

XÂY DỰNG QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI METOPROLOL TARTRAT VÀ IVABRADIN HYDROCLORID TRONG CHẾ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Hoàng Anh Việt¹, Đoàn Nguyễn Minh Tâm¹, Phan Thanh Dũng¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Đau thắt ngực là một bệnh thường gặp ở các nước phát triển và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu, có xu hướng tăng ở những nước đang phát triển. Các thuốc sử dụng trong điều trị các bệnh tim mạch thường có giá thành cao. Việc kết hợp metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid trong một chế phẩm góp phần làm giảm giá thành sản phẩm và giúp cải thiện việc tuân thủ liệu điều trị của bệnh nhân. Tuy nhiên, hiện nay các dược điển vẫn chưa có các chuyên luận định lượng đồng thời hai hoạt chất này.

Đối tượng và phương pháp: Chế phẩm chứa đồng thời metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid của công ty cổ phần dược phẩm Boston. Khảo sát điều kiện sắc ký và thẩm định quy trình định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Kết quả: Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Sunfire™C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), pha động gồm methanol và acid trifluoroacetic 0,05% (35 : 65, tt/tt), tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl, thời gian sắc ký 15 phút, nhiệt độ cột 35 °C và bước sóng phát hiện 220 nm. Kết quả cho thấy được sự phân tách tốt của các pic: metoprolol tartrat ($t_R = 6,7$ phút) và ivabradin hydroclorid ($t_R = 9,0$ phút) với độ phân giải lớn ($R_s = 7,8$). Quy trình đạt yêu cầu về tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

Kết luận: Quy trình định lượng đồng thời metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC đạt các yêu cầu thẩm định

Từ khóa: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), metoprolol tartrat, ivabradin hydroclorid

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF METOPROLOL TARTRATE AND IVABRADINE HYDROCHLORIDE IN MULTI-COMPONENTS PHARMACEUTICALS

Hoang Anh Viet, Doan Nguyen Minh Tam, Phan Thanh Dung

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 4 - 2021: 102 - 112

Background: Angina pectoris is a common disease in developed countries, but they tend to increase even in developing countries, becoming one of the leading causes of death today. Most of medicines used in the treatment of cardiovascular diseases are expensive, including metoprolol tartrate and ivabradine hydrochloride. Therefore, pharmaceuticals consisted of both metoprolol tartrate and ivabradine hydrochloride is a combination that contributes to reduce costs, to help improve dose adherence and expand access to treatment for patients with angina. However, current pharmacopoeias do not have monographs for simultaneous determination of metoprolol tartrate and ivabradine hydrochloride.

Material and methods: A product contains both metoprolol tartrate and ivabradine hydrochloride, that is produced by Boston Pharmaceutical company. Firstly, the chromatographic conditions were investigated to find out the suitable ones, then the HPLC method was validated

Results: The analytes were run through Sunfire™C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) and monitored at 220 nm.

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

Tác giả liên lạc: PGS.TS.DS. Phan Thanh Dũng

ĐT: 0943957158

Email: dungphan@ump.edu.vn

Mobile phase containing methanol and acid trifluoroacetic 0.05% (35 : 65, v/v) was pumped through the column at a flow rate of 1 mL/min, injection volume was 10 µl and run time was about 15 minnutes. The column oven temperature was kept at 35 °C. Under the suitable chromatographic conditions, the peaks were eluted with good resolution ($R_s = 7.8$) and retention time of metoprolol tartrate and ivabradine hydrochloride were found to be 6.7 min and 9.0 min, respectively. Beside that, this method was validated and conformed system suitability, linearity and range, specificity, precision and accuracy.

Conclusions: *The procedure for simultaneous determination of metoprolol tartrate and ivabradine hydrochloride in multi-components pharmaceuticals by HPLC was successfully developed and validated*

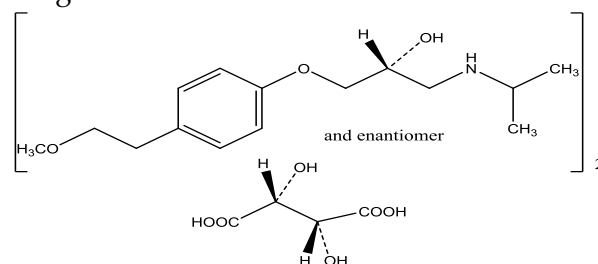
Keywords: *High performance liquid chromatography (HPLC), metoprolol tartrate, ivabradine hydrochloride*
ĐẶT VẤN ĐỀ

Đau thắt ngực (còn gọi là bệnh tim thiếu máu cục bộ) là một bệnh thường gặp ở các nước phát triển tuy nhiên chúng đang có xu hướng gia tăng kể cả ở những nước đang phát triển nói chung cũng như Việt Nam nói riêng. Theo một báo cáo của Viện đo lường và đánh giá sức khỏe (IHME) của Đại học Washington (Mỹ) vào năm 2018 thì bệnh tim thiếu máu cục bộ được xem là một trong các nguyên nhân chính gây tử vong tại Việt Nam (đứng hàng thứ 2) trong giai đoạn 10 năm (2007 - 2017)⁽¹⁾ và là một gánh nặng cho sức khỏe của cộng đồng.

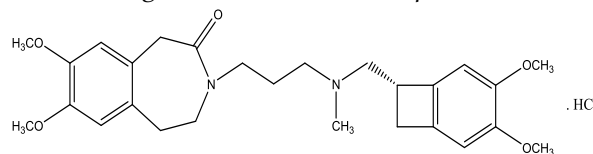
Bên cạnh đó, gánh nặng về kinh tế cũng là một vấn đề đáng quan tâm trong việc điều trị đau thắt ngực. Nhìn chung trên thị trường dược phẩm hiện nay, các thuốc sử dụng trong điều trị các bệnh lý về tim mạch thường có giá thành cao, trong đó có metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid. Vì vậy, việc kết hợp metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid trong một chế phẩm là một phương pháp giúp góp phần làm giảm giá thành sản phẩm cũng như tăng sự tuân thủ điều trị của bệnh nhân.

