán tìm kiếm này sẽ trích xuất các tập con bước sóng sao cho khả năng dự đoán của mô hình mới có căn bậc hai của tổng bình phương sai số dự đoán (RMSEP) là nhỏ nhất. Phương pháp này đòi hỏi phải xây dựng các thuật toán tương đối phức tạp, thời gian tính toán chậm hơn so với phương pháp lọc. Một số phương pháp đã được sử dụng như thuật toán di truyền (GA) [5-8], loại bỏ biến ngược (BVE) [9], loại bỏ biến không có thông tin (UVE) [10], quy trình loại bỏ có điều chỉnh

[11]... Các thuật toán này làm cho kết quả của việc tìm kiếm các bước sóng tối ưu cho mô hình PLS có thể là liên tục (BVE, UVE) hoặc rời rạc (GA).

Phương pháp nhúng kết hợp lựa chọn bước sóng và mô hình cùng được thực hiện trong cùng một bước. Tìm kiếm các tập con bước sóng tối ưu được tiến hành trên mỗi thành phần của mô hình PLS. Do đó phương pháp nhúng thường tốn ít thời gian hơn phương pháp bọc. Một số phương pháp nhúng đã được sử dụng trong việc lựa chọn bước sóng bao gồm phương pháp soft-thresholding (ST) [12], truncation PLS [13] và đóng góp của bước sóng có trọng số với PLS [14].

Cũng theo Tahir Mehmood và cộng sự đã so sánh hiệu quả việc sử dụng các phương pháp lựa chọn bước sóng cho thấy phương pháp BVE và SR là hai phương pháp có khả năng lựa chọn bước sóng mà hiệu quả của mô hình dự đoán PLS tốt nhất. Trong khi đó, phương pháp GA là phương pháp lựa chọn tối ưu được sử dụng nhiều trong các lĩnh vực khác nhau. Vì vậy, trong bài báo này chúng tôi sử dụng ba thuật toán bao gồm SR, BVE và GA để thực hiện lựa chọn các bước sóng quang phổ UV-Vis kết hợp phương pháp phân tích đa biến PLS để định lượng đồng thời Amlodipin (AML) và Indapamid (IND) trong dạng bào chế viên nén. Đồng thời cũng so sánh hiệu quả của việc dự đoán của các phương pháp trên mẫu thực tế thu được. Các phương pháp tính toán được thực hiện trên phần mềm R phiên bản 4.3.0, R.studio 2023.3.0 với các gói pls, plsValsel được sử dụng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Hóa chất và thiết bị

Hóa chất: Amlodipin besylate chuẩn 100,3% (tính trên nguyên trạng), Indapamid chuẩn 97,7% (tính trên nguyên trạng) được cung cấp bởi Viện kiểm

nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, Methanol (Fisher, Mỹ), nước cất.

Thiết bị: máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis UH5300 (Hitachi, Nhật Bản), cân điện tử Sartorius (độ chính xác 0,0001 g), bể rung siêu âm Elma (Đức), máy cất nước 2 lần Bibby Scientific A400D (Anh).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc: Các dung dịch chuẩn gốc AML 1000 $\mu\text{g/mL}$ và IND 1000 $\mu\text{g/mL}$ được pha bằng cách cân một lượng chính xác chất chuẩn AML và IND cho vào bình định mức 50 mL thêm MeOH vừa đủ, siêu âm trong 5 phút cho chất chuẩn hòa tan hoàn toàn sau đó bảo quản trong tủ lạnh. Dung dịch chuẩn làm việc hàng ngày được pha trực tiếp từ dung dịch chuẩn gốc theo các tỉ lệ được tính toán. Dung dịch chuẩn trước khi đem đi pha được lấy ra khỏi tủ lạnh để cân bằng đến nhiệt độ phòng (25°C).

Chuẩn bị mẫu thuốc: cân ngẫu nhiên 20 viên và tính khối lượng trung bình một viên, nghiền thành bột mịn và trộn đều. Cân chính xác một lượng bột $m_{\text{cân}} = 0,6325 \text{ g}$ tương ứng với 1,5 lần khối lượng trung bình của một viên thuốc Natrixam 1,5mg/5mg, hòa tan bằng MeOH trong bình định mức 50 mL. Để lắng trong 30 phút và lọc bằng màng lọc 0,45 μm . Hút chính xác 1 mL dịch lọc cho vào bình định mức 10 mL, thêm nước cất đến vạch, sau đó đo độ hấp thụ phân tử UV-Vis trong khoảng bước sóng 200 – 400 nm, bước nhảy 0,2 nm.

