

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Đinh Thị Lan Linh*, Nguyễn Thành Nghĩa

Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*dtlinh@ntt.edu.vnQu

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất sẵn có. Một phương pháp đã được xây dựng để định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin với pha động gồm acetonitril-nước acid perchloric 0,01 % (33:67), pha tĩnh là cột HiQ sil C18HS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột 35 °C, tốc độ dòng 1,2 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μL, đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 215 nm. Điều kiện xử lý mẫu: chiết bằng ethanol, không siêu âm. Phương pháp đã được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH gồm tính phù hợp hệ thống; độ đặc hiệu; tính tuyến tính từ (5-35) ppm và (10100) ppm lần lượt cho indapamid và perindopril tert-butylamin với hệ số tương quan $R > 0,9999$; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,59 ppm và 1,79 ppm với indapamid và 1,47 ppm và 4,45 ppm với perindopril tert-butylamin; độ đúng, tỷ lệ thu hồi (98,0-102,0) %; độ chính xác SD < 2,0 %.

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 04/09/2024

Được duyệt 23/11/2024

Công bố 28/12/2024

Từ khóa

tăng huyết áp, indapamid, Perindopril tert-butylamin, HPLC, thẩm định.

1 Đặt vấn đề

Tăng huyết áp (HA) là một vấn đề sức khỏe nghiêm trọng trên toàn thế giới, là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu [1]. Hiện nay, trên thế giới có khoảng 1,5 tỷ người mắc tăng HA và 9,4 triệu ca tử vong mỗi năm. Ở nước ta, theo thống kê trong 5 người trưởng thành sẽ có 1 người bị tăng HA. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều trường hợp mắc tăng HA chưa được phát hiện hoặc đang điều trị nhưng chưa được kiểm soát HA [2].

Mục tiêu chính trong điều trị tăng HA hiện nay là đưa HA về mức mục tiêu (< 140/90 mmHg theo hướng dẫn của WHO). Tuy nhiên, việc đơn trị liệu khó có thể kiểm soát và duy trì HA mục tiêu trong trường hợp tăng HA gây ra bởi sự phối hợp của nhiều cơ chế phức tạp do bệnh nhân cần phải được điều trị bằng nhiều loại thuốc

hạ HA cùng lúc. Do đó, ngày càng có nhiều hướng dẫn điều trị tăng HA của các quốc gia, khu vực và cả WHO đều khuyến cáo nên sử dụng viên phối hợp với liều cố định nhằm đơn giản hóa quy trình điều trị và tăng khả năng tuân thủ của bệnh nhân [3-6]. Trong đó, phối hợp đôi giữa nhóm thuốc ức chế men chuyển (perindopril tert-butylamin) hoặc nhóm thuốc chặn kênh canxi với nhóm thuốc lợi tiểu thiazid/ thiazid – like (indapamid) là lựa chọn đầu tay bởi mang lại nhiều lợi ích trong việc kiểm soát HA và tăng khả năng dung nạp của bệnh nhân đồng thời làm giảm tác dụng phụ của mỗi nhóm thuốc gây ra [7, 8].

Mặc dù có nhiều kỹ thuật để định lượng indapamid và perindopril tert-butylamin như quang phổ hấp thụ tử ngoại (UV-Vis), sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) nhưng kỹ thuật sắc ký lỏng (LC) vẫn là kỹ



thuật phổ biến nhất. Một số quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất trên đã được công bố trên thế giới, song trong Dược điển Việt Nam V, Dược điển Mỹ hay Dược điển châu Âu vẫn chưa ban hành chuyên luận định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo hướng dẫn của Hội đồng quốc tế về Hải hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (ICH).

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

2.1.1 Mẫu nghiên cứu

Chế phẩm viên nén dorover plus của Công ty Cổ phần Xuất nhập khẩu Y tế DOMESCO. Mỗi viên nén chứa 1,25 mg indapamid và 4 mg perindopril tert-butylamin.