Hiện nay, trong các chuyên luận của các dược điển DĐVN V, USP43 vẫn chưa có chuyên luận định lượng đồng thời metoprolol tartrat và ivabradin trong chế phẩm phối hợp. Trên thế giới đã có một số công trình định lượng đồng thời hai hoạt chất bằng phương pháp HPLC với các điều kiện sắc ký khác nhau⁽²⁻⁴⁾. Tuy nhiên, tại Việt Nam, vẫn chưa có các nghiên cứu về quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất này để có sự phù hợp với điều kiện thực tế của nước ta.

Nhằm tạo điều kiện cho việc phát triển các thuốc generic của các công ty dược phẩm ở Việt Nam và góp phần giảm giá thành cho sản phẩm, đồng thời giúp cải thiện việc tuân thủ liệu điều trị ở các bệnh nhân (do phần lớn các bệnh nhân có độ tuổi từ 45 tuổi trở lên), cũng như mở rộng khả năng tiếp cận điều trị cho các bệnh nhân đau thắt ngực tại nước ta, đề tài được tiến hành với mục tiêu xây dựng và thẩm định quy trình định lượng metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), góp phần xây dựng tiêu chuẩn cho các chế phẩm thuốc chứa hai hoạt chất metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid trong nước.



Hình 1. Công thức cấu tạo của metoprolol tartrat



Hình 2. Công thức cấu tạo của ivabradin hydroclorid

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu nghiên cứu

Chế phẩm nghiên cứu của phòng nghiên cứu và phát triển – Công ty cổ phần dược phẩm Boston Việt Nam.

Mỗi viên nén chứa metoprolol tartrat 50 mg và ivabradin hydroclorid 8,085 mg (tương đương với ivabradin 7,5 mg)

Chất chuẩn

Metoprolol tartrat; Số lô: WS.0215228.01; hàm lượng: 99,89%; nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

Ivabradin hydroclorid; Số lô: 0000080412; hàm lượng: 99,2%; nguồn gốc: Sigma.

Dung môi, hóa chất

Methanol (MeOH) và acetonitril (ACN) đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Acid trifluoroacetic (TFA), acid phosphoric và acid formic đạt tiêu chuẩn phân tích

Trang thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Waters Alliance 2695 kết hợp đầu dò PDA Waters 2996 với cột sắc ký Sunfire™C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

Cân phân tích và các dụng cụ thủy tinh đã được hiệu chuẩn theo GLP và các dụng cụ thông thường khác.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị các dung dịch phân tích

Dung dịch TFA 0,05%

Hút chính xác 0,5 ml TFA pha loãng trong 1000 ml dung dịch nước cất 2 lần. Dung dịch sau đó được lọc qua màng lọc 0,45 µm và siêu âm khử khí 30 phút trước khi tiến hành sắc ký.

Dung dịch pha mẫu

Hỗn hợp dung dịch MeOH và TFA 0,05% với tỉ lệ 35 : 65 (tt/tt).

Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác 125 mg metoprolol tartrat và 20,21 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 18,75 mg ivabradin) cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, lắc kỹ cho tan hoàn toàn. Sau đó thêm dung môi pha mẫu đến vạch cho vừa đủ 50 ml, lắc đều. Dung dịch thu được có nồng độ của metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid tương ứng với

khoảng 2500 ppm và 404,2 ppm (tương ứng với nồng độ ivabradin là 375 ppm).

Dung dịch chuẩn

Hút chính xác 5 ml dung dịch chuẩn gốc, cho vào bình định mức 25 ml, thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều. Dung dịch thu được có nồng độ của metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid tương ứng với khoảng 500 ppm và 80,84 ppm (tương ứng với nồng độ ivabradin là 75 ppm). Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử

Cân 20 viên thuốc, tính khối lượng trung bình của 1 viên, cho vào cối và nghiền thành bột mịn, trộn đều. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 50 mg metoprolol tartrat và 8,085 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 7,5 mg ivabradin), cho vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Lọc qua giấy lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí. Dung dịch thu được có nồng độ của metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid tương ứng với khoảng 500 ppm và 80,84 ppm (tương ứng với nồng độ ivabradin là 75 ppm).

Dung dịch giả dược

Cân chính xác một lượng bột giả dược tương ứng với khối lượng trung bình viên cho vào bình định mức 100 ml rồi tiến hành chuẩn bị như dung dịch thử. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí.

Mẫu trắng

Dung dịch pha mẫu

Dung dịch giả dược thêm chuẩn

Cân chính xác một lượng bột giả dược tương ứng với khối lượng trung bình viên, cho vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội, thêm 2 ml dung dịch chuẩn gốc, rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Lọc qua giấy

lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử thêm chuẩn

Cân 20 viên thuốc, tính khối lượng trung bình của 1 viên, cho vào cối và nghiền thành bột mịn, trộn đều. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 50 mg metoprolol tartrat và 8,085 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 7,5 mg ivabradin), cho vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội, thêm 2 ml dung dịch chuẩn gốc, rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Lọc qua giấy lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , siêu âm đuổi khí.

