

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI AMLODIPIN VÀ ATORVASTATIN TRONG THUỐC ĐA THÀNH PHẦN BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ UV-VIS KẾT HỢP VỚI PHÂN TÍCH ĐA BIẾN

Nguyễn Duy Lưu^{1,2*}, Nguyễn Thị Thanh Trầm³, Phạm Phú Quốc², Nguyễn Hùng Nhật Duy²,
Nguyễn Đình Luyện⁴, Trần Thúc Bình¹

¹ Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

² Khoa Dược, Trường Đại học Kỹ thuật Y – Dược Đà Nẵng, Cơ sở 2, Đường Nam Kỳ Khởi Nghĩa, Đà Nẵng, Việt Nam

³ Trường PTTH Trường Chinh, Thành Phố Gia Nghĩa, Đắk Nông, Việt Nam

⁴ Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế. 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Duy Lưu <ndluu@dhktyduocdn.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-09-2023; Hoàn thành phản biện: 30-10-2023; Ngày chấp nhận đăng: 08-05-2024)

Tóm tắt. Phát triển và thẩm định phương pháp quang phổ tử ngoại kết hợp với các phương pháp phân tích đa biến bao gồm bình phương tối thiểu cổ điển, hồi quy thành phần chính và bình phương tối thiểu riêng phần để định lượng đồng thời Amlodipin (AML) và Atorvastatin (ATO) đã được thực hiện. Phương pháp thiết kế thí nghiệm phức hợp trung tâm được sử dụng để xây dựng các tập nồng độ hiệu chuẩn và thẩm định. Phổ hấp thụ tử ngoại được đo trong khoảng bước sóng từ 230 – 260 nm. Xây dựng các phương pháp hồi quy đa biến dựa trên phổ đo được của tập hiệu chuẩn và tập thẩm định, kết quả thu được: $R^2 > 0,9927$, $RMSEC_{AML} < 1$ ppm, $RMSEC_{ATO} < 2$ ppm, sai số tương đối dự đoán (REP) $< 5\%$. Độ thu hồi nằm trong khoảng 99,20% - 108,13% đối với AML và 99,10 – 107,19% đối với ATO cho cả 3 phương pháp. Độ lặp lại (RSD_{TN}) nhỏ hơn giá trị $RSD_{Horwitz}$. Phân tích ANOVA so sánh sự khác biệt giữa giá trị trung bình của các phương pháp với phương pháp HPLC không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Áp dụng định lượng đồng thời AML, ATO trong viên nén ZOAMCO-A cho kết quả hàm lượng AML và ATO so với hàm lượng ghi trên nhãn nằm trong khoảng 90-110% phù hợp với quy định của Dược điển Việt Nam V.

Từ khóa: Amlodipin (AML), Atorvastatin (ATO), bình phương tối thiểu cổ điển (CLS); Hồi quy thành phần chính (PCR), bình phương tối thiểu riêng phần (PLS1)

Simultaneous determination of Amlodipine and Atovastatin in a multicomponent drug using infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis

Nguyen Duy Luu^{1,2*}, Nguyen Thi Thanh Tram³, Pham Phu Quoc², Nguyen Hung Nhat Duy², Nguyen Dinh Luyen⁴, Tran Thuc Binh¹

¹ Department of Chemistry, University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

² Department of Pharmaceutical, Da Nang University of Medical Technology and Pharmacy, Branch 2, Nam Ky Khoi Nghia St., Da Nang City, Vietnam

³ Truong Chinh High school, Gia Nghia City, Daknong, Vietnam

⁴ Department of Chemistry, University of Education, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Duy Luu <ndluu@dhktyduocdn.edu.vn>
(Received: 18 September 2023; Revised: 30 October 2023; Accepted: 08 May 2024)

Abstract. The development and validation of a UV spectroscopy method combined with multivariate analysis methods including classical least squares, principal component regression, and partial least squares were performed to simultaneously quantify Amlodipine (AML) and Atorvastatin (ATO). A central composite design experimental method was used to construct calibration and validation sets. UV absorption spectra were measured in the wavelength range of 230-260 nm. Multivariate regression methods were constructed based on the measured spectra of the calibration and validation sets, resulting in: $R^2 > 0.9927$, $RMSEC_{AML} < 1$ ppm, $RMSEC_{ATO} < 2$ ppm, and relative prediction error (REP) $< 5\%$. The recovery ranged from 99.20% - 108.13% for AML and 99.10% - 107.19% for ATO for all three methods. The repeatability (RSD) was smaller than the Horwitz value. ANOVA analysis compared the mean values of the methods with the HPLC method, and no significant differences were found. The simultaneous quantification of AML and ATO in Zoamco-a tablets resulted in AML and ATO content within the range of 90-110% of the labeled content, which complies with the regulations of the Vietnamese Pharmacopoeia V.

Keywords: Amlodipine, Atorvastatin, Classical Least Square, Principal Component Regression, Partial Least Square

1 Mở đầu

Amlodipine besilate (AML) là một chất đối kháng calci thuộc nhóm dehydropyridin. Thuốc ức chế dòng calci đi qua màng vào tế bào cơ tim và cơ trơn của thành mạch máu bằng cách ngăn chặn những kênh calci chậm của màng tế bào. Atorvastatin calcium (ATO) là một loại thuốc thuộc nhóm thuốc statin có vai trò giúp hạ cholesterol máu thông qua cơ chế ức chế men khử HMG CoA trong con đường chuyển hóa cholesterol tại gan, điều trị rối loạn lipid máu, phòng các biến cố tim mạch như đột quỵ, nhồi máu cơ tim, bệnh tim thiếu máu cục bộ, nhất là trên các đối tượng nguy cơ cao như người mắc bệnh tiểu đường tuýp hai, bệnh thận mạn tính hay có hội chứng chuyển hóa. Việc kết hợp hai loại thuốc này giúp nâng cao hiệu quả trong điều trị các bệnh tăng huyết áp không rõ nguyên nhân, làm giảm đáng kể nguy cơ bệnh mạch vành, đột quỵ và tử vong ở những bệnh nhân có yếu tố nguy cơ tim mạch. Nhờ có nhiều tác dụng như trên nên dạng thuốc phối hợp của AML và ATO được sử dụng khá rộng rãi trên thị trường, do đó việc phát triển các phương pháp định lượng đồng

thời AML và ATO trong chế phẩm để đảm bảo chất lượng thuốc là điều rất cần thiết [1, 2].

