XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI IBUPROFEN, METHYLPARABEN VÀ PROPYLPARABEN TRONG HỖN DỊCH UỐNG IBUPROFEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Nguyễn Xuân Diệu[a], Nguyễn Đào Nhật Linh[b], Trần Hồng Đoan[c], Vương Thị Thu Hà[d], Triệu Thị Thu Hằng[e], Ngô Đăng Trường Hải[f]

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và tối ưu hóa quy trình định lượng đồng thời ibuprofen (IBU), methylparaben (MP) và propylparaben (PP) trong hỗn dịch uống ibuprofen bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Các điều kiện sắc ký được tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) kết hợp với thiết kế Box-Behnken (BBD) và quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH. Mẫu phân tích được xử lý bằng phương pháp lắc có hỗ trợ sóng siêu âm với dung môi pha mẫu là ethanol, sau đó lọc và phân tích bằng HPLC trên cột C18 (250 × 4,6 mm; 5µm), với đầu dò PDA ở bước sóng 214 nm và hệ pha động ACN-H_3PO_4 0,05 % (55:45, tt/tt). Phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu và tương thích hệ thống; có tính tuyến tính cao (R = 0,9999); độ chính xác phù hợp (RSD % < 2,0 %); độ thu hồi (% REV) nằm trong giới hạn chấp nhận (98,0 - 102,0 %). Khoảng xác định của MP, PP và IBU có giá trị lần lượt là 0,016 - 0,024 mg/ml, 0,004 - 0,005 mg/ml và 0,16 - 0,24 mg/ml. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là IBU (0,04 µg/ml và 0,13 µg/ml), MP (0,01 µg/ml và 0,03 µg/ml), PP (0,05 µg/ml và 0,17 µg/ml). Phương pháp đã được ứng dụng để phân tích một số mẫu hỗn dịch uống ibuprofen trên thị trường.

Từ khóa: *Ibuprofen, Methylparaben, Propylparaben, HPLC, RSM, Box-Behnken.*

SIMULTANEOUS HPLC QUANTIFICATION OF IBUPROFEN, METHYLPARABEN, AND PROPYLPARABEN IN ORAL SUSPENSION

Abstract:

This study developed an HPLC procedure for simultaneously quantifying ibuprofen (IBU), methylparaben (MP) and propylparaben (PP) in an oral ibuprofen suspension. Chromatographic conditions were optimized using response surface methodology (RSM) with a Box-Behnken design (BBD), and validation was performed according to ICH guidelines. Samples were processed by sonication in ethanol, filtered and

[a] Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. e-mail: dieu98938@donga.edu.vn
[b] Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. e-mail: linh101278@donga.edu.vn
[c] Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. e-mail: doan100466@donga.edu.vn
[d] Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. e-mail: ha99955@donga.edu.vn
[e] Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. e-mail: hang100997@donga.edu.vn
[f] Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á. e-mail: haindt@donga.edu.vn

analyzed on a C18 column (250 × 4,6 mm; 5µm) with PDA detection at 214 nm, using an ACN-H_3PO_4 0,05 % (55:45, v/v) mobile phase. The approach demonstrated good specificity, linearity (R = 0.9999), precision (RSD < 2.0 %), and accuracy (recovery 98.0-102.0%). The working ranges for MP, PP, and IBU were 0.016-0.024 mg/mL, 0.004-0.005 mg/mL, and 0.16-0.24 mg/mL, respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.01/0.03 µg/mL (MP), 0.05/0.17 µg/mL (PP) and 0.04/0.13 µg/mL (IBU). The validated method was applied to the analysis of commercial ibuprofen oral suspensions.

Keywords: *Ibuprofen, Methylparaben, Propylparaben, HPLC, RSM, Box-Behnken.*

Mở đầu

Ibuprofen là một hoạt chất thuộc nhóm thuốc NSAIDs (Jan-Roblero & Cruz-Maya, 2023), có tác dụng giảm đau, kháng viêm và hạ sốt (Rainsford, 2009). Theo WHO, ibuprofen là một trong những loại thuốc không kê đơn thiết yếu, được sử dụng phổ biến (WHO, 2021). Tại Việt Nam, ibuprofen được bào chế với nhiều dạng khác nhau như viên nén, viên nang, hỗn dịch uống, nhằm đáp ứng nhu cầu sử dụng cho nhiều đối tượng, đặc biệt là trẻ em và người cao tuổi gặp khó khăn khi dùng thuốc dạng rắn (Bộ Y Tế, 2022; Nacéra et al., 2025). Trong đó, hỗn dịch uống ibuprofen là một trong những chế phẩm được sử dụng phổ biến nhờ ưu điểm dễ uống, dễ điều chỉnh liều lượng và có hiệu quả điều trị tốt (Martinelli et al., 2021).

Nhằm đảm bảo độ ổn định của các chế phẩm lỏng như hỗn dịch, các chất bảo quản thường được đưa vào công thức bào chế. Trong đó, methylparaben và propylparaben là hai chất bảo quản được sử dụng phổ biến (Rowe et al., 2006). Điều đáng chú ý là việc lạm dụng parabens với hàm lượng vượt quá giới hạn cho phép có thể gây ra rối loạn nội tiết, viêm da và làm tăng nguy cơ ung thư (Chatterjee et al., 2024; Liao et al., 2025). Do đó, các cơ quan quản lý dược phẩm luôn yêu cầu kiểm soát chặt chẽ hàm lượng parabens trong chế phẩm dùng đường uống (Dodge et al., 2015).

Hiện nay, đã có một số công trình nghiên cứu được công bố về phương pháp định lượng riêng biệt ibuprofen, methylparaben hoặc propylparaben (Kelani et al., 2023; Wu et al., 2025). Tuy nhiên, vì sự chênh lệch về hàm lượng sử dụng trong chế phẩm và bước sóng phát hiện khi định lượng, nên vẫn còn nhiều khó khăn, hạn chế khi xây dựng phương pháp định lượng đồng thời cả ba chất này trong cùng chế phẩm hỗn dịch uống. Chính vì lẽ đó, hầu hết trong các dược điển thông dụng như BP, USP hay DĐVN V hiện hành chỉ có những chuyên luận riêng về phương pháp định lượng đơn chất, vẫn chưa có chuyên luận nào đề cập đến việc định lượng đồng thời ibuprofen, methylparaben và propylparaben. Ngoài ra, so với những phương pháp định lượng hiện nay, HPLC là phương pháp thường được sử dụng phổ biến và rộng rãi nhờ độ đặc hiệu, độ lặp lại ổn định, độ chính xác cao, khả năng nhận dạng và phân tách được nhiều chất tốt (Trần Tử An, 2021; Võ Thị Bạch Huệ & Vĩnh Định, 2019). Bên cạnh đó, số lượng nghiên cứu liên quan đến quy trình định lượng của ba chất này trên

nền chế phẩm hỗn dịch uống còn tương đối hạn chế. Đồng thời, việc ứng dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) kết hợp với thiết kế Box-Behnken (BBD) để tối ưu hóa các điều kiện sắc ký cũng chưa được khai thác rộng rãi trong các nghiên cứu đã công bố.