Chuẩn bị các dung dịch ở các điều kiện phân hủy

Dung dịch thử trong môi trường oxy hóa trong 24 giờ

Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 50 mg metoprolol tartrat và 8,085 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 7,5 mg ivabradin) vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội, thêm 10 ml dung dịch H_2O_2 30%, rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Dung dịch thu được để ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Lọc qua giấy lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử đặt ở nhiệt độ 80 °C trong 48 giờ

Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 50 mg metoprolol tartrat và 8,085 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 7,5 mg ivabradin), sau đó trải đều lượng bột thuốc này lên một đĩa petri. Đặt đĩa petri này vào tủ sấy ở nhiệt độ 80 ± 2 °C trong vòng 48 giờ. Sau 48 giờ, chuyển lượng bột thuốc này vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Lọc qua giấy lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử được chiếu ánh sáng trực tiếp trong 24 giờ

Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 50 mg metoprolol tartrat và 8,085 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 7,5 mg ivabradin), sau đó trải đều lượng bột thuốc này lên một đĩa petri. Đặt đĩa petri này dưới ánh nắng mặt trời trong 24 giờ (trong vòng 4 ngày mỗi ngày 6 giờ). Sau đó, chuyển lượng bột thuốc này vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Lọc qua giấy lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử được chiếu UV

Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 50 mg metoprolol tartrat và 8,085 mg ivabradin hydroclorid (tương ứng với 7,5 mg ivabradin), sau đó trải đều lượng bột thuốc này lên một đĩa petri. Đặt đĩa petri này dưới đèn tử ngoại 254 nm trong 6 giờ. Sau đó, chuyển lượng bột thuốc này vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 50 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, sau đó để nguội rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch và lắc đều. Lọc qua giấy lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , siêu âm đuổi khí.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid được pha trong hỗn hợp dung môi và được tiến hành sắc ký với các điều kiện sắc ký cố định như cột sắc ký Sunfire™C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl và bước sóng phát hiện là 220 nm. Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký bao gồm tỷ lệ pha động, loại dung môi pha động, loại acid, nồng độ acid và nhiệt độ cột.

Thẩm định quy trình định lượng

Tiến hành thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của ICH và theo Quyết định của Cục trưởng Cục quản lý Dược, Bộ Y tế số 07/QĐ-QLD ngày 11 tháng 01 năm 2013 về việc ban hành Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, phụ lục 8 với các chỉ tiêu bao gồm: tính phù hợp của hệ

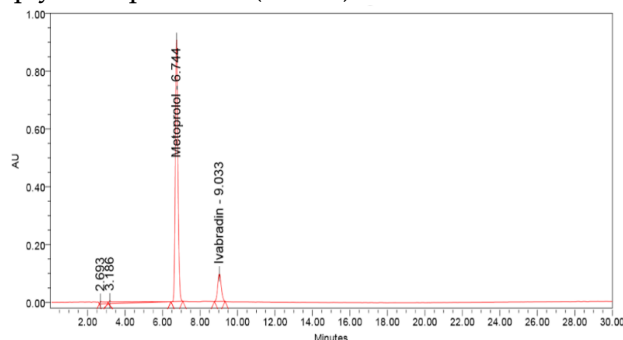
thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính và khoảng xác định, độ đúng, độ chính xác.

KẾT QUẢ

Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát tỷ lệ pha động

Tiến hành khảo sát tỷ lệ giữa MeOH và TFA 0,05% tại các tỷ lệ 50 : 50, 40 : 60, 35 : 65 và 30 : 70 (tt/tt). Qua các điều kiện tỷ lệ pha động được chọn cho quá trình khảo sát, tỷ lệ MeOH – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt) được chọn để tiến hành cho quy trình phân tích (Hình 3).



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn được tiến hành sắc ký ở tỷ lệ pha động MeOH – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt)

Nhận xét: tại tỷ lệ pha động MeOH – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt), pic metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid thu được đạt độ tinh khiết pic với thời gian lưu tương ứng lần lượt là 6,744 phút và 9,033 phút, giúp rút ngắn thời gian phân tích hơn so với khi khảo sát ở tỷ lệ MeOH – TFA 0,05% (30 : 70, tt/tt), đồng thời có hệ số bất đối nằm trong khoảng từ 0,8 – 1,5 và hai pic tách nhau với hệ số phân giải lớn ($R_s = 7,8$).

Khảo sát loại dung môi pha động

Tiến hành khảo sát loại dung môi pha động bằng cách thay MeOH bằng ACN. Với cùng điều kiện phân tích và tỷ lệ pha động: tỷ lệ MeOH/ACN – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt), cột sắc ký: cột Sunfire™C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm); nhiệt độ cột: 35 °C; bước sóng phát hiện: 220 nm, khi tiến hành khảo sát với ACN các pic rửa giải sớm, xuất hiện trước cả thời gian chết cột, các pic thu được chưa thể tách được metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid (từ kết quả truy xuất phổ UV, pic metoprolol tartrat và ivabradin

hydroclorid bị rửa giải đồng thời với nhau tại pic (2)) và các pic thu được không đạt độ tinh khiết pic.

Ngược lại, khi khảo sát với MeOH, pic metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid thu được tách nhau hoàn toàn và các pic thu được đạt các yêu cầu về thông số sắc ký.

Sau khi khảo sát, kết quả thu được cho thấy dung môi MeOH là dung môi phù hợp cho quy trình phân tích.

Khảo sát loại acid và nồng độ acid

Tiến hành khảo sát loại dung môi pha động bằng cách thay TFA 0,05% bằng acid formic 0,1% và acid phosphoric 0,1% và giữ nguyên các điều kiện phân tích như cột sắc ký, tỷ lệ pha động, tốc độ dòng, bước sóng phát hiện.

Khi thực hiện sắc ký với acid formic 0,1% và acid phosphoric 0,1%, hai pic của metoprolol tartrat và ivabradin hydroclorid không thể tách được nhau đồng thời cũng bị rửa giải sớm.

Với TFA 0,05%, các pic của 2 chất cần phân tích tách nhau hoàn toàn, đạt độ tinh khiết và cũng như các yêu cầu khác.

Do đó, TFA 0,05% được chọn cho quy trình phân tích.

Khảo sát nhiệt độ cột

Khi tăng nhiệt độ cột, thời gian lưu của 2 pic được rút ngắn hơn đồng thời hệ số bất đối của pic metoprolol tartrat cũng giảm theo. Sau quá trình khảo sát, nhiệt độ cột 35 °C là nhiệt độ cột được lựa chọn để đảm bảo các pic thu được đạt được các thông số sắc ký cũng như rút ngắn thời gian sắc ký.