Phân tích đa biến (multivariate analysis) là quá trình nghiên cứu và đánh giá mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều biến số độc lập đồng thời ảnh hưởng đến biến số phụ thuộc. Trong phân tích quang phổ, phương pháp này được sử dụng để tìm mối quan hệ giữa tín hiệu quang phổ (độ hấp thụ quang) và nồng độ thông qua các phương pháp hiệu chuẩn đa biến. Hiệu chuẩn đơn biến chỉ thực hiện khi sử dụng một vài giá trị phổ hấp thụ ở một vài bước sóng duy nhất dẫn đến sự lãng phí cho toàn bộ dữ liệu đã thu thập được. Mặt khác, để loại bỏ các chất gây nhiễu trong mẫu phân tích, các phương pháp thường được sử dụng như phương pháp sắc ký, phương pháp vật lý như tách, chiết..., dùng các phản ứng với các thuốc thử đặc hiệu để che hoặc loại bỏ...việc này làm cho quá trình phân tích thêm phức tạp, dễ gây ra các sai số trong quá trình xử lý mẫu [3-6]. Trong hiệu chuẩn đa biến, việc loại bỏ các tác nhân gây nhiễu bằng cách sử dụng các mô hình toán học cho các dữ liệu của các mẫu phân tích. Bên cạnh đó, việc hiệu chuẩn đa biến đã sử dụng được toàn bộ giá trị phổ thu được làm cho mô

hình hiệu chuẩn tăng độ đúng, độ tin cậy và độ chính xác [7, 8].

Một quá trình hiệu chuẩn đa biến thường gồm ba giai đoạn: xây dựng mô hình hiệu chuẩn, thẩm định mô hình, áp dụng để phân tích các mẫu thực tế. Phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển (CLS) thường được gọi là phương pháp “ma trận K”, từ phương trình mối quan hệ giữa độ hấp thụ và nồng độ $A = K.C$ để tìm hệ số K trong quá trình hiệu chuẩn, sau đó dựa vào hệ số K đã tìm được để tính nồng độ chất phân tích có trong mẫu [9]. Trong khi đó, các phương pháp hồi quy cấu tử chính (PCR), bình phương tối thiểu riêng phần (PLS1) là những phương pháp giảm chiều dữ liệu, từ dữ liệu ban đầu kết hợp các thuật toán để tìm ra các biến tiềm ẩn trong một không gian mới, sau đó sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu để tìm mối quan hệ tuyến tính giữa các biến tiềm ẩn với nồng độ ban đầu [10 - 12].

Trong bài báo này chúng tôi sử dụng các phương pháp CLS, PCR, PLS1 để xác định đồng thời AML và ATO dưới dạng bào chế viên nén với biệt dược là Zoamco-A do công ty Pymepharma sản xuất. Mục tiêu bao gồm xây dựng quy trình phân tích đồng thời AML và ATO bằng các phương pháp CLS, PCR, PLS1; thẩm định quy trình phân tích đã xây dựng. Tất cả các quá trình tính toán được thực hiện trên phần mềm R phiên bản 4.3.0.

2 Dụng cụ, hóa chất và phương pháp nghiên cứu

2.1 Thiết bị

Máy quang phổ hai chùm tia UV – Vis UH5300 – model: 3J1-0015 (Hitachi – Nhật), khoảng quét bước sóng 190 - 1100 nm, kết nối với máy tính để chứa dữ liệu phổ thu được. Cuvet thạch anh hãng Chrom Tech: Kích thước 10 mm x 10 mm x 3.5 ml.

Cân phân tích 4 chữ số thập phân Ohaus Mỹ. Máy cất nước 2 lần Bibby Scientific A4000D - Anh, bể rung siêu âm Elma – Đức. Micropipet Boeco – Đức các loại: 10 – 100 μ l; 20 – 200 μ l; 1000 – 1000 μ l.

2.2 Hóa chất

Chất chuẩn

Chất chuẩn Amlodipine besilate (100,3%) và Atorvastatin calcium (94,6%) được mua từ Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

Nước cất và Methanol (Fisher) được sử dụng làm dung môi.

Dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn Amlodipin và Atorvastatin gốc 1000 μ g/mL được chuẩn bị bằng cách cân chính xác 50 mg chất chuẩn cho vào bình định mức 50 ml, thêm MeOH vừa đủ, bảo quản trong tủ lạnh. Các dung dịch làm việc hàng ngày được pha trực tiếp từ dung dịch chuẩn theo các tỉ lệ được tính toán. Dung dịch chuẩn trước khi đem đi pha được lấy ra và để cân bằng với nhiệt độ phòng (25°C).

Chuẩn bị mẫu

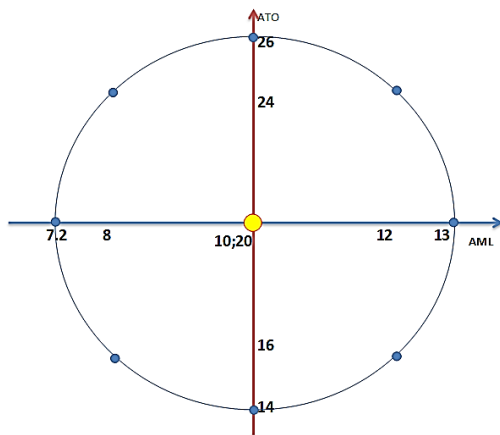
Cân ngẫu nhiên 20 viên và tính khối lượng trung bình viên, nghiền thành bột mịn và trộn đều. Cân chính xác 0.2814 g tương ứng với 5 mg AML và 10 mg ATO, hòa tan bằng MeOH vừa đủ trong bình định mức 50 ml, siêu âm và lọc (bỏ khoảng 20 ml dịch lọc đầu). Hút chính xác 1 ml dịch lọc vào bình định mức 10 ml, thêm MeOH đến vạch, lắc đều thu được dung dịch thử có nồng độ AML và ATO tương ứng 5 μ g/mL và 10 μ g/mL.