Chính vì những lý do trên, nhóm nghiên cứu đã quyết định thực hiện đề tài *"Xây dựng và tối ưu hóa quy trình định lượng đồng thời ibuprofen, methylparaben và propylparaben trong hỗn dịch uống ibuprofen bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)"* với các mục tiêu như sau: Xây dựng được quy trình định lượng đồng thời ba chất này trong hỗn dịch uống ibuprofen bằng phương pháp HPLC; tối ưu hóa quy trình định lượng bằng phương pháp RSM; thẩm định quy trình đã xây dựng theo hướng dẫn của ICH và ứng dụng quy trình trên một số chế phẩm hỗn dịch uống ibuprofen đang lưu hành trên thị trường.

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu hỗn dịch uống ibuprofen tự tạo (mẫu chứa 2,0 % IBU, 0,2 % MP và 0,05 % PP và tá dược gồm: NaCMC, propylen glycol, carbomer, glycerin và menthol). Mẫu giả dược có thành phần tương tự mẫu hỗn dịch uống ibuprofen tự tạo nhưng không chứa ba chất này.

Mẫu thị trường được lựa chọn là hỗn dịch uống ibuprofen có sử dụng methylparaben và propylparaben làm chất bảo quản, còn hạn dùng, đang lưu hành hợp pháp và có đầy đủ thông tin về nguồn gốc, xuất xứ và số lô.

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình định lượng

Khảo sát dung môi pha mẫu

Khảo sát hai dung môi pha mẫu (DMPM) là methanol (MeOH) và ethanol (EtOH) - dung môi thường được sử dụng nhiều trong quá trình xử lý mẫu chứa IBU và chất bảo quản nhóm parabens (Dinç-Zor & Aksu Dönmez, 2021; Pippalla et al., 2024; Rebbeck et al., 2006). Mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu giả dược thêm chuẩn (GDTC) được sử dụng trong khảo sát DMPM.

Mẫu chuẩn hỗn hợp có nồng độ lần lượt khoảng 0,20 mg/ml (IBU), 0,020 mg/ml (MP) và 0,005 mg/ml (PP). Mẫu giả dược thêm chuẩn được chuẩn bị theo [18],[19] bằng cách cân khoảng 0,5 g mẫu, thêm 20 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút, định mức đến 50 ml, bổ sung các dung dịch chuẩn IBU, MP và PP sao cho đạt nồng độ tương đương mẫu chuẩn hỗn hợp, sau đó lọc qua màng 0,45 µm.

Các mẫu được phân tích bằng HPLC ở nhiệt độ 30 °C trên cột C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) với pha động ACN-H_3PO_4 0,1 % (60:40, tt/tt), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl và phát hiện bằng PDA tại 240 nm.

Việc lựa chọn dung môi dựa trên các chỉ tiêu: hình dạng pic, hệ số bất đối xứng (As), độ tinh khiết pic (Pur), diện tích pic (S) và tỷ lệ thu hồi (% REV).

Khảo sát hệ pha động và bước sóng phát hiện

Nhóm nghiên cứu khảo sát năm hệ pha động trên mẫu chuẩn hỗn hợp gồm: ACN - đệm K_2HPO_4 pH 5,0 (60:40, tt/tt) (Dinç-Zor & Aksu Dönmez, 2021), ACN - CH_3COOH 0,1 % (50:50, tt/tt) (Srejomthong et al., 2025), ACN - H_3PO_4 0,1 % (60:40, tt/tt) (Alsirawan et al., 2013), ACN - H_2O (65:35, tt/tt) [22] và MeOH - H_2O (60: 40, tt/tt) (Javed et al., 2023). Quá trình đánh giá và lựa chọn hệ pha động dựa trên các chỉ tiêu sau: hệ số bất đối xứng (As), độ tinh khiết pic (Pur), diện tích pic (S), thời gian lưu (T_R) và độ phân giải (Rs).

Sau khi lựa chọn pha động, nhóm nghiên cứu khảo sát bước sóng phát hiện bằng cách quét phổ, nhằm đảm bảo tín hiệu của IBU, MP và PP nằm trong vùng đo tin cậy và không quá khác biệt về cường độ.

Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

Nhóm nghiên cứu tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký khác để tối ưu hóa quy trình bằng phương pháp RSM với thiết kế BBD. Các biến đầu vào gồm tỷ lệ pha động (TLPD), tốc độ dòng (TDD) và nồng độ acid H_3PO_4 (ND H_3PO_4), mỗi biến đầu vào gồm 03 mức độ: thấp, trung bình, cao. Các biến đầu ra gồm T_R (IBU), As (MP), Rs (MP-PP) và Rs (PP-IBU).

Hệ pha động ACN-H_3PO_4 0,1 % được lựa chọn, với ba yếu tố khảo sát gồm tỷ lệ ACN (TLPD), tốc độ dòng (TDD) và nồng độ H_3PO_4 (ND H_3PO_4), mỗi yếu tố ở ba mức (bảng 1.1). Thiết kế BBD gồm 15 thí nghiệm (03 điểm trung tâm, mỗi thí nghiệm lặp 2 lần). Các biến đầu ra dự kiến khảo sát bao gồm T_R (IBU), Rs (MP-PP), Rs (PP-IBU), As của ba chất.

Bảng 1. Bảng tổng hợp các biến đầu vào và khoảng giới hạn của biến

Biến đầu vào	Thấp	Trung bình	Cao
TLPD (% ACN)	45	50	55
TDD (ml/phút)	0,8	1,0	1,2
ND H_3PO_4 (%)	0,05	0,1	0,15

Thẩm định quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH

Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH, bao gồm các chỉ tiêu: độ đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), khoảng xác định, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

Ứng dụng quy trình định lượng

Nhóm nghiên cứu tiến hành ứng dụng quy trình phân tích đã xây dựng để định lượng trên một số mẫu hỗn dịch uống ibuprofen trên thị trường.