2.2.2 Thiết kế thí nghiệm

Trong phương pháp phân tích đa biến, tập nồng độ hiệu chuẩn để xây dựng mô hình phải được thiết kế phải đảm bảo các yêu cầu sau: có mặt tất cả các thành phần có trong mẫu phân tích, bao trùm không gian nồng độ cần phân tích, chứa các điều kiện phân tích, tổng độ hấp thụ không được

vượt quá giới hạn đo của thiết bị và đặc biệt là các mẫu phải chứa các nồng độ sao cho không tương quan với nhau (trực giao). Trong công việc hiện tại chúng tôi xây dựng các tập thí nghiệm hiệu chuẩn và kiểm tra dựa trên thiết kế thí nghiệm cấu trúc có tâm (CCD) [15]. Kết quả các giá trị nồng độ được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Các giá trị nồng độ trong tập hiệu chuẩn và tập kiểm tra

Tập nồng độ hiệu chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)			Tập nồng độ kiểm tra ($\mu\text{g/mL}$)		
Mẫu	IND	AML	Mẫu	IND	AML
T1	3	10	V1	3,5	15
T2	6	10	V2	5,5	15
T3	3	40	V3	3,5	35
T4	6	40	V4	5,5	35
T5	4,5	25	V5	4,5	25
T6	2,4	25	V6	3,1	25
T7	6,6	25	V6	5,9	25
T8	4,5	4	V8	4,5	11
T9	4,5	46	V9	4,5	39
T10	4,5	15			
T11	4,5	30			

2.2.3 Khảo sát tính chất của phổ UV-Vis của AML và IND

Tiến hành pha các dung dịch chuẩn IND 4,5 $\mu\text{g/mL}$, AML 25 $\mu\text{g/mL}$ và hỗn hợp bao gồm IND 4,5 $\mu\text{g/mL}$ và AML 25 $\mu\text{g/mL}$. Để khảo sát tính ổn định của phổ hấp thụ của các chất trong điều kiện phòng thí nghiệm, thực hiện quét phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn bị ở các thời gian: 0 phút, 30 phút, 60 phút, 90 phút, 120 phút, 150 phút và 180 phút ở cả hai điều kiện: có ánh sáng và để trong tối. Mặt khác, đánh giá tính cộng tính của hỗn hợp, thực hiện quét phổ lần lượt các dung dịch IND, AML và hỗn hợp của chúng ở các mức nồng độ trên. Dựa trên phổ lý thuyết của tổng độ hấp thụ của hai dung dịch IND và AML được so sánh với phổ của hỗn hợp để khẳng định tính cộng tính.

2.2.4 Phương pháp bình phương tối thiểu riêng phần (PLS)

Cho đến nay có rất nhiều thuật toán PLS khác nhau, tuy nhiên kết quả các thuật toán đó mặc dù có cách biến đổi khác nhau nhưng kết quả thu được đều như nhau. Trong phần này, chúng tôi giới thiệu thuật toán được sử dụng phổ biến nhất. Giả sử có tập dữ liệu độ hấp thụ $X_{(n,p)}$ (X là ma trận có kích thước n mẫu $\times$ p bước sóng) có mối quan hệ với tập giá trị nồng độ $y_{(n,1)}$ (y là vector nồng độ của một chất có kích thước n mẫu $\times$ 1) thông qua mối quan hệ tuyến tính $y = \alpha + X\beta + \varepsilon$ với các tham số hồi quy chưa biết α , β và sai số ε . Để thực hiện thuật toán PLS, đầu tiên các biến được căn giữa dữ liệu: $X_0 = X - 1\bar{x}^T$ và $y_0 = y - 1\bar{y}$. Đặt A là số thành phần biến tiềm ẩn được trích xuất. Khi $a = 1, 2, \dots, A$, thuật toán được thực hiện như sau:

(1) Tính tải trọng (LWs):

$$w_a = X_{a-1}^T y_{a-1} \quad (1)$$

Trọng số này xác định hướng trong không gian mở rộng bởi tối đa hiệp phương sai của X_{a-1} với y_{a-1} . Chuẩn hóa LWs để có độ dài bằng 1: $w_a \leftarrow w_a / \|w_a\|$

(2) Tính vector điểm t_a :

$$t_a = X_{a-1} w_a \quad (2)$$

(3) tính tải của X p_a bằng cách hồi quy biến X_{a-1} trên vector điểm số:

$$p_a = X_{a-1}^T t_a (t_a^T t_a)^{-1} \quad (3)$$

Tính tương tự với tải của y q_a :

$$q_a = y_{a-1}^T t_a (t_a^T t_a)^{-1} \quad (4)$$

(4) Giảm các giá trị của X_{a-1} và y_{a-1} bằng cách trừ đi đóng góp của t_a :

$$X_a = X_{a-1} - t_a p_a^T \quad (5)$$

$$y_a = y_{a-1} - t_a q_a \quad (6)$$

(5) Nếu $a < A$ quay lại thực hiện bước 1.