Mẫu thuốc

Thuốc zoamco-A có chứa các hoạt chất và thành phần sau: Amlodipin: 5mg, Atorvastatin: 10mg. Được sản xuất bởi Công ty cổ phần Pymepharco (Việt Nam), số lô: 201220, ngày sản xuất: 16/12/2020; Hạn dùng: 16/12/2023

2.3 Thiết kế thí nghiệm

Trong phân tích đa biến, thiết kế thí nghiệm là công việc rất quan trọng, một tập thí nghiệm thành công đảm bảo cho mô hình xây dựng có độ đúng, chính xác và độ tin cậy cao. Một tập thí nghiệm để xây dựng mô hình phân tích đa biến phải đảm bảo 4 yêu cầu sau: (1) Chứa tất cả các thành phần được mong đợi, (2) bao trùm phạm vi nồng độ quan tâm, (3) Chứa (bao trùm) các điều kiện quan tâm, (4) Chứa các mẫu có nồng độ độc lập, không tương quan với nhau [9].



Hình 1. Mô phỏng thiết kế tập hiệu chuẩn AML và ATO

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn mô hình thiết kế thí nghiệm phức hợp có tâm (Central Composite Design – CCD), đây là một thiết kế thí nghiệm giai thừa đầy đủ, bao gồm một điểm tâm, 4 điểm sao (star point) và 4 điểm trục (axial points) [13], trong đó, tâm của tập thí nghiệm được lựa chọn tương ứng với tỉ lệ nồng độ của AML và ATO trong chế phẩm, các điểm ở điểm trục tương ứng với khoảng 80-120% nồng

độ tâm [14]. Thiết kế thí nghiệm được thực hiện trên phần mềm R với version 4.3.0

2.4 Phương pháp phân tích đa biến

Phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển

Phương pháp bình phương tối thiểu cổ điển (Classical Least Square – CLS) là phương pháp được thực hiện dựa trên mối quan hệ giữa độ hấp thụ phân tử từ ngoại – khả kiến (A) và nồng độ của các chất phân tích có trong mẫu thể hiện bởi phương trình:

$$A = K.C \tag{1}$$

trong đó, A là ma trận độ hấp thụ (n_{xm}) của m mẫu tại n bước sóng; K là ma trận hệ số tương quan (n_{xk}); C là ma trận nồng độ (k_{xm}) của m mẫu chứa k chất phân phân tích .

Để thực hiện hiệu chuẩn, ma trận nồng độ hiệu chuẩn C được chuẩn bị từ các dung dịch chuẩn và đo tại n bước sóng. Hệ số K được tính như sau:

$$K = A.C^T(C.C^T)^{-1} \tag{2}$$

trong đó: C^T là ma trận chuyển vị của C; (C.C^T)⁻¹ là ma trận nghịch đảo của (C.C^T).

Mẫu phân tích được chuẩn bị tương tự như các mẫu chuẩn, sau đó đo độ hấp thụ (A_{mẫu}) trong khoảng bước sóng đã khảo sát. Nồng độ các chất phân tích trong mẫu được tính như sau [15] :

$$C_{mẫu} = (K^T.K)^{-1}K^T.A_{mẫu} \tag{3}$$

Phương pháp hồi quy cấu tử chính

Phương pháp hồi quy cấu tử chính (Principal Component Regression – PCR) là một phương pháp kết hợp giữa phương pháp phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis – PCA) và hồi quy tuyến tính đa biến. PCA là phương pháp nén dữ liệu mà vẫn giữ được thông tin tối đa trong nguồn dữ liệu gốc ban đầu [4, 16]. Ý tưởng chính của PCR là thay thế dữ

liệu ma trận phổ hấp thụ A bằng các dữ liệu được gọi là thành phần chính trong tập dữ liệu được nén T (ma trận điểm – score matrix). Để thực hiện quá trình hiệu chuẩn, PCR chỉ lựa chọn một số thành phần chính đầu tiên có giá trị RMSEC là nhỏ nhất tương ứng với phần trăm giải thích phương sai tối ưu. Việc lựa chọn quá nhiều thành phần chính cũng không tốt cho mô hình bởi nó gây ra hiện tượng trùng lặp thông tin quá mức và có thể đem các thông tin nhiễu vào trong quá trình hiệu chuẩn [3, 17].

Thực hiện hồi quy cấu tử chính bao gồm, thứ nhất là nén dữ liệu trong tập dữ liệu phổ hấp thụ A

$$A = U \cdot T^T \quad (4)$$

trong đó U là ma trận trọng số, T là ma trận điểm (thành phần chính). Giả sử chỉ chọn x thành phần chính đầu tiên:

$$A_x = U_x T_x^T \quad \text{hay} \quad T_x = A_x^T \cdot U_x \quad (5)$$

Ở đây, T_x được xem là ma trận chiếu của tập dữ liệu A bởi trọng số U_x . Thực hiện hiệu chuẩn PCR, số dữ liệu T_x được thay thế dữ liệu quang phổ A ban đầu và các bước tính toán tương tự như phương pháp bình phương tối thiểu [18].

$$C = P \cdot T_x \quad (6)$$

nên

$$P = C \cdot T_x^T (T_x \cdot T_x^T)^{-1} \quad (7)$$

Phổ hấp thụ của mẫu phân tích được chiếu vào trong không gian mới bởi U_x :

$$T_{mẫu} = A_{mẫu}^T \cdot U_x \quad (8)$$

và nồng độ chất phân tích trong mẫu được tính:

$$C_{mẫu} = (P^T \cdot P)^{-1} P^T T_{mẫu} \quad (9)$$

Phương pháp bình phương tối thiểu riêng phần

Đối với phương pháp PCR, thông tin trong ma trận phổ hấp thụ được thu nhỏ trong một số lượng nhỏ các thành phần chính. Tuy nhiên, việc lựa chọn các thành phần chính này không có sự

liên quan nào với các biến nồng độ, điều này dẫn đến không chắc chắn rằng phần dữ liệu được thu nhỏ trong các thành phần chính sẽ có ý nghĩa (tương quan) với các biến nồng độ.

Tương tự PCR, phương pháp PLS xác định các biến tiềm ẩn bằng cách nén thông tin và loại bỏ những yếu tố không liên quan. Tuy nhiên, PLS xây dựng các biến tiềm ẩn sao cho nắm bắt được hầu hết phương sai trong cả biến độc lập và biến phụ thuộc và tối đa hóa mối tương quan giữa các ma trận này [19]. Từ đó giúp giảm các tác động tiềm ẩn của các biến độc lập có phương sai lớn nhưng không liên quan đến mô hình hiệu chuẩn, điều này không được thực hiện trong phương pháp PCR. Vì vậy, PLS có tất cả các ưu thế và loại bỏ những nhược điểm không mong muốn của PCR [15, 20-22].