Từ các kết quả khảo sát, điều kiện sắc ký được lựa chọn: Cột sắc ký Sunfire™C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm); pha động gồm MeOH – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt); tốc độ dòng 1 ml/phút; thời gian sắc ký 15 phút; nhiệt độ cột 35 °C; thể tích tiêm mẫu 10 μl và bước sóng phát hiện 220 nm.

Thẩm định quy trình định lượng

Tính phù hợp của hệ thống

Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống được trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên mẫu chuẩn (n = 6)

	Metoprolol tartrat (MTT)				Ivabradin hydroclorid (IVH)				
	<i>t_R</i> (phút)	S (μAU x giây)	A _s	N	<i>t_R</i> (phút)	S (μAU x giây)	R _s	A _s	N
Trung bình	6,700	8432140	1,2	11177	9,034	1216070	7,8	1,1	10438
RSD %	0,15	0,45		0,63	0,17	0,69	0,52		0,37

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên mẫu thử (n = 6)

	MTT				IVH				
	<i>t_R</i> (phút)	S (μAU x giây)	A _s	N	<i>t_R</i> (phút)	S (μAU x giây)	R _s	A _s	N
Trung bình	6,680	8455570	1,2	11183	9,005	1217713	7,8	1,1	10459
RSD %	0,08	0,26		0,33	0,11	0,22	0,52		0,87

t_R: thời gian lưu; S: diện tích pic; A_s: hệ số bất đối; N: số đĩa lý thuyết biểu kiến; R_s: độ phân giải

Nhận xét: RSD của thời gian lưu và diện tích pic của MTT và IVH của cả mẫu chuẩn và mẫu thử đều nhỏ hơn 2%, R_s = 7,8 > 1,5, hệ số bất đối nằm trong khoảng từ 0,8 – 1,5 và số đĩa lý thuyết biểu kiến ≥ 2000.

Như vậy, phương pháp phân tích đạt yêu cầu tính phù hợp của hệ thống.

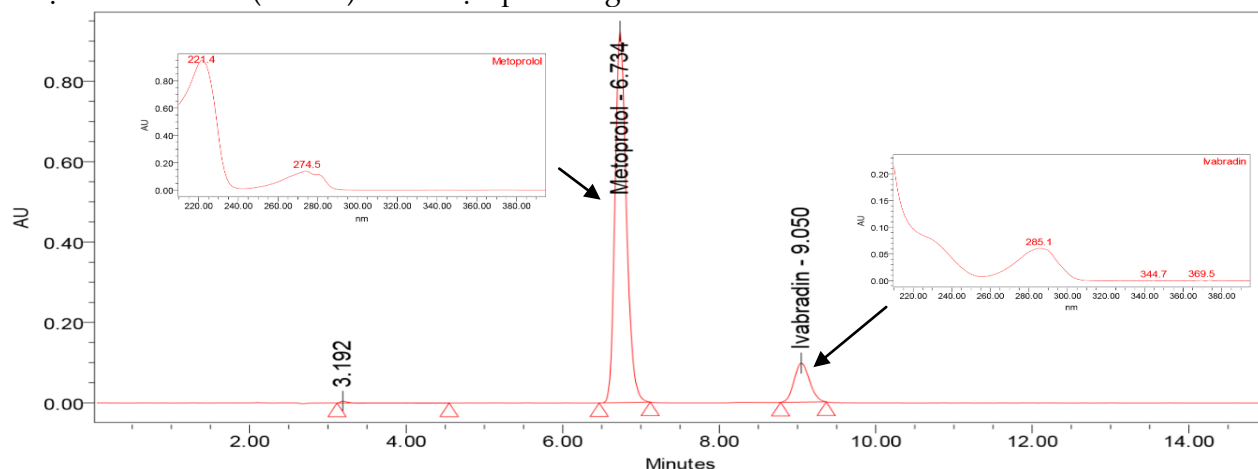
Tính đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy trên sắc ký đồ mẫu thử (Hình 4) cho pic có thời gian lưu tương ứng với pic của chất chuẩn trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn (Hình 5); sắc ký đồ các mẫu trắng (Hình 6), mẫu giả được (Hình 7) không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn; mẫu thử thêm chuẩn (Hình 8), chiều cao và diện tích pic của MTT và IVH có sự tăng lên so với mẫu thử; sắc ký đồ mẫu giả được thêm chuẩn (Hình 9) xuất hiện pic trong

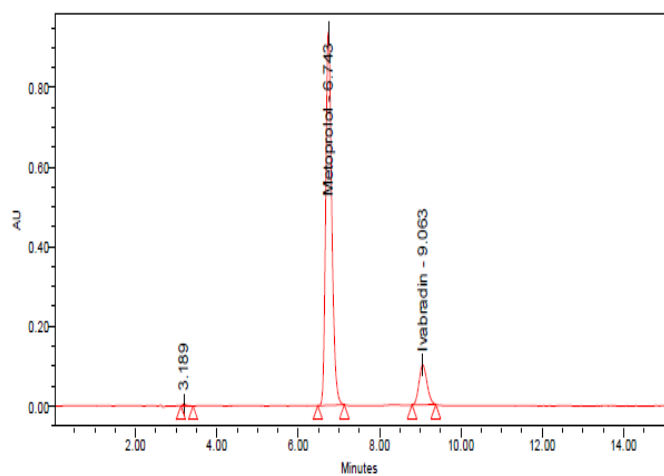
khoảng thời gian lưu tương ứng với MTT và IVH trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thử phân hủy ở điều kiện nhiệt độ 80 °C, UV, ánh sáng và trong môi trường oxy hóa không thấy có sự xuất hiện của pic tạp, các pic MTT và IVH xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với mẫu chuẩn và đạt độ tinh khiết pic (Hình 10 - 13); sắc ký đồ mẫu thử phân hủy trong điều kiện ánh sáng có sự xuất hiện của các pic tạp và pic tạp này được tách rõ ràng khỏi các pic MTT và IVH. Như vậy phương pháp định lượng đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