Mẫu thị trường được chuẩn bị bằng cách cân khoảng 0,5 g mẫu, thêm 20 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút, định mức đến 50 ml sau đó lọc qua màng 0,45 µm.

Kết quả

Xây dựng quy trình định lượng

Khảo sát dung môi pha mẫu

Kết quả khảo sát DMPM được tiến hành trên mẫu chuẩn hỗn hợp và mẫu GDTC, kết quả khảo sát trên mẫu chuẩn hỗn hợp được trình bày ở bảng 1, kết quả tỷ lệ thu hồi trên mẫu GDTC được trình bày theo bảng 2.

Bảng 2. Bảng kết quả khảo sát 02 dung môi pha mẫu trên mẫu chuẩn

Chất phân tích	Dung môi	T_R (phút)	Rs	As	Pur
MP	EtOH	3,687	-	0,925	1,000
	MeOH	3,727	-	0,941	1,000
PP	EtOH	5,287	6,233	1,117	1,000
	MeOH	5,293	7,857	1,157	1,000
IBU	EtOH	9,327	14,343	1,152	1,000
	MeOH	9,347	14,664	1,167	1,000

Dựa vào bảng 2, nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng T_R và Rs của 03 chất phân tích đều không có sự chênh lệch đáng kể khi được pha trong hai dung môi EtOH và MeOH. Giá trị As của 03 chất phân tích đều nằm trong giới hạn cho phép từ 0,8-1,5. Đối với MP, giá trị As khi pha trong MeOH (0,941) tốt hơn so với EtOH (0,925). Ngược lại, đối với PP và IBU, giá trị As khi pha trong EtOH (lần lượt là 1,117 và 1,152) tốt hơn so với khi pha trong MeOH (lần lượt là 1,157 và 1,167).

Bảng 3. Bảng kết quả tỷ lệ thu hồi (% REV) của 03 chất phân tích trên mẫu GDTC

Chất phân tích	MP		PP		IBU	
% REV (n=2)	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH	EtOH	MeOH
	100,06	100,28	99,68	99,82	100,46	100,75

Mặt khác, dựa vào bảng 2, % REV của MP, PP và IBU trong dung môi EtOH đều nằm trong khoảng 99,0 - 101,0 % và chênh lệch không đáng kể với dung môi MeOH. Với các phân tích trên, nhóm nghiên cứu ưu tiên lựa chọn dung môi có độc tính thấp hơn, an toàn hơn cho kiểm nghiệm viên và giảm thiểu rủi ro trong quá trình sử dụng và xử lý. Vì vậy, EtOH được chọn làm dung môi pha mẫu cho quy trình phân tích.

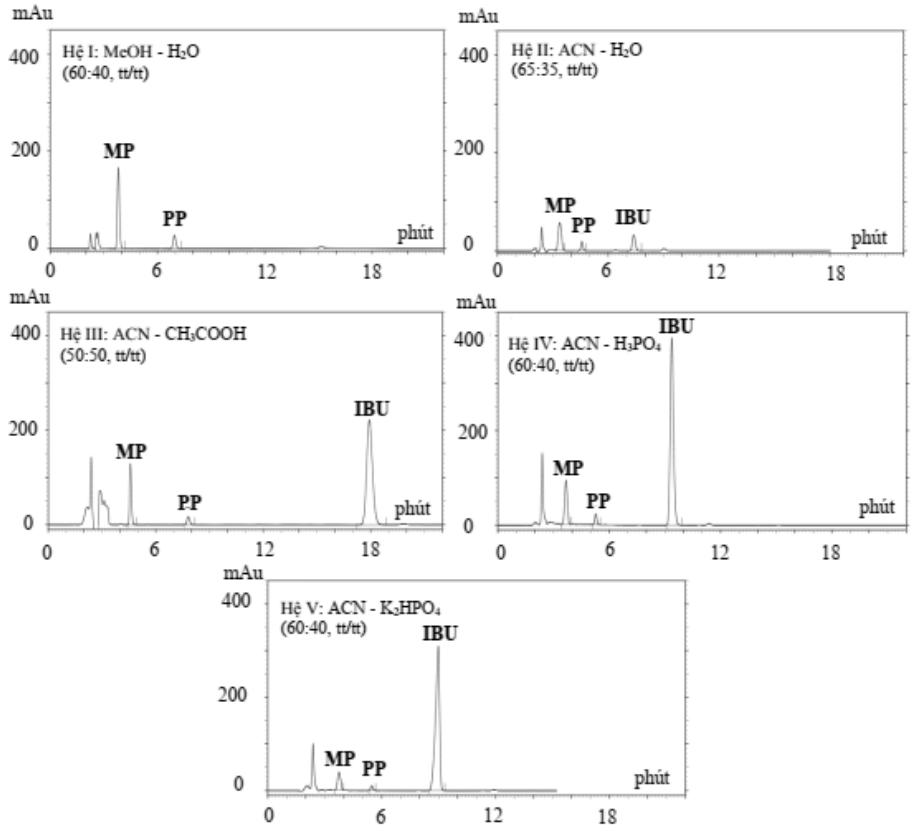
Khảo sát hệ pha động và bước sóng phát hiện

Khảo sát hệ pha động

Kết quả khảo sát thành phần pha động được tổng hợp ở bảng 3 và hình 1.

Bảng 3. Bảng kết quả khảo sát hệ pha động

Hệ	Thành phần	Chất	T_R (phút)	S (mAu.s)	Rs	As	Pur
Hệ I	MeOH - H_2O (60:40, tt/tt)	MP	3,800	5615959	-	1,247	1,000
		PP	6,947	1144983	12,473	1,109	0,886
		IBU	Không phát hiện				
Hệ II	ACN - H_2O (65:35, tt/tt)	MP	3,373	2773528	-	1,111	0,985
		PP	4,580	568890	4,653	1,040	0,988
		IBU	7,387	1458264	11,258	1,114	1,000
Hệ III	ACN - CH_3COOH (50:50, tt/tt)	MP	4,587	3818901	-	1,115	1,000
		PP	7,807	758276	13,214	1,152	0,990
		IBU	17,920	20172503	22,521	1,156	1,000
Hệ IV	ACN - H_3PO_4 (60:40, tt/tt)	MP	3,673	3765696	-	0,998	1,000
		PP	5,273	713906	6,574	1,127	1,000
		IBU	9,367	19847461	15,034	1,147	1,000
Hệ V	ACN - K_2HPO_4 (60:40, tt/tt)	MP	3,753	1807955	-	0,988	1,000
		PP	5,473	351967	6,227	1,160	0,997
		IBU	8,987	18502900	10,901	0,715	1,000