Phương pháp PLS bao gồm phương pháp PLS1 và PLS2, trong đó PLS1 thực hiện hiệu chuẩn theo nồng độ của từng thành phần có trong mẫu với phổ độ hấp thụ, trong khi PLS2 được thực hiện bởi tất cả các giá trị nồng độ của các thành phần có trong mẫu.

2.5 Một số đại lượng thống kê

Tổng bình phương sai số phần dư dự đoán (Predicted Residual Error Sum of Squares – PRESS) [9]

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\hat{C}_i - C_i)^2 \quad (10)$$

trong đó, $\hat{C}_i$; C_i là nồng độ thực và nồng độ dự đoán; n là số mẫu phân tích

Căn bậc hai tổng trung bình bình phương sai số (Root Mean Square Error – RMSE)

$$RMSE = \frac{PRESS}{n} \quad (11)$$

trong đó, áp dụng cho tập hiệu chuẩn ta có giá trị RMSEC, tập thẩm định là RMSEP.

Sai số tương đối dự đoán (Relative Error of Prediction – REP%)

$$REP(\%) = \frac{RMSE}{\bar{C}} \times 100 \tag{12}$$

$\bar{C}$: nồng độ trung bình của tập hiệu chuẩn

Độ thu hồi được xác định theo công thức [23]:

$$Rev(\%) = \frac{C_{tt}}{C_{lt}} \times 100 \tag{13}$$

trong đó, C_{tt} , C_{lt} : nồng độ tìm lại và nồng độ thêm chuẩn ban đầu

Giá trị RSD tính theo Horwitz [23]:

$$RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0.5lgC)} \tag{14}$$

Bảng 1. Nồng độ (µg/mL) của AML và ATO trong các mẫu của tập hiệu chuẩn và thẩm định

Nồng độ tập hiệu chuẩn		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
	AML	8,0	12,0	8,0	12,0	10,0	7,2	12,8	10,0	10,0
	ATO	16,0	16,0	24,0	24,0	20,0	20,0	20,0	14,4	25,5
Nồng độ tập thẩm định		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9
	AML	8,5	11,5	8,5	11,5	10,0	7,9	12,1	10,0	10,0
	ATO	17,0	17,0	23,0	23,0	20,0	20,0	20,0	15,8	24,2

3.2 Lựa chọn khoảng bước sóng định lượng

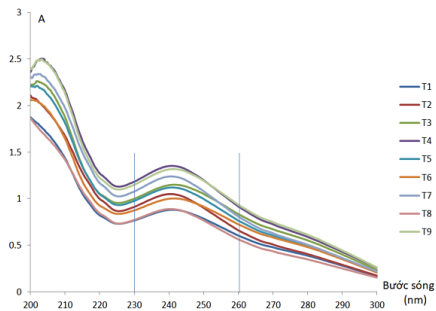
Thực hiện hiệu chuẩn theo mô hình CLS với các khoảng bước sóng 200 – 230, 230 – 260, 260 – 300 nm. Phổ hấp thụ của các mẫu hiệu chuẩn thể hiện ở hình 2.

Kết quả đánh giá nồng độ tìm lại (mg/mL) dựa theo thương pháp CLS ở các khoảng bước sóng khác nhau được đưa ra ở bảng 2. Giá trị hệ số tương quan giữa nồng độ pha và nồng độ tính được từ mô hình (R^2) càng gần 1 cho thấy mô hình dự đoán kết quả càng chính xác, ngược lại giá trị R^2 nhỏ thì kết quả thu được không đáng tin cậy, thông thường giá trị R^2 được chọn khi lớn hơn 0,99.

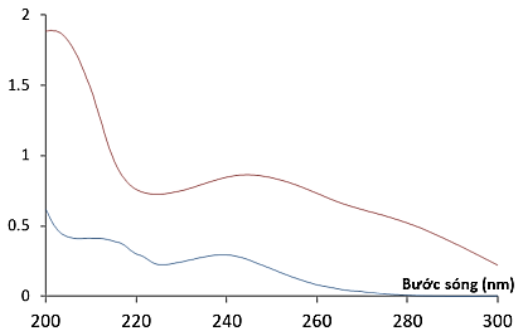
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Thiết kế thí nghiệm

Xây dựng các thí nghiệm để thực hiện hiệu chuẩn và thẩm nhận dựa trên phương pháp thiết kế phức hợp có tâm (Central Composit Design – CCD). Kết quả đã xây dựng được không gian mẫu thí nghiệm cho hiệu chuẩn phương pháp đa biến và các mẫu thẩm định trong phòng thí nghiệm để kiểm tra độ tin cậy của các phương pháp được thể hiện qua Hình 1 và Bảng 1.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV-Vis của các mẫu trong tập hiệu chuẩn



Hình 3. Phổ hấp thụ của AML 10 (µg/mL), ATO 20 (µg/mL)

Bảng 2. Kết quả đánh giá nồng độ tìm lại ($\mu\text{g/mL}$) dựa theo phương pháp CLS ở các khoảng bước sóng khác nhau

Mẫu	Nồng độ pha ($\mu\text{g/mL}$)		Nồng độ tìm lại ($\mu\text{g/mL}$)					
			230-260nm		260-300 nm		200-230nm	
	AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO
T1	8	16	7,69	16,07	7,98	15,94	7,82	16,58
T2	12	16	11,92	15,98	12,19	15,86	11,89	16,21
T3	8	24	7,86	23,47	8,27	23,27	7,69	23,75
T4	12	24	12,47	23,98	11,54	24,4	12,47	23,16
T5	10	20	9,97	20,25	10,02	20,23	9,86	20,62
T6	7.2	20	7,05	20,27	6,87	20,34	7,21	20,69
T7	12.8	20	12,79	20,36	12,98	20,27	12,43	20,43
T8	10	14.4	9,91	13,75	9,85	13,77	10,32	13,62
T9	10	25.5	10,14	25,67	10,26	25,63	10,24	25,10
Hệ số chặn (b)			-0,6823	-0,3530	-0,1236	-0,6175	-0,2138	0,8737
Hệ số góc (a)			1,0659	1,0171	1,0119	1,0298	1,0206	0,9578
R^2			0,9929	0,9927	0,9834	0,9907	0,9804	0,9770