Các tải trọng (w), điểm (t) và tải (p , q) được tính ở mỗi lần lặp lại cho đến khi thỏa mãn điều kiện dừng ($a < A$) thu được ma trận W , T , P và vector q . Hệ số hồi quy trong mô hình tuyến tính được xác định bằng công thức $\beta = W(P^T W)^{-1} q$. Từ phương trình hồi quy đã xây dựng, phổ hấp thụ của chất phân tích chưa biết được đo và thay vào phương trình hồi quy để xác định nồng độ của các chất trong mẫu chưa biết [2],[16].

2.2.5 Lựa chọn bước sóng dựa trên phương pháp PLS

Các phương pháp lựa chọn bước sóng được thực hiện bởi các phương pháp SR, BVE và GA. Phương pháp SR bắt đầu bằng việc xây dựng một mô hình dự đoán sử dụng tất cả các bước sóng có sẵn. Sau đó, mỗi bước sóng được loại bỏ một cách tuần tự từ mô hình và hiệu suất của mô hình được đánh giá sau mỗi lần loại bỏ. Đối với từng bước sóng, SR được tính bằng cách lấy hiệu suất của mô hình ban đầu trừ đi hiệu suất của mô hình sau khi loại bỏ biến đó, và chia cho hiệu suất của mô hình ban đầu. SR càng cao, bước sóng càng quan trọng và ảnh hưởng đến hiệu suất dự đoán của mô hình. Sau khi tính toán SR cho tất cả các bước sóng, các bước sóng có SR cao nhất được coi là quan trọng nhất và được lựa chọn để xây dựng mô hình cuối cùng. Quá trình này được lặp lại cho đến khi đạt được số lượng bước sóng mong muốn hoặc khi không còn bước sóng nào có SR đáng kể [17].

Phương pháp BVE là một quy trình loại bỏ biến ngược cho các bước sóng không có hoặc ít thông tin hữu ích. Để thực hiện phương pháp BVE, các bước sóng được sắp xếp theo một chỉ số quan trọng nào đó, thường là các chỉ số lọc như hệ số hồi quy, tỉ lệ độ nhạy... Tiếp theo, một ngưỡng được sử dụng để loại bỏ những tập con của các bước sóng ít thông tin.

Sau đó, một mô hình được sử dụng lại với các bước sóng còn lại. Quá trình lặp lại cho đến khi mô hình cuối cùng có khả năng hoạt động tốt nhất [2].

Phương pháp GA là dựa trên ý tưởng của thuật toán di truyền trong sinh học để tìm ra tập con bao gồm các bước sóng tối ưu. Quá trình lựa chọn bước sóng theo thuyết di truyền bắt đầu bằng việc tạo ra một quần thể ban đầu gồm các tập con bước sóng ngẫu nhiên. Mỗi tập con bước sóng được đại diện bằng một cá thể trong quần thể. Tiếp theo, các cá thể được đánh giá dựa trên một hàm mục tiêu PLS. Sau đó, các toán tử di truyền như lai ghép (crossover) và đột biến (mutation) được áp dụng để tạo ra thế hệ tiếp theo của quần thể. Quá trình lai ghép kết hợp các tập con bước sóng của hai cá thể để tạo ra cá thể con mới, trong khi quá trình đột biến tạo ra các biến ngẫu nhiên trong tập con biến của một cá thể. Tiếp theo, các cá thể trong thế hệ mới được đánh giá và lựa chọn các cá thể tốt nhất để tiếp tục vào thế hệ kế tiếp. Quá trình này được lặp lại cho đến khi đạt được tiêu chuẩn dừng, chẳng hạn như số lần lặp tối đa hoặc khi tìm thấy tập con biến tốt nhất [5- 8].

2.2.6 Đánh giá các phương pháp định lượng đồng thời AML và IND trong viên nén

Đánh giá độ đúng: thực hiện thêm chuẩn IND và AML ở các mức nồng độ tương ứng với 80%, 100%, 120% nồng độ của các chất trong mẫu phân tích vào trong mẫu trắng. Đo phổ hấp thụ của hỗn hợp thu được, mỗi mức nồng độ được tiến hành 3 lần. Kết quả được tính dựa trên các phương pháp hiệu chuẩn đã xây dựng. Độ đúng được xác định dựa trên độ thu hồi của chuẩn AML và IND.

Đánh giá độ chính xác: Độ chính xác được tiến hành đánh giá trên mẫu thực, đánh giá thông qua độ lặp lại. Độ lặp lại được thực hiện trong 6 lần phân tích bắt

đầu từ giai đoạn cân mẫu, thực hiện trong cùng một ngày. Quy trình thực nghiệm chuẩn bị mẫu được mô tả trong phần chuẩn bị mẫu thuốc.