Hình 1. Sắc ký đồ của 05 hệ pha động khảo sát

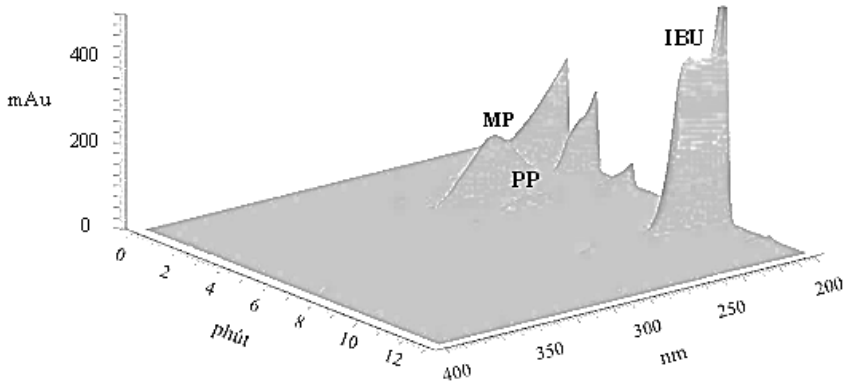
Kết quả cho thấy hệ I (MeOH - H_2O; 60:40, tt/tt) không phát hiện pic IBU. Hệ V (ACN - K_2HPO_4; 60:40, tt/tt) cho As (IBU) = 0,715, nằm ngoài giới hạn chấp nhận (0,8-1,5), và có nguy cơ gây kết tủa, tắc cột do sử dụng đệm.

Hệ II (ACN - H_2O; 65:35, tt/tt)) cho Pur và Rs thấp hơn so với hệ III (ACN - CH_3COOH; 50:50, tt/tt) và IV (ACN - H_3PO_4; 60:40, tt/tt), thể hiện khả năng phân tách chưa tối ưu.

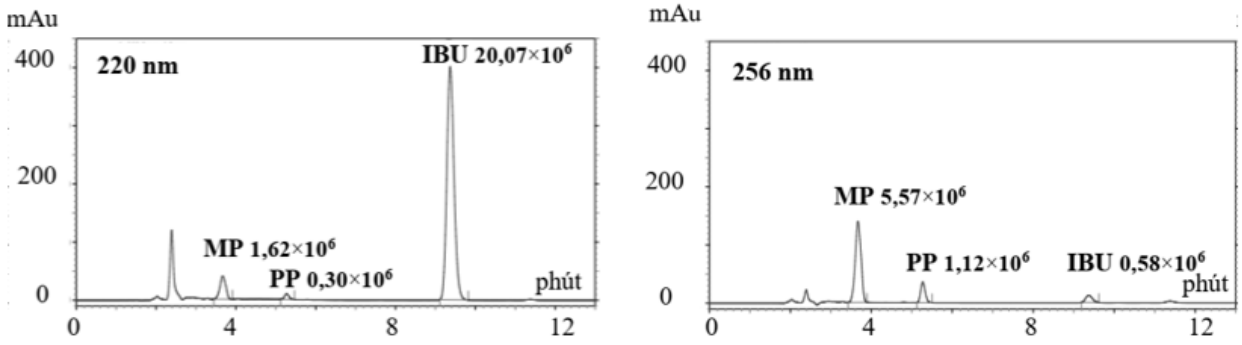
So sánh giữa hệ III và IV, hệ IV cho As tiệm cận giá trị lý tưởng hơn và Pur đạt 1,000 cho cả ba chất, chứng tỏ chất lượng pic và mức độ tách tốt hơn. Vì vậy, hệ IV được lựa chọn cho phương pháp.

Bước sóng phát hiện

Dựa trên kết quả quét phổ UV-Vis (từ 200 - 400 nm), IBU có cực đại hấp thu tại 220 nm, trong khi MP và PP tại 256 nm (hình 2). Từ đó, hai bước sóng này được lựa chọn khảo sát ban đầu (hình 3). Tại 220 nm, tín hiệu của PP rất thấp so với IBU (chênh lệch gần 70 lần). Tại 256 nm, tín hiệu của IBU thấp nhất trong ba chất, không tương xứng với vai trò là hoạt chất chính trong chế phẩm.



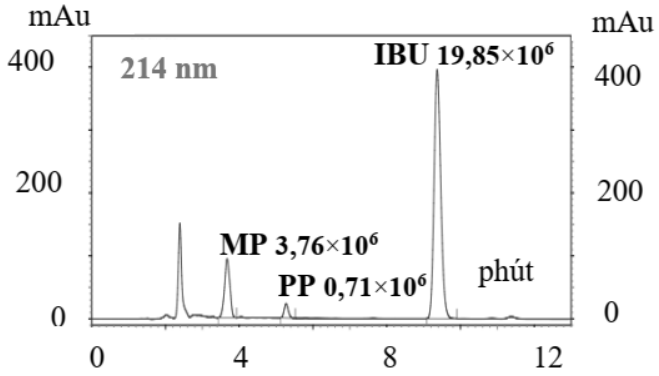
Hình 2. Phổ bước sóng hấp thu cực đại của MP, PP và IBU



Hình 3. Sắc ký đồ của IBU, MP và PP tại bước sóng 220 nm và 256 nm

Vì vậy, nhóm khảo sát bổ sung các bước sóng khác nằm ngoài vùng cực đại. Kết quả cho thấy tại bước sóng 214 nm giúp cải thiện sự cân bằng tín hiệu giữa các chất (hình 4); cường độ và diện tích pic lớn, đảm bảo độ nhạy phân tích, độ nhiễu nền

không đáng kể. Đồng thời, IBU có cực đại tại 220 nm nhưng vai phổ rộng nên tín hiệu tại 214 nm gần như chênh lệch không giảm đáng kể. Với MP và PP ngoài đỉnh 256 nm còn có đỉnh ở vùng bước sóng thấp (210 nm). Vì vậy, nhóm chọn 214 nm để thu được tín hiệu tốt cho cả ba chất.



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp tại bước sóng 230 nm và 214 nm

Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

Sự phù hợp giữa mô hình - thực nghiệm

Kết quả đánh giá mô hình (bảng 4) cho thấy As (PP) và As (IBU) có độ phù hợp thấp (R^2 < 85 %, R^2 hiệu chỉnh < 85 %, R^2 dự đoán < 80 %) và chênh lệch lớn giữa R^2 hiệu chỉnh và R^2 dự đoán (> 20 %), chứng tỏ hai biến này không phù hợp với mô hình. Do đó, As (PP) và As (IBU) loại khỏi quá trình tối ưu.