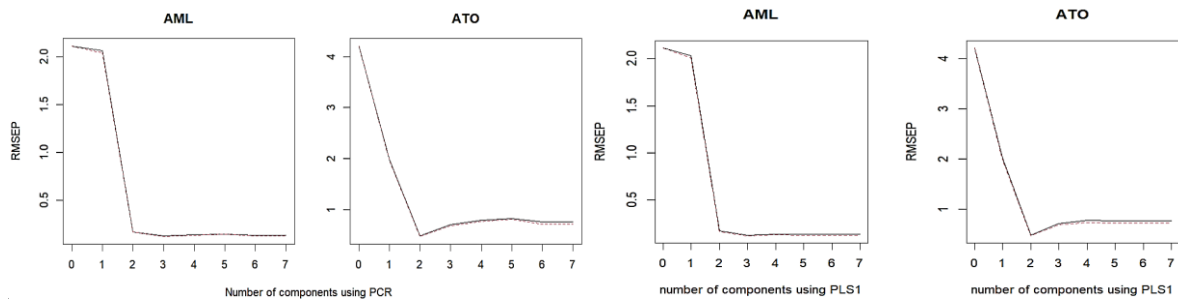
Ghi chú: (b) là hệ số chặn trong phương trình hồi quy $y = a.x + b$ giữa nồng độ tìm lại và nồng độ pha; (a) là hệ số góc trong phương trình hồi quy $y = a.x + b$ giữa nồng độ tìm lại và nồng độ pha; R^2 là hệ số tương quan giữa nồng độ tìm lại và nồng độ pha

Trong khoảng bước sóng 200 – 230 nm, giá trị R^2 của cả AML và ATO đều nhỏ hơn 0,99, tức là mô hình hiệu chuẩn CLS dự đoán kết quả nồng độ AML và ATO gây sai số lớn. Nguyên nhân có thể do ảnh hưởng của dung môi bởi ở khoảng bước sóng này MeOH bắt đầu có sự hấp thụ tia UV, làm kết quả đo phổ kém chính xác. Trong khi đó, ở khoảng bước sóng từ 260 – 300 nm, mặc dù giá trị $R^2_{ATO} > 0,99$, nhưng $R^2_{AML} < 0,99$ có nghĩa là mô hình CLS khi dự đoán nồng độ của AML cũng gây ra sai số lớn. Điều này có thể giải thích trong khoảng bước sóng 260 – 300 nm AML gần như không hấp thụ tia UV (hình 3) nên đến sự chênh lệch về tỉ lệ hấp thụ UV giữa AML và ATO quá lớn, dẫn đến việc thực hiện phép toán bởi phương pháp CLS gây ra sự dự đoán kém chính xác đối với AML. Vì vậy, chúng tôi đã chọn khoảng bước sóng từ 230 – 260 nm (đều có giá trị R^2 của cả AML và ATO lớn hơn 0,99) để thực hiện

xây dựng hiệu chuẩn cho các phương pháp phân tích đa biến CLS, PCR và PLS1.

3.3 Lựa chọn số thành phần chính cho hồi quy thành phần chính và bình phương tối thiểu riêng phần

Việc lựa chọn số thành phần chính phù hợp cho mỗi phương pháp PCR và PLS1 là công việc rất quan trọng, số thành phần chính phù hợp đảm bảo cho phương pháp PCR và PLS1 có khả năng dự đoán tốt đối với mẫu cần phân tích dựa trên tập nồng độ hiệu chuẩn đã xây dựng. Một số yêu cầu trong việc lựa chọn số thành phần chính bao gồm số thành phần chính được chọn sao cho giá trị RMSEP là nhỏ nhất, số thành phần chính không được lớn hơn ½ tổng số thành phần chính của mô hình [4]. Mặt khác, số thành phần chính lựa chọn quá nhiều sẽ gây ra hiện tượng giải thích quá trùng lặp với thông tin ban đầu, dẫn đến việc loại bỏ các thông tin nhiễu hạn chế.



Hình 4. Đồ thị mối liên hệ giữa số thành phần chính và giá trị RMSEP của AML và ATO trong các phương pháp PCR và PLS1

Bảng 3. Giá trị RMSEP của các thành phần chính trong phương pháp PCR,PLS1

Phương pháp	Thành phần	Số thành phần chính							
		Hệ số chặn	1	2	3	4	5	6	7
PCR	AML	2,111	2,064	0,1733	0,1283	0,1416	0,1496	0,1365	0,1371
	ATO	4,203	1,985	0,4896	0,7138	0,7941	0,8289	0,7597	0,7659
PLS1	AML	2,111	2,03	0,1744	0,1289	0,1422	0,1384	0,1382	0,1382
	ATO	4,203	2,022	0,489	0,7194	0,7828	0,7658	0,7656	0,7658

Bảng 4. Phần trăm phương sai giải thích của các thành phần chính

Phương pháp	Thành phần	Số thành phần chính						
		1	2	3	4	5	6	7
PCR	AML	19,02	99,66	99,91	99,91	99,91	100	100
	ATO	80,45	99,29	99,33	99,33	99,39	99,98	99,98
PLS1	AML	21,53	99,65	99,91	100	100	100	100
	ATO	79,85	99,29	99,34	99,99	100	100	100

Hình 4 và kết quả ở bảng 3 và bảng 4 thể hiện các giá trị RMSEP và % phương sai giải thích của số thành phần chính được chọn. Kết quả cho thấy, cả phương pháp PCR và PLS1 đều có kết quả tương tự nhau cho cả 2 chất AML và ATO. Giá trị RMSEP giảm dần từ $ncomp = 1$ đến $ncomp = 3$ (AML) hoặc từ $ncomp = 1$ đến $ncomp = 2$ (ATO) cho thấy quá trình nén dữ liệu thu được các biến đầu tiên chứa hầu hết thông tin liên quan đến phổ độ hấp thụ trong tập hiệu chuẩn. Các thành phần chính này giải thích được 99,91% (AML) và 99,29% (ATO) phương sai của phổ, vì vậy $ncomp = 3$ (AML) và $ncomp = 2$ (ATO) là số

thành phần chính được chọn cho các phương pháp PCR và PLS1.