2.2.7 Định lượng đồng thời AML và IND

Quy trình định lượng AML và IND sau khi được thẩm định được sử dụng để định lượng AML và IND trong mẫu thuốc Natrixam 1,5mg/5mg đang được lưu hành trên thị trường. Tiến hành chuẩn bị mẫu thuốc như trong phần đã mô tả. Hàm lượng AML và IND so với hàm lượng ghi trên nhãn được tính theo công thức:

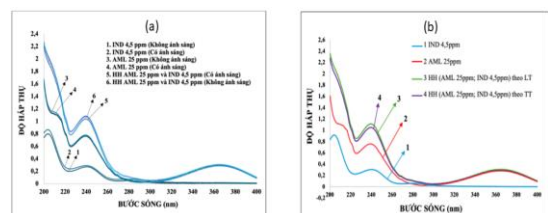
$$X(\%) = \frac{C \times 10 \times 50 \times m_{TB}}{1000 \times 1,5 \times m_C \times m_X} \times 100\% \quad (7)$$

Trong đó:

- C là nồng độ tính được từ kết quả dự báo của mô hình hồi quy đã xây dựng
- m_{TB} : khối lượng trung bình của một viên, bằng 0,6325 g
- m_C : Khối lượng cân của thuốc (g)
- m_X : hàm lượng của AML hoặc IND được ghi trên nhãn (mg/viên)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tính chất của phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của AML và IND

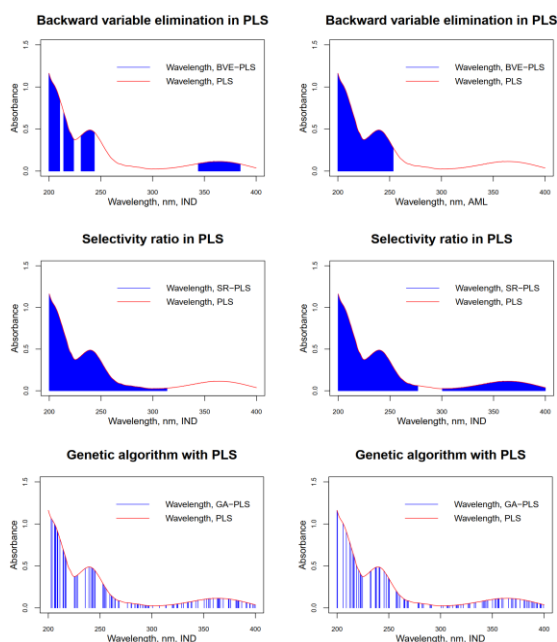


Hình 1. (a) Phổ hấp thụ của 6 lần đo các chuẩn IND 4,5 µg/mL, AML 25 µg/mL và hỗn hợp IND – AML ở khác thời gian khác nhau. (b) Tính cộng tính của phổ hỗn hợp IND và AML.

Hình 1a cho thấy không có sự khác biệt về phổ của 6 lần đo các dung dịch chuẩn ở các thời gian khác nhau khi chồng phổ lên nhau. Phổ hấp thụ gần như trùng lặp hoàn toàn cho thấy với điều kiện phòng thí nghiệm về ánh sáng và thời

gian thực hiện thì phổ UV- Vis của các đơn chất và hỗn hợp không bị ảnh hưởng. Mặt khác, hình 1b cho thấy phổ theo lý thuyết bằng tổng độ hấp thụ của dung dịch chuẩn IND 4,5 µg/mL và AML 25 µg/mL với phổ được tạo ra từ hai chất chuẩn hầu như không có sự khác biệt, điều này thể hiện tính cộng tính tốt của hỗn hợp chứa IND và AML.

3.2 Lựa chọn bước sóng dựa trên phương pháp SR-PLS, BVE-PLS và GA-PLS



Hình 2. Các bước sóng được lựa chọn theo các phương pháp BVE, SR và GA.

Kết quả của việc áp dụng các thuật toán lựa chọn bước sóng được thể hiện trong bảng 2 và hình 2. Với phổ UV-Vis được quét từ bước sóng 200 – 400 nm, khoảng quét là 0,2 nm đã tạo ra một tập dữ liệu độ hấp thụ với 1001 bước sóng. Tùy thuộc vào phương pháp được sử dụng, số lượng bước sóng được giữ lại có sự khác nhau đáng kể. Với phương pháp GA-PLS, số lượng bước sóng được lựa chọn là ít nhất với 105 bước sóng (chiếm 10,5%) được giữ lại và không liên tục, rời rạc ở các vị trí khác nhau (hình 2). Phương pháp