2.1.2 Chất đối chiếu

Indapamid (97,9 %), perindopril ter-butylamin (99,7 %), của Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.HCM, Việt Nam.

2.1.3 Dung môi – hóa chất

Acetonitril (ACN), ethanol, methanol đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng (Merk, Germany), acid perchloric đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích (Merck, Germany), nước khử khoáng.

2.1.4 Trang thiết bị

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-2030C - HPLC, cột sắc ký HiQ sil C18HS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), bể siêu âm Elmasonic, cân phân tích Mettler Toledo, dụng cụ thủy tinh loại A đã được hiệu chuẩn và đạt yêu cầu.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị mẫu

Dung dịch thử: cân 20 viên, tính khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn, trộn đều. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 1,25 mg indapamid và 4 mg perindopril tert-butylamin cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 50 mL dung môi, lắc kỹ, siêu âm 15 phút, để nguội. Bổ sung dung môi tới vạch, lắc đều. Dung dịch thu được có nồng độ indapamid 12,5 ppm và perindopril tert-butylamin 40 ppm.

Mẫu trắng: ethanol; *dung dịch chuẩn gốc:* perindopril tert-butylamin 400 ppm và indapamid 125 ppm; *dung dịch chuẩn:* perindopril tert-butylamin 40 ppm và indapamid 12,5 ppm; *dung dịch thử thêm chuẩn:* dung dịch thử được thêm (80, 100, và 120) % chuẩn để đạt nồng độ chuẩn lần lượt là (32, 40, và 44) ppm perindopril tert-butylamin và (10, 12,5, và 15) ppm indapamid; *dung dịch phân hủy:* mẫu nghiên cứu được đặt trong các điều kiện khắc nghiệt gồm: nhiệt độ (80 ± 2) °C, acid hydrocloic 2 N, oxy già 3 % và dung môi pha mẫu trong 24 giờ, ánh sáng mặt trời/12 giờ, base natri hydroxyd 0,2 N sau đó được trung hòa ngay bằng acid hydrocloic 0,2 N.

2.2.2 Xây dựng quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC

Dựa vào chuyên luận của perindopril tert-butylamin và indapamid trong các Dược điển [9-12] cũng như các công trình nghiên cứu đã công bố [13-16] để lựa chọn điều kiện sắc ký ban đầu như sau: cột sắc ký: HiQ sil C18HS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột: 40 °C, thể tích tiêm mẫu: 10 μL, tốc độ dòng: 1 mL/phút, đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện 215 nm, pha động: acetonitril-nước (60:40). Trong quá trình khảo sát, các yếu tố ảnh hưởng khả năng phân tích như: bước sóng phát hiện, pha động, nhiệt độ cột và tốc độ dòng đã được khảo sát. Sau khi lựa chọn được điều kiện sắc ký thích hợp sẽ tiếp tục tiến hành khảo sát điều kiện xử lý mẫu. Nghiên cứu này đã khảo sát dung môi chiết và thời gian chiết siêu âm để lựa chọn được dung môi và thời gian chiết siêu âm phù hợp.

2.2.3 Thẩm định quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC

Tiến hành thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH gồm các chỉ tiêu: tính phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng và độ chính xác.

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Xây dựng quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC



3.1.1 Lựa chọn bước sóng phát hiện

Theo kết quả nghiên cứu của công trình đã công bố quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC trên thế giới, bước sóng phát hiện là 215 nm. Trong nghiên cứu này, kết quả quét phổ UV của indapamid chuẩn cho thấy indapamid có độ hấp thụ cao trong