Khi tăng số thành phần chính lên đến 7 dẫn đến giá trị RMSEP tăng, mặt khác % phương sai giải thích của các thành phần chính cũng tăng lên 100%. Việc này dẫn đến kéo theo thông tin nhiễu vào trong mô hình dựa đoán và làm cho kết quả dự đoán không chính xác.

3.4 Xây dựng các mô hình phân tích đa biến

Xây dựng tập hiệu chuẩn

Khả năng dự đoán của các phương pháp đa biến dựa vào các chỉ số thống kê như hệ số tương quan giữa nồng độ dự đoán và nồng độ thực (R^2), RMSEC, phân tích phần dư. Theo tác giả Saeys và cộng sự [24], mô hình hiệu chuẩn với R^2 lớn hơn 0,91 được xem là hiệu chuẩn tốt. Kết quả từ các mô hình hiệu chuẩn đa biến xây dựng đều có giá trị R^2 lớn hơn 0,99, điều này khẳng định có

sự tương quan chặt chẽ giữa nồng độ dự đoán và nồng độ thực trong các phương pháp phân tích đa biến đã thực hiện. Giá trị RMSEC của AML và ATO trong các mô hình CLS, PCR, PLS1 đều có giá trị nhỏ hơn 10% nồng độ trung vị của tập mẫu hiệu chuẩn (1 $\mu\text{g/mL}$ và 2 $\mu\text{g/mL}$ tương ứng với AML và ATO). Giá trị RMSEC giải thích mức độ tốt, chắc chắn của mô hình, điều này cho thấy các mô hình đã xây dựng khi xác định đồng thời AML và ATO trong mẫu cho sai số nhỏ.

Bảng 5. Các thông số thống kê sử dụng các phương pháp CLS, PCR, PLS1 để xác định đồng thời AML ($\mu\text{g/mL}$) và ATO ($\mu\text{g/mL}$) trong mẫu hiệu chuẩn

Mẫu	Nồng độ pha		Phương pháp CLS		Phương pháp PCR		Phương pháp PLS1	
	AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO
T1	8	16	7,69	16,07	7,94	16,24	7,94	16,24
T2	12	16	11,92	15,98	11,99	16,02	11,99	16,03
T3	8	24	7,86	23,47	8,07	23,46	8,07	23,46
T4	12	24	12,47	23,98	12,05	23,83	12,05	23,83
T5	10	20	9,97	20,25	9,96	20,26	9,96	20,26
T6	7,2	20	7,05	20,27	7,16	20,36	7,16	20,35
T7	12,8	20	12,79	20,36	12,73	20,28	12,73	20,28
T8	10	14,4	9,91	13,75	10,1	13,91	10,1	13,91
T9	10	25,5	10,14	25,67	9,99	25,55	9,99	25,55
RMSEC			0,6324	0,9986	0,1712	0,9469	0,1712	0,9435
R^2			0,9929	0,9927	0,9991	0,9933	0,9965	0,9929
Shapiro test (p-value)			0,1462	0,0846	0,2903	0,1380	0,2903	0,1160

Mặt khác, phân tích phần dư là một phần quan trọng trong việc đánh giá sự phù hợp của mô hình hồi quy để dự báo các biến nồng độ. Sự chênh lệch giữa nồng độ đã biết và nồng độ dự báo từ các phương pháp đã xây dựng phải được phân phối đối xứng quanh giá trị zero, ngẫu nhiên và độc lập. Phân tích phần dư sử dụng Shapiro-Test cho thấy các phần dư đều có giá trị $p > 0,05$ như vậy phần dư có phân phối chuẩn, độc lập, ngẫu nhiên.

Đánh giá trên mẫu phòng thí nghiệm

REP là sai số tương đối dự đoán được đánh giá là rất tốt nếu nhỏ hơn 2%, tốt nếu nằm trong khoảng 2 - 5%, chấp nhận được nếu nằm trong khoảng 5 – 10% và rất tệ nếu lớn hơn 10% [3]. Đánh giá giá trị REP từ **bảng 6** cho thấy, các giá trị đều nằm trong khoảng từ 2-5% , như vậy các phương pháp CLS, PCR, PLS1 khi xác định đồng thời AML và ATO cho kết quả tốt, ít sai số.

Bảng 6. Kết quả xác định nồng độ AML, ATO trong các mẫu tập thẩm định bằng các phương pháp CLS, PCR, PLS1

Mẫu	Nồng độ pha ($\mu\text{g/mL}$)		Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) tính từ các phương pháp phân tích đa biến					
	AML	ATO	Phương pháp CLS		Phương pháp PCR		Phương pháp PLS1	
			AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO
V1	8,5	17	8,45	17,77	8,68	17,88	8,69	17,88
V2	11,5	17	11,4	16,95	11,51	16,99	11,51	16,99
V3	8,5	23	8,39	22,53	8,46	22,53	8,46	22,53
V4	11,5	23	11,79	24,18	11,75	24,04	11,76	24,04
V5	10	20	10,3	19,94	10,45	19,94	10,45	19,94
V6	7,9	20	7,57	19,86	7,69	19,94	7,69	19,94
V7	12,1	20	12,41	20,23	12,51	20,16	12,51	20,17
V8	10	15,8	9,89	15,68	9,72	15,81	9,73	15,79
V9	10	24,2	9,95	25,06	9,9	24,96	9,9	24,96
RMSEP			0,2158	0,5804	0,2581	0,5459	0,2588	0,5468
REP(%)			2,15	2,87	2,56	2,70	2,57	2,70

3.5 Đánh giá độ tin cậy của các phương pháp phân tích đa biến

Đánh giá độ đúng

Để đánh giá độ đúng của các phương pháp CLS, PCR, PLS1 xác định đồng thời AML, ATO trong thuốc, phương pháp thêm chuẩn được thực hiện trong đó độ đúng được xác định thông qua

độ thu hồi của phương pháp. Tiến hành thêm chuẩn AML, ATO vào mẫu trắng với 3 mức nồng độ khác nhau tương ứng với 80%, 100%, 120% nồng độ AML, ATO trong mẫu thuốc cần phân tích, làm lặp lại 3 lần [14].