Ngược lại, các biếnT_R (IBU), Rs (MP-PP), Rs (PP-IBU),và As (MP) cho thấy độ phù hợp tốt (R^2 và R^2 hiệu chỉnh > 85 %, R^2 dự đoán > 80 %, chênh lệch < 20 %), chứng minh mối tương quan đáng tin cậy giữa các điều kiện sắc kí và thông số pic. Vì vậy, bốn biến này được sử dụng cho quá trình tối ưu.

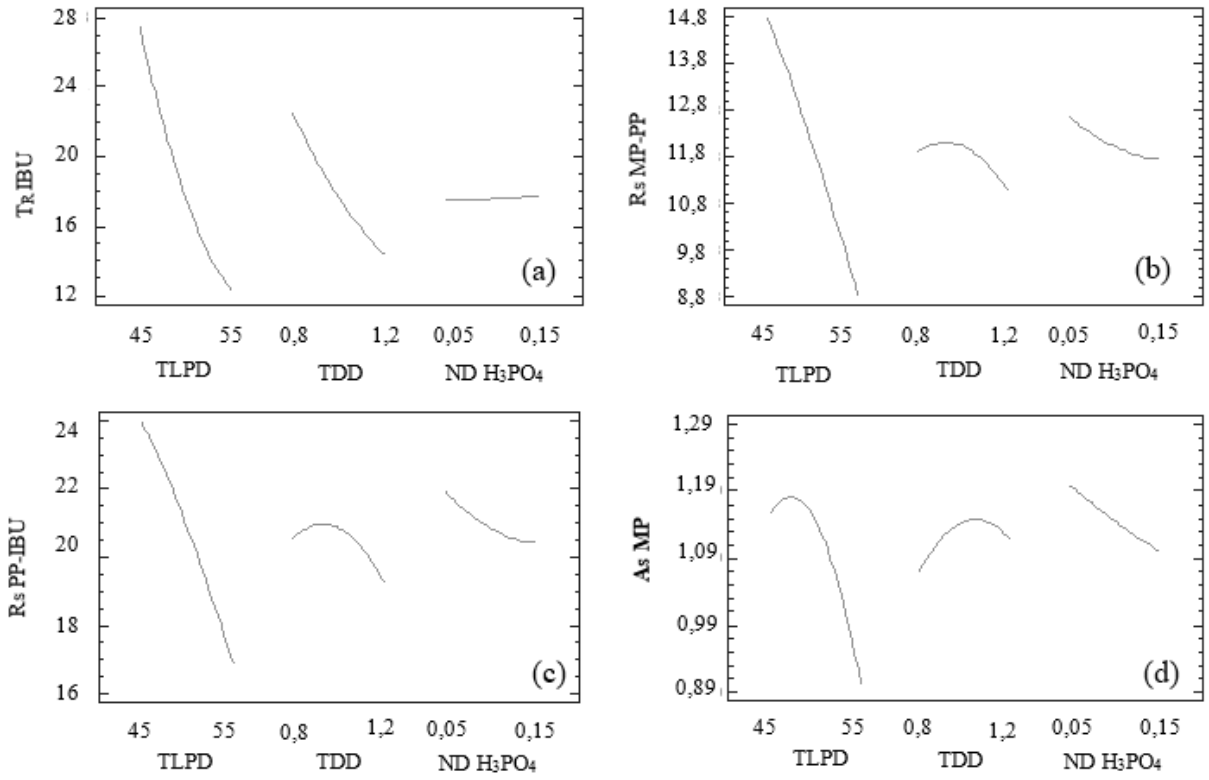
Bảng 4. Bảng đánh giá kết quả thực nghiệm với mô hình

Hệ số đánh giá	T_R (IBU)	Rs (MP-PP)	Rs (PP-IBU)	As (MP)	As (PP)	As (IBU)
R^2 (%)	99,91	99,85	99,90	97,71	74,10	71,11
R^2 hiệu chỉnh (%)	99,87	99,78	99,84	96,69	62,45	58,11
R^2 dự đoán (%)	99,78	99,61	99,70	94,37	36,90	32,48
Chênh lệch giữa R^2 hiệu chỉnh và R^2 dự đoán (%)	0,09	0,17	0,14	2,32	25,55	25,63

Ảnh hưởng của yếu tố khảo sát lên biến đầu ra

Dựa vào biểu đồ main effect, nhóm nghiên cứu nhận thấy xu hướng ảnh hưởng chung của các biến đầu vào lên các biến đầu ra là xu hướng âm (hình 5). Cụ thể, khi

tăng tỷ lệ biến đầu vào thì các thông số T_R (IBU), Rs (MP-PP), Rs (PP-IBU), As (MP) thường có xu hướng giảm và ngược lại. Đặc biệt, đối với As (MP), TLPD có xu hướng ảnh hưởng bậc hai đáng kể theo hình đồ thị parabol.



Hình 5. Biểu đồ Main effect của các đầu ra (a-T_R (IBU); b-Rs (MP-PP); c-Rs (PP-IBU); d-As (MP))

Kết quả ANOVA (bảng 5) cho thấy TLPD là biến có ảnh hưởng đáng kể nhất, thể hiện qua giá trị F-ratio cao nhất trong các biến; TDD và ND H_3PO_4 cũng ảnh hưởng nhưng ở mức độ thấp hơn. TDD ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đối với tất cả các biến đáp ứng ($p < 0,001$), trong khi ND H_3PO_4 chỉ ảnh hưởng có ý nghĩa đến Rs (MP-PP), Rs (PP-IBU) và As (MP), nhưng không ảnh hưởng đáng kể đến T_R (IBU) ($p = 0,128 > 0,05$).

Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA của các biến đáp ứng theo mô hình BBD

Biến đầu vào	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-ratio	P-Value*
T_R (IBU)					
A: TLPD	920,210	1	920,210	16791,86	< 0,001
B: TDD	265,040	1	265,040	4836,37	< 0,001
C: ND H_3PO_4	0,138	1	0,138	2,52	0,128
Total error	1,096	20	0,055	-	-
Total (corr.)	1251,3	29	-	-	-

Biến đầu vào	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-ratio	P-Value*
Rs (MP-PP)					
A: TLPD	141,40	1	141,400	12357,34	< 0,001
B: TDD	3,051	1	3,051	266,64	< 0,001
C: ND H_3PO_4	3,476	1	3,476	303,73	< 0,001
Total error	0,229	20	0,011	-	-
Total (corr.)	151,74	29	-	-	-
Rs (PP-IBU)					
A: TLPD	200,28	1	200,28	16112,87	< 0,001
B: TDD	7,342	1	7,342	590,70	< 0,001
C: ND H_3PO_4	9,195	1	9,195	739,76	< 0,001
Total error	0,236	19	0,012	-	-
Total (corr.)	226,34	29	-	-	-
As (MP)					
A: TLPD	0,270	1	0,270	530,28	<0,001
B: TDD	0,008	1	0,008	15,30	<0,001
C: ND H_3PO_4	0,038	1	0,038	74,27	<0,001
Total error	0,010	20	0,001	-	-
Total (corr.)	0,445	29	-	-	-
** Significant factor at α = 0,05*					

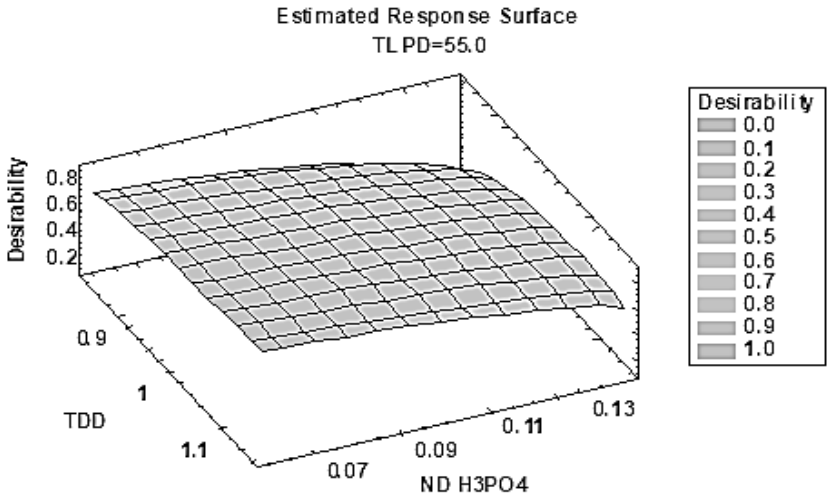
Điều kiện sắc ký tối ưu hóa

Kết quả dự đoán điều kiện sắc ký tối ưu (bảng 6) tương ứng với tỷ lệ pha động ACN-H_3PO_4 0,05 % (55:45, tt/tt) và tốc độ dòng 1,2 ml/phút. Tại điều kiện này, các giá trị T_R (IBU), Rs (MP-PP), Rs (PP-IBU) đạt giá trị phù hợp, đồng thời As (MP) tiệm cận 1,00.

Bảng 6. Bảng kết quả dự đoán của mô hình về các biến đầu vào và biến đầu ra

Biến đầu vào	Optimum
Tỷ lệ pha động (% ACN)	**55,0**
Tốc độ dòng (ml/phút)	**1,20**
Nồng độ H_3PO_4 (%)	**0,05**
Biến đầu ra	
Thời gian lưu IBU	**10,87**
Độ phân giải MP-PP	**8,62**
Độ phân giải PP-IBU	**16,68**
Hệ số bất đối xứng MP	**0,97**

Kết quả được minh họa trên biểu đồ bề mặt đáp ứng (hình 6), với giá trị desirability đạt 0,909.



Hình 6. Biểu đồ đáp ứng bề mặt của hàm mong muốn theo tốc độ dòng và nồng độ H_3PO_4 tại tỷ lệ pha động là 55 % ACN

Để kiểm chứng dự đoán, thí nghiệm được lặp lại 6 lần tại điều kiện sắc ký tối ưu. Kết quả (bảng 7) cho thấy sai số tương đối giữa giá trị thực nghiệm và dự đoán của các biến T_R (IBU), Rs (MP-PP), Rs (PP-IBU) và As (MP) đều ≤ 5%, chứng tỏ độ phù hợp tốt và khả năng dự đoán đáng tin cậy của mô hình.

Bảng 7. Bảng so sánh kết quả thực nghiệm với dự đoán của mô hình

	T_R (IBU) (phút)	Rs (MP-PP)	Rs (PP-IBU)	As (MP)
Giá trị dự đoán	10,87	8,62	16,68	0,97
Giá trị thực nghiệm (trung bình 06 lần)	10,43	8,55	16,72	0,97
Sai số tương đối (%)	4,16	0,78	0,27	0,42

Theo nguyên lý RP-HPLC, việc tăng tỷ lệ ACN trong pha động làm giảm thời gian lưu do tăng khả năng rửa giải, phù hợp với kết quả biểu đồ Main Effect cho thấy ACN có ảnh hưởng âm đến thời gian lưu của ibuprofen. Tuy nhiên, ở điều kiện tối ưu chứa 55 % ACN, ibuprofen vẫn có thời gian lưu khoảng 10,4 phút. Điều này có thể được giải thích bởi môi trường acid do H_3PO_4 tạo ra, khiến ibuprofen (pKa ≈ 4,4) chủ yếu tồn tại ở dạng không ion hóa, làm tăng tương tác với pha tĩnh C18 và kéo dài thời gian lưu. Bên cạnh đó, cột C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) cũng góp phần tăng khả năng lưu giữ. Mặc dù tốc độ dòng 1,2 ml/phút cao hơn giá trị thường dùng (1,0 ml/phút), áp suất hệ thống vẫn nằm trong giới hạn cho phép. Do điều kiện tối ưu được xác định dựa trên hàm mong muốn tổng hợp nhiều đáp ứng (thời gian lưu, độ phân giải và hệ số bất đối), 55 % ACN là điều kiện đạt sự cân bằng tối ưu giữa các chỉ tiêu sắc ký thay vì cho thời gian lưu ngắn nhất.

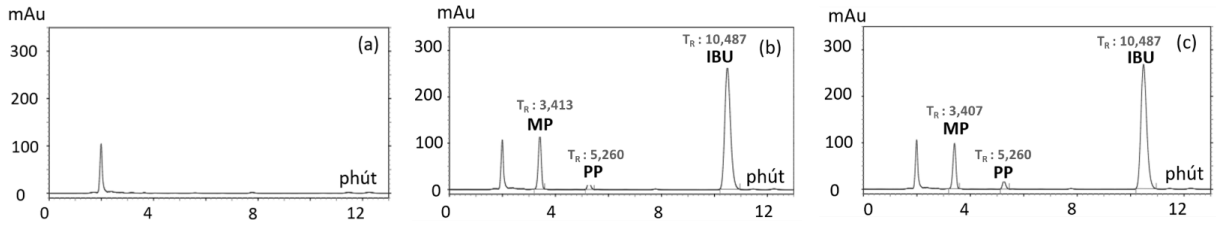
Tổng hợp điều kiện sắc ký

Sau quá trình tối ưu hóa, điều kiện sắc ký được xác lập như sau: hệ thống HPLC với cột C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) được duy trì ở 30 °C, pha động ACN-H_3PO_4 0,05 % (55:45, tt/tt), tốc độ dòng 1,2 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl và bước sóng phát hiện 214 nm.