BVE-PLS và SR-PLS do lựa chọn theo cách lọc theo một ngưỡng nhất định nên các bước sóng được lựa chọn thường nằm theo từng cụm và liên tục (hình 2a, 2b). Số lượng bước sóng được giữ lại theo phương pháp BVE-PLS lần lượt là 268 (chiếm 26,7%) và 370 (chiếm 37,0%) đối với AML và IND. Số lượng bước sóng được giữ lại theo phương pháp SR-PLS là nhiều nhất, lần lượt 883 (chiếm 88,3%) và 569 (chiếm 56,8%) đối với AML và IND. Như vậy, các phương pháp lựa chọn bước sóng được áp dụng đã loại bỏ đi một lượng đáng kể các bước sóng để đưa vào trong việc xây dựng mô hình PLS.

3.3 Xây dựng phương pháp phân tích đồng thời AML và IND

Khả năng dự đoán khi sử dụng phương pháp PLS phụ thuộc việc lựa chọn số lượng biến tiềm ẩn từ quá trình hiệu chuẩn. Đây là một bước quan trọng vì nếu giữ lại nhiều biến tiềm ẩn sẽ vô tình đưa những thông tin nhiễu, không cần thiết vào trong mô hình, dẫn đến khả năng dự đoán không chính xác. Ngược lại, nếu giữ lại quá ít biến tiềm ẩn thì sẽ bị mất mát thông tin từ tập hiệu chuẩn. Phương pháp được sử dụng để xác định các biến tiềm ẩn trong trường hợp này là phương pháp xác thực chéo loại bỏ một lần [18]. Theo đó, tập hiệu chuẩn được chia là 45 tập con, mô hình sẽ loại bỏ một tập con và xây dựng trên số tập con hiệu chuẩn còn lại, tập bị loại bỏ được sử dụng để đánh giá khả năng dự đoán của mô hình thông qua giá trị căn bậc hai của tổng bình phương các sai số (RMSE). Công thức tính RMSE như sau:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^N (C_0 - C_t)^2}{N}} \quad (8)$$

Trong đó: C_0 là nồng độ đã biết trong tập hiệu chuẩn hoặc tập kiểm tra; C_t : Nồng độ được tính từ mô hình hiệu chuẩn, N : tổng số mẫu.

Bảng 2. Lựa chọn bước sóng bằng các phương pháp khác nhau

Phương pháp	Thành phần	Số lượng bước sóng	Các bước sóng được chọn (nm)
BVE-PLS	IND	370	200-210,4; 214,2 – 223,8; 231- 243,8; 344,2 – 384,6
	AML	268	200-253,4
GA-PLS	IND	105	202,8 – 399,8 (rời rạc)
	AML	105	200 – 399,4 (rời rạc)
SR-PLS	IND	569	200 – 313,6
	AML	883	200 – 276,8; 300,6 - 400

Các thông số thống kê đánh giá tính hiệu quả của các phương pháp PLS, BVE-PLS, SR-PLS và GA-PLS được thể hiện qua bảng 3. Giá trị RMSECV giải thích tính chắc chắn của mô hình, giá trị RMSEC biểu thị mức độ phù hợp của mô hình. Kết

Bảng 3. Các thông số thống kê đánh giá trên tập hiệu chuẩn thông qua các phương pháp PLS, BVE-PLS, SR-PLS và GA-PLS

Các giá trị thống kê	Phương pháp PLS		Phương pháp SR.PLS		Phương pháp BVE.PLS		Phương pháp GA.PLS	
	IND	AML	IND	AML	IND	AML	IND	AML
Số biến tiềm ẩn	4	2	4	3	3	4	4	2
RMSECV	0,1285	0,3852	0,1418	0,3808	0,1438	0,3443	0,1306	0,3801
RMSEC	0,1094	0,3540	0,1202	0,3367	0,1290	0,2858	0,1127	0,3488

Bảng 4. Kết quả đánh giá thống kê trên tập kiểm tra bằng các phương pháp PLS, SR-PLS, BVE-PLS và GA-PLS

Nồng độ tập kiểm tra ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Phần trăm tìm lại (%)							
			Phương pháp PLS		Phương pháp SR.PLS		Phương pháp BVE.PLS		Phương pháp GA.PLS	
	IND	AML	IND	AML	IND	AML	IND	AML	IND	AML
V1	3,5	15	101	102,8	100,7	101,2	103,4	100,8	100,5	103
V2	5,5	15	99,1	105,1	99,4	103,6	103,1	107,3	98,3	105,7

quả cho thấy, cả 4 phương pháp đều cho các giá trị RMSECV, RMSEC nhỏ.