Tính tuyến tính và khoảng xác định

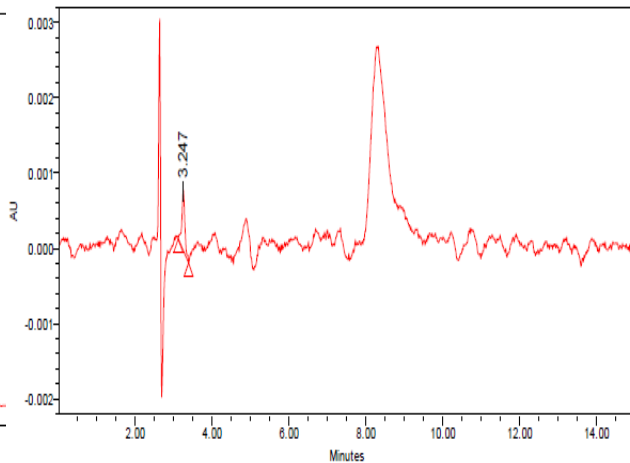
Từ dung dịch chuẩn gốc pha thành dãy dung dịch chuẩn ở 5 mức nồng độ với nồng độ của MTT từ 400 – 600 ppm và IVH từ 64,67 – 97,01 ppm. Tiến hành sắc ký các dung dịch trên với điều kiện sắc ký đã khảo sát. Kết quả khảo sát tính tuyến tính được trình bày ở Bảng 3.



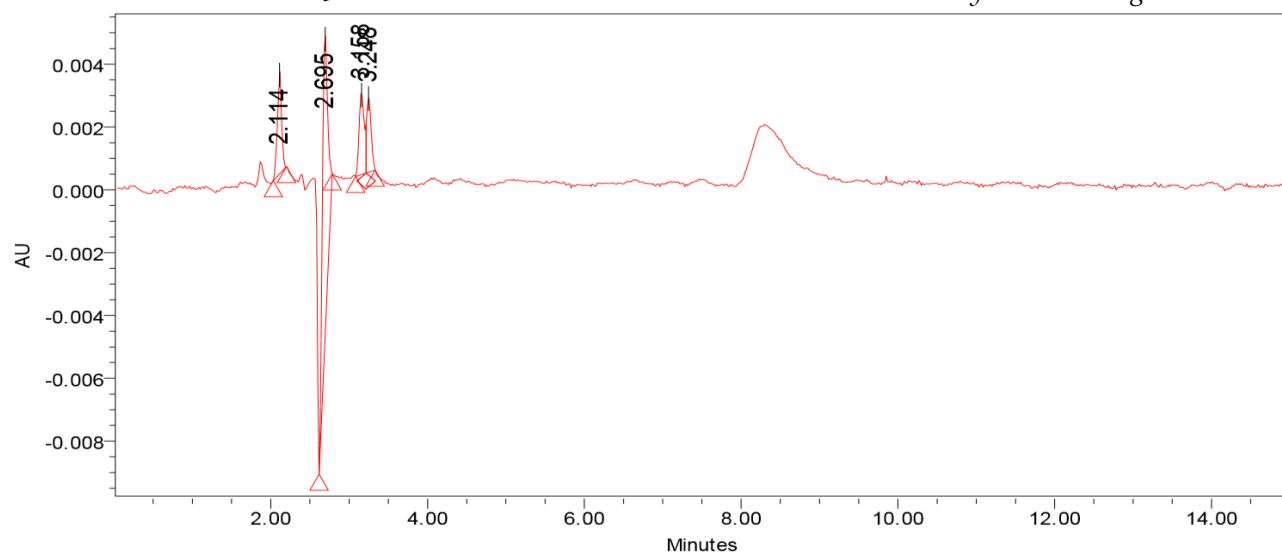
Hình 4. Sắc ký đồ và phổ UV-Vis của MTT và IVH trong mẫu thử



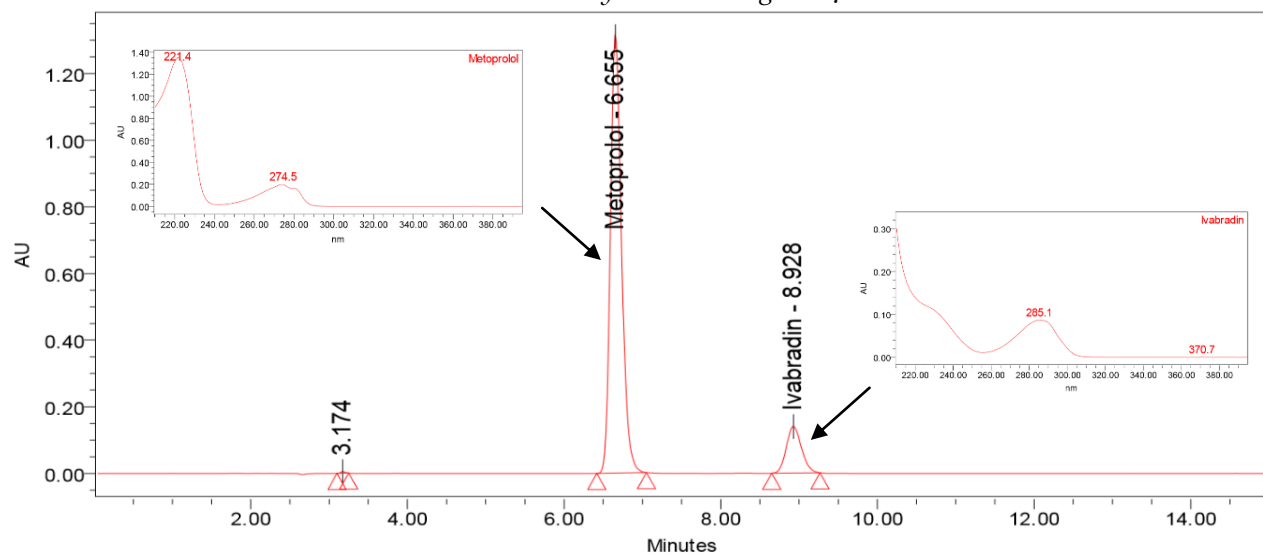
Hình 5. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