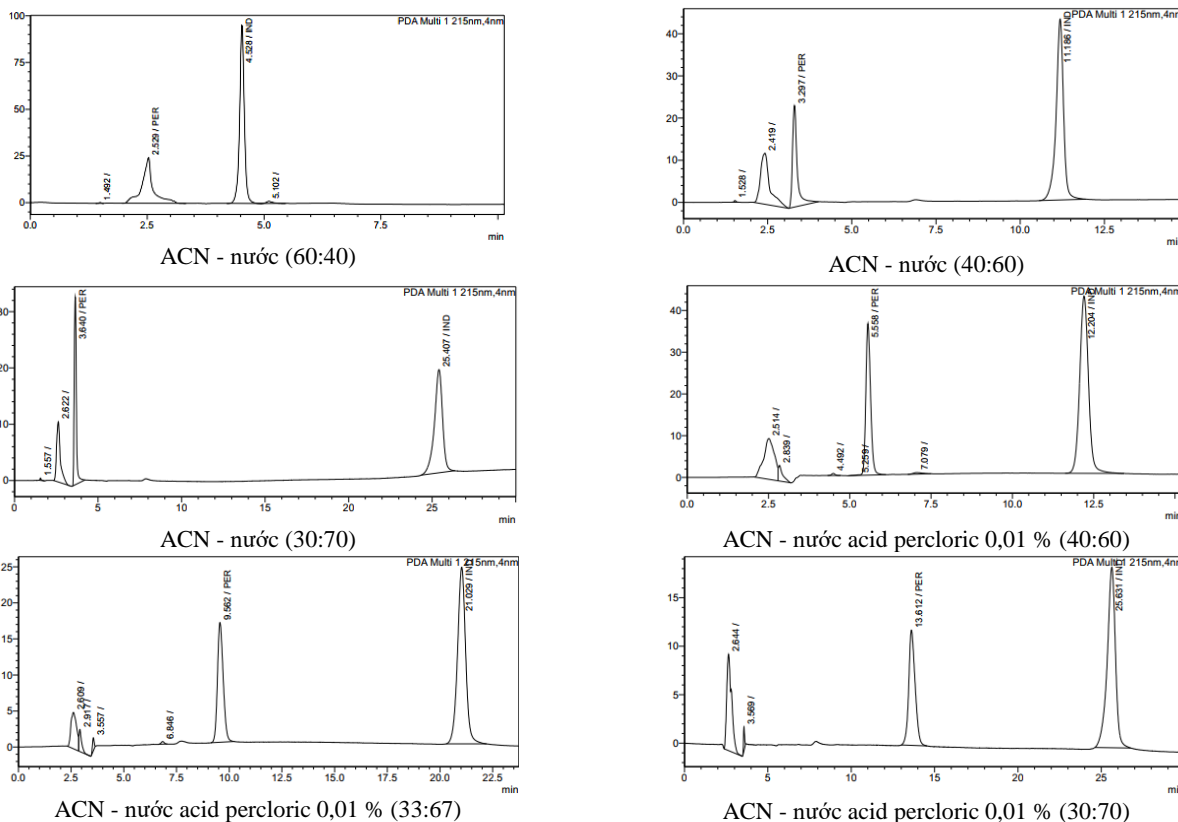
khoảng bước sóng (200-260) nm, perindopril tert-butylamin có độ hấp thụ cao trong khoảng bước sóng (200-230) nm. Vì vậy bước sóng 215 nm được lựa chọn để phát hiện đồng thời 2 hoạt chất này.

3.1.2. Khảo sát pha động

Kết quả khảo sát thành phần và tỷ lệ pha động được thể hiện qua sắc ký đồ (Hình 1) và thông số sắc ký trong (Bảng 1).