Để kiểm tra khả năng dự đoán của các mô hình đã xây dựng, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng dự đoán nồng độ của AML và IND trong các tập kiểm tra. Kết quả thể hiện trong bảng 4. Độ tìm lại của IND và AML lần lượt trong khoảng 96,9 – 103,9%, 97,3 – 106,3% đối với phương pháp PLS; 95,7% – 102,8%, 93,9% – 105,4% đối với phương pháp SR-PLS; 100,9% – 105,6%, 96,2% - 107,1% đối với phương pháp BVE-PLS; 95,1% - 103,9%; 97,3% - 106,4% đối với phương pháp GA-PLS. Kết quả này cho thấy hầu hết các phương pháp lựa chọn bước sóng và phương pháp PLS đều cho khả năng tìm lại nằm trong khoảng 90-107% theo quy định của AOAC [19]. Tuy nhiên, với phương pháp BVE-PLS thì khả năng dự đoán vượt ngưỡng theo quy định, điều này cho thấy phương pháp BVE-PLS đã thực hiện lựa chọn các bước sóng chưa thực sự tối ưu.

V3	3,5	35	99,4	105,9	98,7	105,3	104,9	107,1	98,7	106,1
V4	5,5	35	99,7	106,3	99,4	105,4	102,7	107,1	98,8	106,4
V5	4,5	25	103,9	102,5	102,8	101,6	105,3	101,9	103,9	102,3
V6	3,1	25	103,5	103,7	101,4	102,8	105,6	102,8	103,3	103,7
V7	5,9	25	103,7	100,8	102,8	100,1	104,4	100,7	103,7	100,7
V8	4,5	11	102,3	97,3	101,8	93,9	104,5	96,2	101,2	97,3
V9	4,5	39	96,9	100,3	95,7	99,3	100,9	101,2	95,1	100,4
Trung bình (%)			101,1	102,7	100,3	101,4	103,9	102,7	100,5	102,7
SD			2,46	2,9	2,29	3,51	1,48	3,62	2,97	2,98
RMSEP			0,123	1,153	0,107	1,004	0,183	1,312	0,137	1,176

Giá trị RMSEP của các phương pháp hiệu chuẩn đều nhỏ hơn 10% nồng độ tâm của mẫu hiệu chuẩn, tương ứng với 0,45 đối với IND và 2,5 đối với AML. Kết quả này cho thấy các phương pháp cho kết quả dự đoán mắc sai số nhỏ. Đặc biệt đối với phương pháp SR-PLS, kết quả giá trị RMSEP đều nhỏ hơn các phương pháp còn lại, điều này cho thấy khả năng lựa chọn các bước sóng theo phương pháp này cho hiệu quả dự đoán tốt.

3.4 Đánh giá các phương pháp phân tích theo phương pháp lựa chọn bước sóng

3.4.1 Độ đúng

Sau khi thêm chuẩn ở các mức khác nhau vào mẫu trắng và đo hấp thụ UV-Vis của các mẫu, nồng độ của IND và AML được tính theo các phương pháp đã được xây dựng. Kết quả đánh giá độ đúng được trình bày ở bảng 5.

Theo AOAC, độ thu hồi chấp nhận ở mức nồng độ dưới 10 µg/mL trong khoảng từ 80-110%; mức nồng độ dưới 100 µg/mL trong khoảng 90-107%. Kết quả từ bảng 5 cho thấy, độ thu hồi của các phương pháp để xác định độ tìm lại của IND và AML đều nằm trong khoảng cho phép, vậy có thể kết luận rằng các phương pháp định lượng đồng thời IND và AML là đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ đúng của các phương pháp PLS, SR-PLS, BVE-PLS và GA-PLS

Nồng độ thêm chuẩn (µg/mL)		Độ thu hồi (%)							
IND	AML	Phương pháp PLS		Phương pháp SR-PLS		Phương pháp BVE-PLS		Phương pháp GA-PLS	
		IND	AML	IND	AML	IND	AML	IND	AML
3,6	12	101,39	101,17	100,83	98,58	107,78	102,42	100	102,42
3,6	12	100,56	101,42	99,72	98,25	107,5	102,83	98,89	102,67
3,6	12	104,72	104,58	104,17	102,75	111,39	107,92	103,33	106,08
Trung bình		102,2	102,4	101,6	99,9	108,9	104,4	100,7	103,7