Bảng 7. Kết quả xác định độ thu hồi của AML, ATO sử dụng các phương pháp CLS, PCR, PLS1

Mẫu	Nồng độ thêm chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)		Độ thu hồi (%)					
	AML	ATO	Phương pháp CLS		Phương pháp PCR		Phương pháp PLS1	
			AML (%)	ATO (%)	AML (%)	ATO (%)	AML (%)	ATO (%)
X80.1	8	16	99,75	104,13	105,63	105,03	105,63	105,06
X80.2	8	16	101,00	105,50	108,13	106,32	108,13	106,38
X80.3	8	16	102,00	106,38	108,00	107,15	108,00	107,19
X100.1	10	20	100,10	103,10	103,30	103,06	103,30	103,10
X100.2	10	20	99,20	104,60	102,80	104,53	102,80	104,55
X100.3	10	20	101,30	105,60	105,40	105,47	105,40	105,50
X120.1	12	24	99,58	99,71	101,58	99,10	101,58	99,13
X120.2	12	24	101,08	101,83	102,50	101,18	102,50	101,21
X120.3	12	24	103,83	103,83	102,25	103,11	102,33	103,13
TB			100,87	103,85	104,40	103,89	104,41	103,91

Kết quả từ bảng 7 cho thấy, độ thu hồi của AML và ATO khi sử dụng các phương pháp CLS, PCR, PLS1 đều nằm trong khoảng 80-110% (theo AOAC [23]), các phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu.

Đánh giá độ lặp lại

Tiến hành thực hiện lặp lại 6 lần trên cùng một mẫu: cân chính xác m g bột thuốc tương ứng với 5 µg/mL AML và 10 µg/mL ATO, hòa tan bằng MeOH vừa đủ trong bình định mức 50 ml, siêu âm và lọc (bỏ khoảng 20 ml dịch lọc đầu). Hút chính xác 1 ml dịch lọc vào bình định mức 10

ml, thêm MeOH đến vạch, lắc đều thu được dung dịch thử có nồng độ AML và ATO tương ứng 10 µg/mL và 20 µg/mL. Đo phổ hấp thụ trong khoảng bước sóng 230 – 260nm.

Đối với AML, nồng độ xác định là 10 ppm, ở khoảng nồng độ này giá trị $1/2RSD_{Horwitz}$ tính được bằng 5,66, lớn hơn RSD_{AML} tính được của cả ba phương pháp CLS, PCR và PLS1. Đối với ATO, nồng độ xác định là 20ppm, RSD của ATO ở cả 3 phương pháp đều nhỏ hơn giá trị $1/2RSD_{Horwitz}$ bằng 5.1. Như vậy, các phương pháp CLS, PCR, PLS1 có độ lặp lại đạt yêu cầu (bảng 8).

Bảng 8. Kết quả các lần phân tích lặp lại xác định nồng độ AML, ATO trong mẫu thuốc ZOAMCO-A

Mẫu	m cân (g)	Nồng độ tìm lại (µg/mL)					
		Phương pháp CLS		Phương pháp PCR		Phương pháp PLS1	
		AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO
Lần 1	0,2790	10,19	21,28	10,66	21,25	10,67	21,26
Lần 2	0,2814	10,38	20,08	10,31	20,08	10,31	20,08
Lần 3	0,2810	9,88	21,03	10,37	21,01	10,38	21,02
Lần 4	0,2815	9,71	20,22	10,27	20,23	10,27	20,24
Lần 5	0,2799	10,04	21,28	10,56	21,26	10,57	21,26
Lần 6	0,2806	9,89	20,99	10,42	20,98	10,42	20,99
TB		10,01	20,81	10,43	20,80	10,44	20,81
RSD		2,40	2,54	1,44	2,48	1,48	2,49
$1/2RSD_{Horwitz}$		5,66	5,1	5,66	5,1	5,66	5,1

So sánh với phương pháp HPLC

Để đánh giá độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu, tiến hành gửi mẫu cho Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Dược phẩm Thừa Thiên Huế - Việt Nam phân tích định lượng bằng phương pháp tiêu chuẩn HPLC. Tiến hành so sánh và đánh giá kết quả phân tích của hai phương pháp bằng phương pháp thống kê.

Phân tích ANOVA một chiều kết quả trung bình giữa các nhóm phương pháp phân tích cho

thấy giá trị $F_{tính}$ là 1,840 và 0,1077 tương ứng với AML và ATO đều nhỏ hơn $F_{t\grave{a}o\grave{a}ng}$ = 4,066181 (bảng 9), giá trị $p\text{-value}_{AML}$ = 0,2181, $p\text{-value}_{ATO}$ = 0,9532 đều lớn hơn 0,05, như vậy giá trị trung bình kết quả phân tích của các phương pháp CLS, PCR, PLS1, HPLC không khác nhau đáng kể với mức tin cậy 95%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy không có sai số đáng kể trong việc xác định đồng thời AML và ATO bằng các phương pháp CLS, PCR, PLS1 và HPLC.

Bảng 9. Phân tích ANOVA so sánh sự khác biệt giá trị trung bình giữa các phương pháp phân tích

m cân	Khối lượng (mg) các chất quy về khối lượng trung bình 1 viên (m = 0,2814 g)							
	AML (mg)				ATO (mg)			
	(a)	(b)	(c)	(d)	(a)	(b)	(c)	(d)
0,2790	5,09	5,33	5,34	5,2	10,64	10,63	10,63	10,49
0,2814	5,19	5,16	5,16	5,24	10,04	10,04	10,04	10,54
0,2810	4,94	5,19	5,19	5,17	10,51	10,51	10,51	10,46
Khác biệt giữa các nhóm	SS	0,048113				0,023804		
	df	3				3		
	MS	0,016038				0,007935		
Khác biệt trong từng nhóm	SS	0,069728				0,589326		
	df	8				8		
	MS	0,008716				0,073666		
Tổng	SS	0,117842				0,623130		
	df	11				11		
F _{tính}		1,840				0,1077		
p-value		0,2181				0,9532		
F _{tra bảng}		4,066181				4,066181		

Trong đó: (a): Phương pháp CLS; (b): phương pháp PCR; (c): phương pháp PLS1; (d): phương pháp HPLC; SS: tổng bình phương; df: Bậc tự do; MS: trung bình bình phương.

3.6 Định lượng mẫu chế phẩm đa thành phần

Kết quả định lượng AML và ATO trong viên nén ZOAMCO-A thu được hàm lượng các

hoạt chất có trong một viên nén so với hàm lượng ghi trên nhãn nằm trong khoảng 90-110% theo quy định của Dược điển Việt Nam V [25].