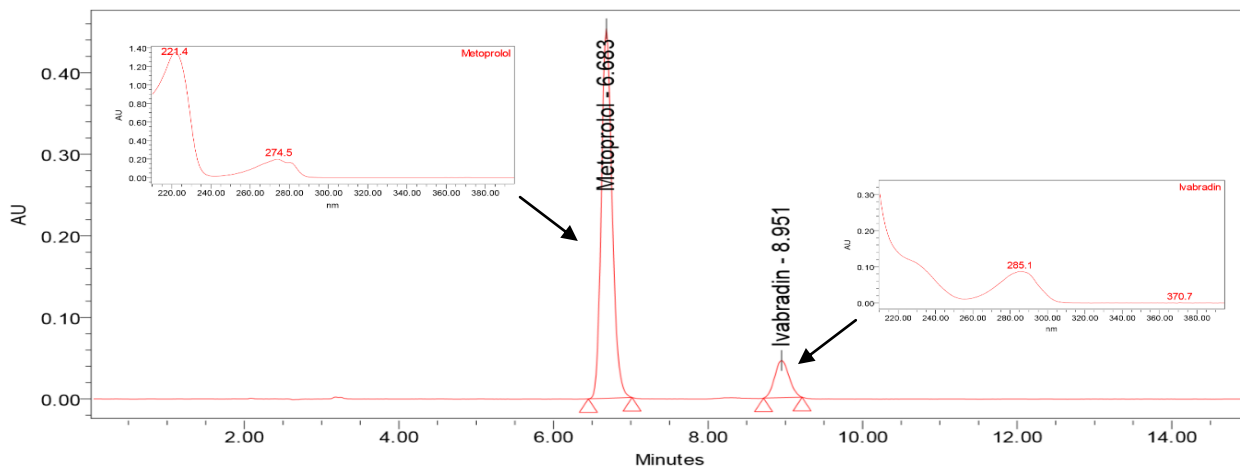
Hình 6. Sắc ký đồ mẫu trắng



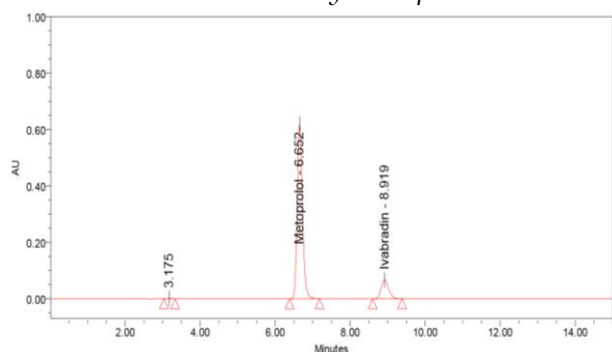
Hình 7. Sắc ký đồ của mẫu giả dược



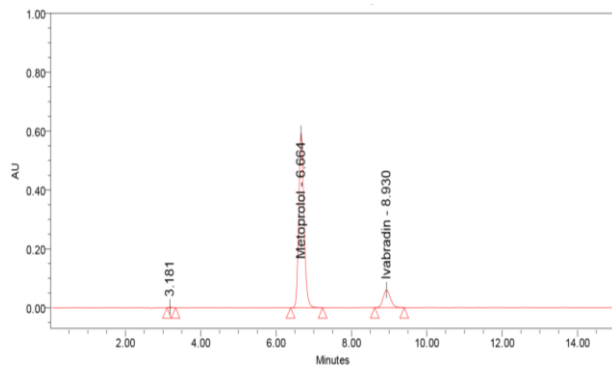
Hình 8. Sắc ký đồ và phổ UV-Vis của MTT và IVH trong mẫu thử thêm chuẩn



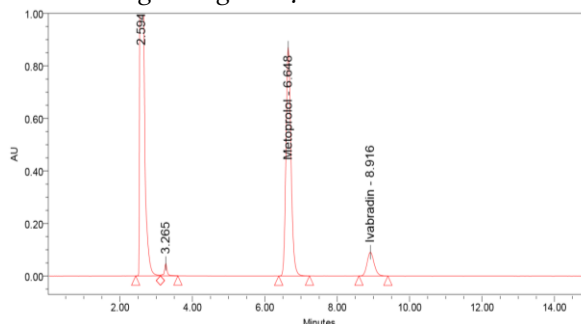
Hình 9. Sắc ký đồ và phổ UV-Vis của MTT và IVH trong mẫu giả dược thêm chuẩn



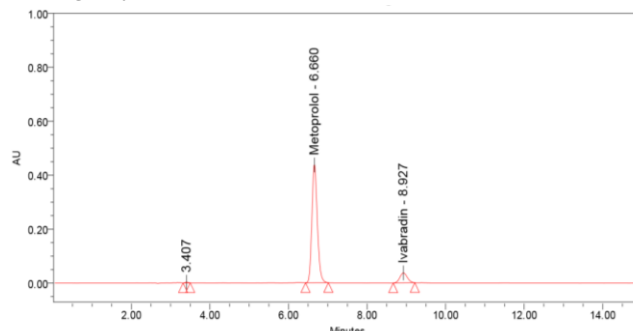
Hình 10. Sắc ký đồ mẫu thử phân hủy bằng nhiệt độ



Hình 11. Sắc ký đồ mẫu thử phân hủy bằng UV



Hình 12. Sắc ký đồ mẫu thử phân hủy trong môi trường oxy hóa



Hình 13. Sắc ký đồ mẫu thử phân hủy bằng ánh sáng

Bảng 3. Tương quan nồng độ, diện tích pic và kết quả khảo sát tuyến tính của MTT và IVH

MTT				IVH			
Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (μAU x giây)	Phương trình hồi quy/ Hệ số tương quan	Khoảng tuyến tính (ppm)	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (μAU x giây)	Phương trình hồi quy/ Hệ số tương quan	Khoảng tuyến tính (ppm)
399,88	6689481	$\hat{y} = 17208,6858x;$ $R^2 = 0,9995$	400 – 600	64,19	935583	$\hat{y} = 15834,4277x;$ $R^2 = 0,9993$	64,67 – 97,01
449,86	7483857			72,21	1079787		
499,85	8404601			80,23	1194391		
549,83	9308405			88,26	1330734		
599,82	10078084			96,28	1445331		

Sử dụng trắc nghiệm t và trắc nghiệm F xác định được: phương trình hồi quy có tính

tương thích, hệ số B có ý nghĩa và hệ số B₀ không có ý nghĩa.