	RSD(%)	2,15	1,85	2,28	2,51	1,99	2,93	2,29	1,97
4,5	15	100,67	104,2	99,78	102,87	100	102	100,22	103,8
4,5	15	100,67	104,13	100	103,13	99,78	101,93	100,89	103,73
4,5	15	99,56	103,27	98,89	103	102,67	104,87	98,89	103,87
Trung bình		100,3	103,9	99,6	103	100,8	102,9	100	103,8
	RSD(%)	0,639	0,498	0,590	0,126	1,59	1,63	1,02	0,067
5,4	18	96,67	103,28	95,19	100,28	103,7	106,11	95,19	104
5,4	18	97,59	102,83	96,85	100,06	103,7	105,11	96,48	103,39
5,4	18	96,67	103,17	95,19	100,11	103,33	105,39	95,37	103,83
Trung bình		97	103,1	95,7	100,2	103,6	105,5	95,7	103,7
	RSD(%)	0,548	0,228	1,008	0,116	0,206	0,489	0,730	0,303

Bảng 6. Kết quả độ lặp lại của các phương pháp PLS, SR-PLS, BVE-PLS và GA-PLS

TT	PLS		SR-PLS		BVE-PLS		GA-PLS	
	IND (µg/mL)	AML (µg/mL)	IND (µg/mL)	AML (µg/mL)	IND (µg/mL)	AML (µg/mL)	IND (µg/mL)	AML (µg/mL)
Lần 1	4,44	14,29	4,45	14,45	4,62	15,48	97,56	96
Lần 2	4,38	14,42	4,4	14,37	4,6	15,53	97,11	96,93
Lần 3	4,36	14,47	4,37	14,44	4,58	15,49	96,22	97,27
Lần 4	4,36	14,41	4,38	14,44	4,56	15,49	96	96,8
Lần 5	4,28	14,55	4,27	14,5	4,52	15,53	93,56	97,8
Lần 6	4,3	14,53	4,3	14,4	4,54	15,54	94,44	97,53
Mean	4,35	14,45	4,36	14,43	4,57	15,51	4,31	14,56
SD	0,057	0,095	0,066	0,045	0,037	0,026	0,069	0,095
RSD (%)	1,32	0,655	1,52	0,309	0,819	0,168	1,61	0,655
RSD _{Horwitz}	6,38	5,32	6,38	5,32	6,38	5,32	6,38	5,32

3.4.2 Độ chính xác

Tiến hành thực hiện phân tích lặp lại 6 lần trên cùng một mẫu, mỗi lần bắt đầu từ cân mẫu. Để đánh giá độ lặp lại của phương pháp, dựa vào kết quả của các lần phân tích lặp lại, tính độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối (RSD), yêu cầu giá trị $RSD < RSD_{\text{Horwitz}}$. Kết quả được trình bày

trong bảng 6. Kết quả cho thấy giá trị RSD của nồng độ tính được nhỏ hơn giá trị RSD_{Horwitz} .

Như vậy, từ kết quả thẩm định ở trên cho thấy rằng các phương pháp PLD, SR-PLS, BVE-PLS, GA-PLS có độ ổn định, độ đúng tốt, phù hợp để định lượng đồng thời AML và IND trong các mẫu thuốc

3.5 Định lượng

Áp dụng các phương pháp đã xây dựng để định lượng AML và IND trong viên nén Natrixam 1,5mg/5mg được bán trên thị trường Đà Nẵng. Kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Kết quả phân tích ANOVA để đánh giá sự khác biệt khi so sánh kết quả trung bình hàm lượng của IND và AML trong thuốc theo các phương pháp PLS, SR-PLS, BVE-PLS, GA-PLS với phương pháp HPLC cho thấy: đối với IND không có sự khác biệt giữa các kết quả phân tích, đối với AML: không có sự khác biệt giữa các kết quả phân tích trừ phương pháp BVE-PLS có giá trị trung bình kết quả phân tích khác nhau đáng kể với các nhóm phương pháp còn lại và phương pháp HPLC, kết quả này cũng phù hợp với kết quả khi đánh giá của phương pháp BVE-PLS trên tập kiểm tra được xây dựng trong phòng thí nghiệm.

Dựa trên kết quả thực nghiệm cho thấy rằng, hàm lượng các hoạt chất AML và IND so với hàm lượng ghi trên nhãn của

mẫu thuốc Natrixam 1,5mg/5mg nằm trong giới hạn cho phép (90,0% - 110,0%). Các mẫu thuốc đều đạt yêu cầu về hàm lượng theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam V.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thực hiện được một số phương pháp lựa chọn bước sóng trong phương pháp PLS để loại bỏ một số bước sóng mà có thể khi đưa vào xây dựng mô hình hồi quy PLS có thể gây sai số lớn. Kết quả cho thấy phương pháp SR-PLS cho hiệu quả dự báo tốt nhất trong khi đó phương pháp BVE-PLS cho kết quả dự báo mắc phải sai số lớn nhất. Nghiên cứu cũng đã áp dụng được các phương pháp PLS, SR-PLS, BVE-PLS, GA-PLS để định lượng đồng thời AML và IND trong viên nén, kết quả của phương pháp có độ đúng độ chính xác cao, kết quả phân trăm hàm lượng so với hàm lượng ghi trên nhãn nằm trong giới hạn cho phép và đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam V.