Bảng 10. Kết quả phần trăm hàm lượng ghi trên nhãn của AML và ATO trong viên nén ZOAMCO-A

Mẫu	Khối lượng mẫu	Phần trăm hàm lượng ghi trên nhãn					
		Phương pháp CLS		Phương pháp PCR		Phương pháp PLS1	
		AML(%)	ATO(%)	AML(%)	ATO(%)	AML(%)	ATO(%)
Z1	0,2819	98,88	103,47	102,42	103,43	102,42	103,47
Z2	0,2798	99,82	106,50	100,37	106,43	100,37	106,41
Z3	0,2809	99,94	106,61	100,58	106,53	100,58	106,54
Trung bình		99,88	105,53	101,12	105,46	101,12	105,47

4 Kết luận

Nghiên cứu đã thành công trong việc áp dụng các phương pháp phân tích đa biến bao gồm: CLS, PCR, PLS1 để định lượng đồng thời AML và ATO trong dược phẩm viên nén phối hợp. Nghiên cứu đã lựa chọn khoảng bước sóng phổ hấp thụ UV-Vis từ 230 nm – 260 nm với bước nhảy 0.2 nm để xây dựng các mô hình hiệu chuẩn. Đối với phương pháp PCR, PLS1: số thành phần chính được giữ lại lần lượt là 3 và 2 thành phần chính để thực hiện hồi quy. Thiết kế thí nghiệm theo phương pháp CCD để xây dựng tập nồng độ hiệu chuẩn và thẩm định. Các tham số thống kê: RMSEC, RMSEP, REP, R^2 , phân tích phần dư bằng Shapiro-test đã được tính, kết quả cho thấy mô hình đáp ứng được các yêu cầu. Thẩm định quy trình phân tích được đánh giá bằng cách xác định độ đúng, độ lặp lại, so sánh với phương pháp chuẩn HPLC. Áp dụng các phương pháp CLS, PCR và PLS1 định lượng đồng thời AML, ATO trong viên nén Zoamco-A cho kết quả hàm lượng AML và ATO so với hàm lượng ghi trên nhãn nằm trong khoảng 90-110% phù hợp với quy định của Dược điển Việt Nam V.

Tài liệu tham khảo

1. Sankar A, Vetrichelvan T, Venkappaya D, Nagavalli D, Divya. Simultaneous estimation of ramipril, aspirin and atorvastatin calcium by classical least squares regression in capsule dosage form. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2011; 4(3):398-401.
2. Mohammadi A, Rezanour N, Dogaher MA, Bidkorbeh FG, Hashem M, Walker RB. A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *Journal of Chromatography B*. 2007; 846(1-2):215-21.
3. Varmuza K, Filzmoser P. Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics. CRC press; 2016.
4. Olivieri AC. Introduction to multivariate calibration: A practical approach. Springer; 2018.
5. Arabzadeh V, Sohrabi MRJC. Artificial neural network and multivariate calibration methods assisted UV spectrophotometric technique for the simultaneous determination of metformin and Pioglitazone in anti-diabetic tablet dosage form. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022; 221:104475.
6. El-Zaher AA, Elkady EF, Elwy HM, Saleh MAEMJSAPAM, Spectroscopy B. Simultaneous spectrophotometric determination of glimepiride and pioglitazone in binary mixture and combined dosage form using chemometric-assisted techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017;182:175-82.
7. Saadatmandi A, Sohrabi MR, Fard HKJC. Smart chemometrics spectrophotometry for rapid simultaneous quantitative determination of paracetamol, diphenhydramine, and phenylephrine in commercial tablet compared to high-performance liquid chromatography as a reference method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2023; =233:104732.
8. Bro RJACA. Multivariate calibration: what is in chemometrics for the analytical chemist?. *Analytica Chimica Acta*. 2003; 500(1-2):185-94.
9. Kramer R. Chemometric techniques for quantitative analysis. CRC Press; 1998.
10. Khajehsharifi H, Eskandari Z, Sareban NJAJoC. Using partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric analysis of pyrimidine bases. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10:S141-S7.
11. Sadeghian A, Jan NM, Wu O, Huang BJC. Robust probabilistic principal component regression with switching mixture Gaussian noise for soft sensing. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022;222:104491.
12. Méndez-Civieta Á, Aguilera-Morillo MC, Lillo REJC. Fast partial quantile regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022;223:104533.
13. Brereton RG. Chemometrics: data driven extraction for science. John Wiley & Sons; 2018.
14. Trần Cao Sơn. Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật; 2021.

15. Naguib IA, Abdelaleem EA, Hassan ES, Ali NW, Gamal MJSAPAM. Partial least squares and linear support vector regression chemometric models for analysis of Norfloxacin and Tinidazole with Tinidazole impurity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020; 239:118513.
16. Biancolillo A, Marini FJFic. Chemometric methods for spectroscopy-based pharmaceutical analysis. *Frontiers in Chemistry*. 2018;6:576.
17. Albayrak M, Demirkaya-Miloglu F, Senol O, Polatdemir EJJoAS. Design, optimization, and validation of chemometrics-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of etodolac and thiocolchicoside in pharmaceuticals. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2019;10(1):1-8.
18. Dinç E, Baleanu D, Onur FJJop. Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;26(5-6):949-57.
19. Abdi H, Williams LJJCTVI. Partial least squares methods: partial least squares correlation and partial least square regression. *Computational Toxicology*. 2013:549-79.
20. El-Kosasy A, Abdel-Aziz O, Magdy N, El Zahar NJSAPAM. Spectrophotometric and chemometric methods for determination of imipenem, ciprofloxacin hydrochloride, dexamethasone sodium phosphate, paracetamol and cilastatin sodium in human urine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016; 157:26-33.
21. Xie Z, Chen XJC. Partial least trimmed squares regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022;221:104486.
22. Yamashita GH, Anzanello MJ, Soares F, Rocha MK, Fogliatto FSJC. Selecting relevant wavelength intervals for PLS calibration based on absorbance interquartile ranges. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022 ;231:104689.
23. Analysis AOMo. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. AOAC International Gaithersburg, MD; 2016.
24. Saeys W, Mouazen AM, Ramon HJBe. Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Biosystems Engineering*. 2005;91(4):393-402.
25. Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam V. Nhà xuất bản Y học; 2018.