Như vậy, phương trình đạt tính tuyến tính với khoảng tuyến tính của MTT từ 400 – 600 ppm và IVH từ 64,67 – 97,01 ppm và hệ số tương quan tuyến tính của cả hai phương trình đều > 0,999.

Độ chính xác

Độ lặp lại

Chuẩn bị 6 dung dịch thử, tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử đã chuẩn bị, mỗi mẫu tiêm 1 lần.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Mẫu phân tích	Lượng cân mẫu thử (mg)	MTT		IVH	
		Diện tích pic (μAU x giây)	HL % so với nhãn	Diện tích pic (μAU x giây)	HL % so với nhãn
Mẫu chuẩn					
Mẫu thử 1	251,6	8499259	100,13	1219769	100,12
Mẫu thử 2	251,8	8496139	100,01	1222951	100,30
Mẫu thử 3	249,3	8384233	99,68	1187153	98,34
Mẫu thử 4	248,5	8350502	99,60	1185892	98,56
Mẫu thử 5	248,3	8323044	99,35	1182736	98,37
Mẫu thử 6	248,7	8339196	99,39	1178796	98,72
Trung bình			99,69		99,07
RSD%			0,32		0,91

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp

	Kiểm nghiệm viên 1		Kiểm nghiệm viên 2	
	Hàm lượng % so với nhãn			
	MTT	IVH	MTT	IVH
Trung bình (n = 6)	99,69	99,87	99,87	99,17
RSD% (n = 6)	0,32	0,91	0,30	0,53
Kết quả phân tích của cả 2 kiểm nghiệm viên				
Trung bình (n = 12)			99,78	99,09
RSD% (n = 12)			0,31	0,71

Kết quả định lượng MTT và IVH của từng kiểm nghiệm viên cũng như của cả 2 kiểm nghiệm viên đều thu được kết quả RSD% đều nhỏ hơn 2%.

Như vậy, quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác

Độ đúng

Chuẩn bị 3 loại mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác một lượng chất chuẩn vào các mẫu giả dược. Lượng chất chuẩn thêm vào tương

Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở *Bảng 4*.

Độ chính xác trung gian

Thay đổi kiểm nghiệm viên và tiến hành tương tự bằng cách chuẩn bị 6 dung dịch thử nhưng khác ngày. Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử đã chuẩn bị, mỗi mẫu tiêm 1 lần. Kết quả định lượng của 2 kiểm nghiệm viên được trình bày trong *Bảng 5*.

ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% của nồng độ đo. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện ít nhất 3 mẫu độc lập. Tiến hành sắc ký các mẫu đã chuẩn bị, mỗi mẫu tiêm 1 lần. Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng được trình bày trong *Bảng 6*.

Tỷ lệ thu hồi của MTT và IVH ở cả 3 mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98 – 102% với RSD% của cả 2 chất phân tích đều nhỏ hơn 2%.

Như vậy, quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp (N = 3)

Mẫu phân tích	MTT				IVH			
	Nồng độ thêm vào (ppm)	Nồng độ tìm lại (ppm)	S (μAU x giây)	% thu hồi	Nồng độ thêm vào (ppm)	Nồng độ tìm lại (ppm)	S (μAU x giây)	% thu hồi
Chuẩn	499,85		8424730		80,23		1198457	
80%	400,56	397,21	6694775	99,16	63,49	63,18	943726	99,51
	399,56	396,63	6685013	99,27	63,59	63,08	942263	99,20
	397,56	397,44	6698587	99,97	63,69	63,14	943129	99,14
Trung bình				99,47				99,29
RSD%				0,44				0,20
100%	504,44	502,74	8473403	99,66	80,65	79,95	1194286	99,14
	499,45	502,05	8461861	100,52	80,85	80,54	1203012	99,62
	500,45	498,53	8402480	99,62	80,45	79,92	1193832	99,34
Trung bình				99,93				99,37
RSD%				0,51				0,24
120%	595,34	590,60	9954273	99,20	96,12	95,27	1464100	99,11
	596,34	591,63	9971601	99,21	96,32	95,73	1462463	99,38
	600,34	596,73	10057558	99,40	96,52	99,42	1468049	99,89
Trung bình				99,27				99,46
RSD%				0,11				0,40

BÀN LUẬN

Trong kỹ thuật sắc ký pha đảo, khả năng phân tách các chất phụ thuộc vào nhiều yếu tố như bản chất của chất phân tích, loại pha tĩnh, bản chất pha động, tỷ lệ pha động.

Trong đó, dung môi pha động sử dụng trong kỹ thuật sắc ký pha đảo thường có độ phân cực cao. Và trên thực tế, các dung môi hữu cơ được sử dụng chủ yếu gồm MeOH, ACN và tetrahydrofuran. Khi khảo sát dung môi pha động là ACN và MeOH thì ACN rửa giải các chất sớm, trùng với thời gian chết của cột. Trong khi MeOH rửa giải các chất với thời gian lưu hợp lý hơn, đồng thời các pic thu được đạt độ tinh khiết pic và các yêu cầu khác. Do đó, MeOH là dung môi pha động được chọn.