Bảng 7. Kết quả định lượng mẫu thuốc viên nén Natrixam 1,5mg/5mg trên thị trường

Phương pháp		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	RSD
PLS	IND (mg)	1,45	1,49	1,47	1,47	
	%	96,7	99,3	98	98	1,33
	AML (mg)	4,8	4,88	4,82	4,83	
	%	96	97,6	96,4	96,6	0,86
SR-PLS	IND (mg)	1,43	1,46	1,46	1,45	
	%	95,3	97,3	97,3	96,6	1,19
	AML (mg)	4,87	4,93	4,9	4,9	
	%	97,4	98,6	98	98	0,61
BVE-PLS	IND (mg)	1,46	1,49	1,48	1,48	
	%	97,3	99,3	98,7	98,4	1,04
	AML (mg)	5,19	5,31	5,26	5,25	
	%	103,8	106,2	105,2	105,1	1,15

GA-PLS	IND (mg)	1,45	1,48	1,47	1,47	
	%	96,7	98,7	98	97,8	1,04
	AML (mg)	4,81	4,87	4,82	4,83	
	%	96,2	97,4	96,4	96,7	0,67
HPLC	IND (mg)	1,49	1,49	1,51	1,5	
	%	99,3	99,3	100,7	99,8	0,81
	AML (mg)	4,73	4,8	4,75	4,76	
	%	94,6	96	95	95,2	0,76

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Xu H, Liu Z, Cai W, Shao X, (2009). A wavelength selection method based on randomization test for near-infrared spectral analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **97(2)**, 189-193.
- [2] Mehmood T, Sæbø S, Liland KH, (2020). Comparison of variable selection methods in partial least squares regression. *Journal of Chemometrics*, **34(6)**, e3226.
- [3] Mehmood T, Liland KH, Snipen L, Sæbø S, (2012). A review of variable selection methods in partial least squares regression. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, **118**, 62-69.
- [4] Wold S, Johansson E, Cocchi M, (1993). PLS: partial least squares projections to latent structures. In *3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications*. Kluwer ESCOM Science Publisher. 523-550.
- [5] Sratthaphut L, Ruangwises N, (2012). Genetic algorithms-based approach for wavelength selection in spectrophotometric determination of vitamin B12 in pharmaceutical tablets by partial least-squares. *Procedia engineering*, **32**, 225-231.
- [6] Niazi A, Leardi R, (2012). Genetic algorithms in chemometrics. *Journal of Chemometrics*, **26(6)**, 345-351.
- [7] Kepplinger D, Filzmoser P, Varmuza K, (2017). Variable selection with genetic algorithms using repeated cross-validation of PLS regression models as fitness measure. *arXiv preprint arXiv:1711.06695*.
- [8] Katoch S, Chauhan S S, Kumar V, (2021). A review on genetic algorithm: past, present, and future. *Multimedia tools and applications*, **80**, 8091-8126.
- [9] Frank IE, (1987). Intermediate least squares regression method. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, **1(3)**, 233-242.
- [10] Centner V, Massart DL, De Noord OE, De Jong S, Vandeginste BM, Sterna C, (1996). Elimination of uninformative variables for multivariate calibration. *Analytical chemistry*, **68(21)**, 3851-3858.
- [11] Mehmood T, Martens H, Sæbø S, Warringer J, Snipen L, (2011). A Partial Least Squares based algorithm for parsimonious variable selection. *Algorithms for Molecular Biology*, **6**, 1-12.
- [12] Sæbø S, Almøy T, Aarøe J, Aastveit AH, (2008). ST- PLS: a multi- directional nearest shrunken centroid type classifier via PLS. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, **22(1)**, 54-62.
- [13] Liland KH, Høy M, Martens H, Sæbø S, (2013). Distribution based truncation for variable selection in subspace methods for multivariate regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **122**, 103-111.
- [14] Lin W, Hang H, Zhuang Y, Zhang S, (2018). Variable selection in partial least squares with the weighted variable contribution to the first singular value of the covariance matrix. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **183**, 113-121.

- [15] Bhattacharya S, (2021). Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy. In *Response surface methodology in engineering science*, IntechOpen.
- [16] Haaland DM, Thomas EV, (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical chemistry*, **60**(11), 1193-1202.
- [17] Farrés M, Platikanov S, Tsakovski S, Tauler R, (2015). Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. *Journal of Chemometrics*, **29**(10), 528-536.
- [18] Olivieri AC, (2018). *Introduction to multivariate calibration: A practical approach*. Switzerland: Springer.
- [19] AOAC International, (2016). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis*, Appendix F, 1-18.