Thẩm định quy trình định lượng

Tính đặc hiệu

Mẫu dung môi và mẫu giả dược, không có bất kỳ sự xuất hiện pic lạ nào. Trên SKĐ mẫu thử, T_R của cả 03 pic chất phân tích đều tương ứng với thời gian lưu của các pic chính trên SKĐ mẫu chuẩn hỗn hợp và 03 chuẩn đơn IBU, MP và PP (hình 7).



Hình 7. Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu (a - Mẫu dung môi; b - Mẫu thử, c - Mẫu chuẩn hỗn hợp)

Tính tương thích hệ thống

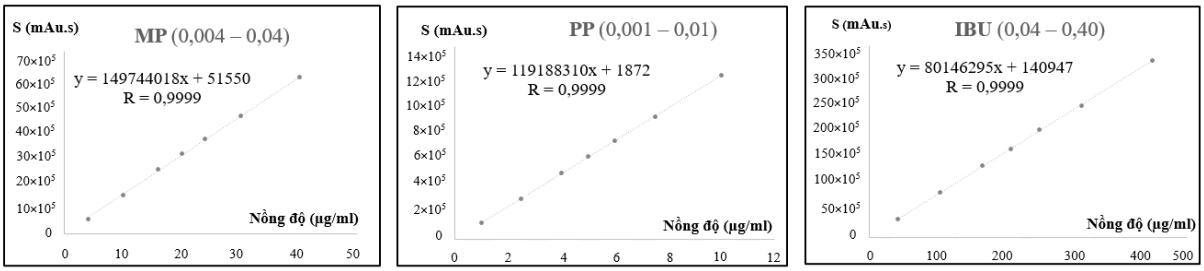
Bảng 8. Bảng kết quả đánh giá tính tương thích hệ thống

Chất phân tích(n=6)	% RSD (T_R)	% RSD (S)	% RSD (N)	Rs (> 1,5)	As (0,8 - 1,5)
MP	0,23	0,06	0,91	-	0,95
PP	0,22	0,87	0,82	8,54	1,19
IBU	0,22	0,10	0,57	16,63	1,19

Dựa vào bảng 8 ta thấy, giá trị % RSD của thời gian lưu, diện tích pic và số đĩa lý thuyết biểu kiến của 03 pic IBU, MP và PP đều ≤ 2,0 %. Độ phân giải của 03 pic đều đạt > 1,5. Hệ số bất đối xứng của 03 pic đều nằm trong khoảng 0,8 - 1,5. Hệ thống phù hợp để định lượng đồng thời IBU, MP và PP.

Tính Tuyến tính

Khảo sát tính tuyến tính trên dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp tương ứng từ 20 % đến 200 % so với nồng độ định lượng. Kết quả thu được thể hiện ở hình 8. Hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của IBU, MP và PP đều là 0,9999; đều > 0,999. Điều này cho thấy, có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ 03 chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát.



Hình 8. Đồ thị tuyến tính của MP, PP và IBU

Độ đúng

Bảng 9. Bảng kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Chất phân tích	TB % REV ± % RSD (n=9)
MP	99,54 ± 0,96
PP	99,00 ± 0,59
IBU	99,38 ± 1,23

Bảng 9 cho thấy, tỷ lệ thu hồi của MP, PP và IBU đều nằm trong khoảng 98,0 - 102,0 % và giá trị % RSD của tỷ lệ thu hồi ≤ 2 %.

Độ chính xác

Bảng 10. Bảng kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

Chất phân tích	Ngày 1 (n=6)	Ngày 2 (n=6)	2 ngày (n=12)	F
	% RSD			
MP	99,54 ± 0,96	0,27	0,28	1,06
PP	99,00 ± 0,59	0,88	0,93	0,34
IBU	99,38 ± 1,23	0,39	0,29	0,04

Kết quả ANOVA, sự sai khác giữa hai tập số liệu thực nghiệm độ lặp lại và độ chính xác trung gian được đánh giá và trình bày theo bảng 10. Giá trị F của 03 chất phân tích đều < Fcrit (5,32); giá trị P-value của 03 chất phân tích đều > 0,05, điều này chứng minh rằng hai giá trị hàm lượng trung bình của 03 chất phân tích MP, PP và IBU giữa 02 tập số liệu thực nghiệm không khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Khoảng xác định

Khoảng xác định của MP, PP và IBU có giá trị lần lượt là 0,016 - 0,024 mg/ml; 0,004 - 0,005 mg/ml và 0,16 - 0,24 mg/ml (tương ứng với nồng độ định lượng từ 80 % đến 120 %).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giá trị LOD của MP MP và IBU lần lượt là 0,01 µg/ml; 0,05 µg/ml; và 0,04 µg/ml; LOQ lần lượt là 0,03 µg/ml; 0,17 µg/ml và 0,13 µg/ml.

Ứng dụng quy trình định lượng

Nhóm nghiên cứu đã ứng dụng quy trình định lượng trên một số mẫu hỗn dịch uống ibuprofen trên thị trường. Kết quả được trình bày theo bảng 11.

Bảng 11. Kết quả ứng dụng quy trình định lượng

Chất phân tích	Mẫu	Trung bình ± RSD (%) (n=2)
MP		-
PP	M01	0,04 ± 0,13
	M02	0,05 ± 0,11
	M03	0,02 ± 0,03
	M04	0,04 ± 0,04
IBU	M01	95,95 ± 0,16
	M02	94,35 ± 0,05
	M03	97,36 ± 0,12
	M04	102,51 ± 0,22

Kết quả ứng dụng định lượng cho thấy, phương pháp cho khả năng tách tốt PP và IBU với hệ số phân giải Rs > 15. Hàm lượng PP (0,02 - 0,05 % kl/kl) phù hợp với giới hạn của hiệp định mỹ phẩm ASEAN. Hàm lượng IBU (94,35 - 102,51 % so với nhãn) nằm trong giới hạn cho phép theo dược điển USP.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu hóa thành công phương pháp định lượng đồng thời ibuprofen (IBU), methylparaben (MP) và propylparaben (PP) trong chế phẩm hỗn dịch uống bằng HPLC kết hợp với RSM và BBD. Điều kiện sắc ký tối ưu gồm: cột C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ 30 °C, pha động ACN - H_3PO_4 0,05 % (55:45, tt/tt), tốc độ dòng 1,2 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl và bước sóng phát hiện 214 nm.