Đồng thời, thông qua quá trình khảo sát điều kiện sắc ký, kết quả thu được cho thấy độ phân cực của của pha động ảnh hưởng đến thời gian lưu của các chất phân tích. Cụ thể khi tăng tỷ lệ MeOH dẫn đến làm độ phân cực của pha động càng giảm, các chất phân tích được rửa giải càng sớm và khó tách nhau hơn. Bên cạnh đó, giữa 2 chất phân tích, MTT là chất phân cực hơn so với IVH do đó MTT sẽ được rửa giải sớm hơn, phù hợp với kết quả sắc ký.

MTT có pKa là 9,67 và IVH có pKa là 9,37, khi trong pha động được chọn là acid cả hai chất này đều tồn tại ở dạng ion, cụ thể là tồn tại ở dạng ion dương, nên dễ bị rửa giải sớm mà không có xảy ra sự tương tác với pha tĩnh kém phân cực, vì vậy TFA được lựa chọn với nồng độ thích hợp với cơ chế sắc ký đề nghị là cơ chế sắc ký cặp ion, giúp tăng tương tác của các chất lên cột và rửa giải với thời gian hợp lý. Với acid phosphoric là một acid có độ mạnh trung bình chủ yếu dùng để duy trì pH và chuyển dạng ion về dạng phân tử của các nhóm -OH phenol hoặc các gốc acid yếu khác mà không tạo được cơ chế sắc ký cặp ion. Với acid formic, đây cũng là một acid có khả năng tạo cặp ion với chất phân tích tuy nhiên do mạch carbon chỉ có 1C nên khả năng làm giảm độ phân cực của chất phân tích tương đối thấp nên chất phân tích vẫn bị rửa giải sớm.

Nồng độ của TFA cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến khả năng phân tách và rửa giải của phương pháp. Vì vậy cần tiến hành khảo sát nồng độ của acid để chọn nồng độ có khả năng tách tốt nhất và thời gian phân tích hợp lý. Tại nồng độ acid thấp (TFA 0,01%) không đủ tác nhân để tạo cặp ion với các chất phân tích vì vậy, các chất rửa giải sớm hơn và các pic thu được không đạt hệ số

bất đối. Từ kết quả khảo sát, nồng độ TFA 0,05% được lựa chọn là phù hợp nhất.

Mặt khác, nhiệt độ cột cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến độ nhớt của pha động, MeOH là một trong các loại dung môi hữu cơ có độ nhớt tương đối lớn, khi phối hợp với nước acid sẽ làm cho độ nhớt của pha động tăng thêm, dẫn đến làm tăng áp suất cột, do đó thực hiện sắc ký ở điều kiện nhiệt độ 35 °C với mục đích giảm độ nhớt pha động, giảm áp suất cột, từ đó rút ngắn thời gian lưu của chất phân tích và đồng thời giúp pic của các chất phân tích đạt hệ số bất đối từ 0,8 – 1,5.

Nhìn chung, quy trình định lượng đồng thời MTT và IVH sử dụng hỗn hợp pha động gồm MeOH – TFA 0,05% với chương trình rửa giải isocratic đã phân tích tốt đồng thời hai chất MTT và IVH, bên cạnh đó khắc phục được các nhược điểm là sử dụng hệ đệm phosphat của những công trình nghiên cứu đã được công bố trước đó, đảm bảo kéo dài tuổi thọ cho cột, cũng như hạn chế sự ăn mòn hệ thống HPLC đồng thời vẫn đảm bảo sự phù hợp của các thông số sắc ký theo quy định.

KẾT LUẬN

Sau thời gian thực hiện, đề tài đã thu được các kết quả cụ thể như sau:

Từ những kết quả của quá trình khảo sát, đề tài đã chọn ra được điều kiện sắc ký tối ưu nhất để tách đồng thời MTT và IVH với điều kiện cụ thể như sau:

Cột sắc ký: cột Sunfire™C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

Bước sóng phát hiện: 220 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

Nhiệt độ cột: 35 °C.

Thể tích tiêm mẫu: 10 µl.

Dung môi pha mẫu: MeOH – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt).

Pha động: MeOH – TFA 0,05% (35 : 65, tt/tt).

Quy trình đã được thẩm định và đạt các yêu cầu

Tính tương thích hệ thống

Phương pháp đạt tính tương thích hệ thống với giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic phải ≤ 2% và các thông số khác của pic phải đáp ứng yêu cầu chung của phương pháp sắc ký đã được quy định.

Độ đặc hiệu

Quy trình đã tách được các pic rõ ràng, đạt độ tinh khiết pic. Ngoài ra, quy trình còn tiến hành với các mẫu thử ở điều kiện khắc nghiệt và các pic tạp sinh ra đều không trùng với các pic chính.

Tính tuyến tính và miền giá trị

Khoảng tuyến tính của MTT được xác định từ 400 – 600 ppm (r = 0,9995) và IVH từ 64,67 – 97,01 ppm (r = 0,9993).

Độ đúng

Tỷ lệ thu hồi của cả 2 chất đều nằm trong khoảng từ 98-102% (RSD ≤ 2%).

Độ chính xác

Giá trị RSD kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu đều ≤ 2%.

Quy trình đã được thẩm định cho phép phương pháp này có thể được ứng dụng trong định lượng đồng thời MTT và IVH trong viên nén bao phim bằng phương pháp HPLC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *What causes the most deaths?* URL: <http://www.healthdata.org/vietnam> (access on 01/08/2020).
2. Kanthale SB, et al (2019). Stability indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of ivabradine and metoprolol in bulk and tablet formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(4):137-144.
3. Sanapathi R, Galla R, Adepu G (2020). Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of ivabradine and metoprolol in tablet dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(6):2786-2792.
4. Bidkar JS, Dama GY, Shelke MM, et al (2019). Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for the estimation of metoprolol and ivabradine in solid dosage form. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(7):1742-1768.

Ngày nhận bài báo:

12/01/2021

Ngày phản biện nhận xét bài báo:

14/06/2021

Ngày bài báo được đăng:

20/08/2021