Phương pháp đã được thẩm định theo các tiêu chí: tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tuyến tính, độ đúng và độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian), đều đạt yêu cầu. Khoảng xác định của MP, PP và IBU lần lượt là 0,016 - 0,024 mg/ml; 0,004 - 0,005 mg/ml và 0,16 - 0,24 mg/ml. Giới hạn phát hiện (LOD) tương ứng là 0,01; 0,05 và 0,04 µg/ml; giới hạn định lượng (LOQ) là 0,03; 0,17 và 0,13 µg/ml.

Quy trình đã được áp dụng để định lượng các mẫu hỗn dịch uống ibuprofen trên thị trường, cho thấy tính khả thi và độ tin cậy trong kiểm nghiệm thực tế.

Tài liệu tham khảo

Jan-Roblero, J., & Cruz-Maya, J. A. (2023). Ibuprofen: Toxicology and biodegradation of an emerging contaminant. *Molecules, 28*(5), 2097.

Rainsford, K. D. (2009). Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology, 17*(6), 275-342.

World Health Organization. (2021). *WHO model list of essential medicines* (22nd ed.).

Chaffai, N., Afoutni, A., Djahoudi, A., & Djebbar, M. (2025). Formulation and stability study of an ibuprofen oral suspension with a particular granulometry combining sodium CMC and xanthan gum as suspending agents. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 32*(1), 321-333.

Bộ Y tế. (2022). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học.

Martinelli, M., Quaglietta, L., Banderali, G., Ferrara, P., Romano, C., & Staiano, A. (2021). Prescribing patterns, indications and adverse events of ibuprofen in children: Results from a national survey among Italian pediatricians. *Italian Journal of Pediatrics, 47*(1), 98.

Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients* (6th ed.). Pharmaceutical Press & American Pharmacists Association.

Liao, Y., Li, J., Li, X., Zhu, Z., Gao, Y., Wei, Y., Wang, B., Chen, C., Nong, C., Liu, J., Wei, Q., Li, Y., Li, H., & Peng, Y. (2025). Assessment of human parabens exposure and health risk based on global biomonitoring data. *Environmental Research, 285*, 122461.

Chatterjee, S., Adhikary, S., Bhattacharya, S., Chakraborty, A., Dutta, S., Roy, D., Ganguly, A., Nanda, S., & Rajak, P. (2024). Parabens as the double-edged sword: Understanding the benefits and potential health risks. *Science of the Total Environment, 954*, 176547.

Dodge, L. E., Kelley, K. E., Williams, P. L., Williams, M. A., Hernández-Díaz, S., Missmer, S. A., & Hauser, R. (2015). Medications as a source of paraben exposure. *Reproductive Toxicology, 52*, 93-100.

Wu, W., Liang, Y., Zhao, R., Shi, Y., Hou, J., Peng, J., Pan, J., Li, X., & Zhou, J. (2025). Establishment and validation of HPLC methods for the determination of folic acid and parabens antimicrobial agents on folic acid oral solution. *BMC Chemistry, 19*(1), 19.

Kelani, K. M., Fayez, Y. M., Abdel-Raoof, A. M., Fekry, R. A., & Hassan, S. A. (2023). Development of an eco-friendly HPLC method for the stability indicating assay of binary mixture of ibuprofen and phenylephrine. *BMC Chemistry, 17*(1), 141.

Trần Tử An. (2021). *Kiểm nghiệm dược phẩm*. Nhà xuất bản Y học.

Võ Thị Bạch Huệ, & Vĩnh Định. (2019). *Hóa phân tích*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.

Pippalla, S., Nekkalapudi, A. R., & Komreddy, V. R. (2024). A validated stability-indicating reversed-phase-UPLC method for simultaneous estimation of promethazine hydrochloride, methylparaben, propylparaben and sodium benzoate assay of cough suppressant and antihistamine liquid oral dosage forms. *Biomedical Chromatography, 38*(9), e5944.

Dinç-Zor, Ş., & Aksu Dönmez, Ö. (2020). Box-Behnken design-desirability function approach in optimization of HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen along with additives in syrup formulation. *Journal of AOAC International, 104*(1), 78-83.

Rebbeck, C., Hammond, R., Wong, J., Nair, L., Raghavan, N., Hepler, D., Campbell, W., & Lynn, R. (2006). Solid-phase extraction and HPLC analysis of methylparaben and propylparaben in a concentrated antibiotic suspension. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 32*(9), 1095-1102.

Debbih, M., Guermouche, M.-H., & Guermouche, S. (2017). Microemulsion high performance liquid chromatography method for the determination of ibuprofen in the presence of preservatives and impurities in oral pediatric suspension. *Chemical Papers, 71*, 1693-1703.

Sunarić, S., Jeremić, M., & Spasić, M. (2022). Solid-phase extraction and HPLC determination of parabens from pharmaceutical hydrogels, multivitamin syrups and hand creams. *Revue Roumaine de Chimie, 67*(6-7), 353-363.

Srejomthong, K., Pattananandecha, T., Apichai, S., Charumanee, S., Sirithunyalug, B., Ogata, F., Kawasaki, N., & Saenjum, C. (2025). Develop and validate the HPLC method for the simultaneous quantification of FUR, FUR-B, methylparaben (MP), and propylparaben (PP) in pediatric extemporaneous oral solutions. *Molecules, 30*(19).

Alsirawan, B., Mohammad, M. A., Alkasmi, B., Alhareth, K., & El-Hammadi, M. (2013). Development and validation of a simple HPLC method for the determination of ibuprofen sticking onto punch faces MHD. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5*.

Arous, B., & Al-Mardini, M. A. (2013). Development of a validated HPLC method for the analysis of two preservative agents methylparaben and propylparaben in topical creams containing steroids in the patient's terms of use. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 22*(2).

Javed, M. F., Zahra, M., Javed, I., Ahmad, S., Jabeen, T., & Ahmad, M. (2023). Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of methyl paraben sodium and propyl paraben sodium in iron protein succinylate syrup. *Acta Chromatographica, 35*(1), 52-59.