Bảng 1 Kết quả khảo sát pha động

Pha động		Độ tinh khiết	Độ phân giải	Hệ số kéo đuôi
Acetonitril-nước (60:40)	PER	Đạt	2,572	1,098
	IND	Đạt	1,263	0,971
Acetonitril-nước (40:60)	PER	Không đạt	2,757	1,737
	IND	Đạt	25,366	0,872
Acetonitril-nước (30:70)	PER	Không đạt	3,424	1,195
	IND	Đạt	40,039	0,856
Acetonitril-nước acid percloric 0,01 % (30:70)	PER	Đạt	24,094	1,154
	IND	Đạt	15,349	0,863
Acetonitril-nước acid percloric 0,01 % (40:60)	PER	Không đạt	0,378	1,207
	IND	Đạt	10,054	1,031
Acetonitril-nước acid percloric 0,01 % (33:67)	PER	Đạt	6,918	1,192
	IND	Đạt	19,165	0,996



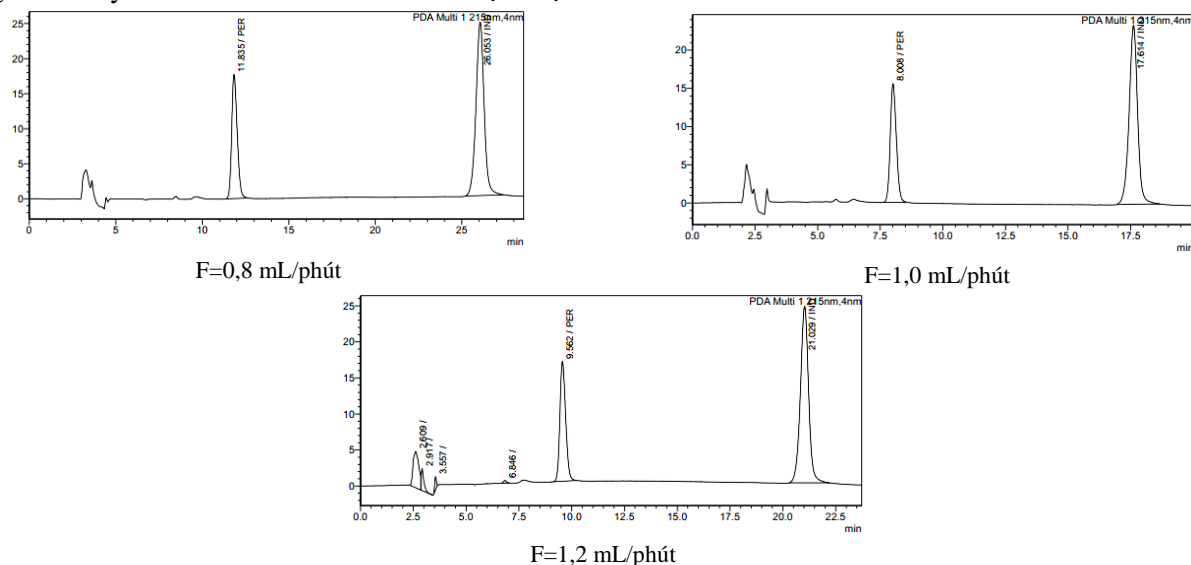
Hình 1 Sắc ký đồ dung dịch chuẩn với các pha động khác nhau

Nhận xét: ở tỷ lệ ACN-nước acid percloric 0,01 % (30:70, tt/tt), các peak hoạt chất tách nhau hoàn toàn và tách ra khỏi các peak khác trên sắc ký đồ. Peak của PER và IND được rửa giải lần lượt ở 13,612 phút và 25,631 phút, đạt độ tinh khiết và các thông số sắc ký khác. Ở tỷ lệ 33:67 (tt/tt), thời gian rửa giải của các peak hoạt chất giảm xuống so với ở tỷ lệ 30:70 (tt/tt) giúp rút ngắn thời gian sắc ký. Peak của PER và IND lần lượt được

rửa giải ở 9,562 phút và 21,029 phút, các peak vẫn tách nhau hoàn toàn, đồng thời đạt độ tinh khiết và các thông số sắc ký. Do đó, lựa chọn pha động ACN-nước acid percloric 0,01 % (33:67, tt/tt) cho các thử nghiệm tiếp theo.

3.1.3 Khảo sát tốc độ dòng

Kết quả khảo sát tốc độ dòng được thể hiện qua sắc ký đồ ở Hình 2.

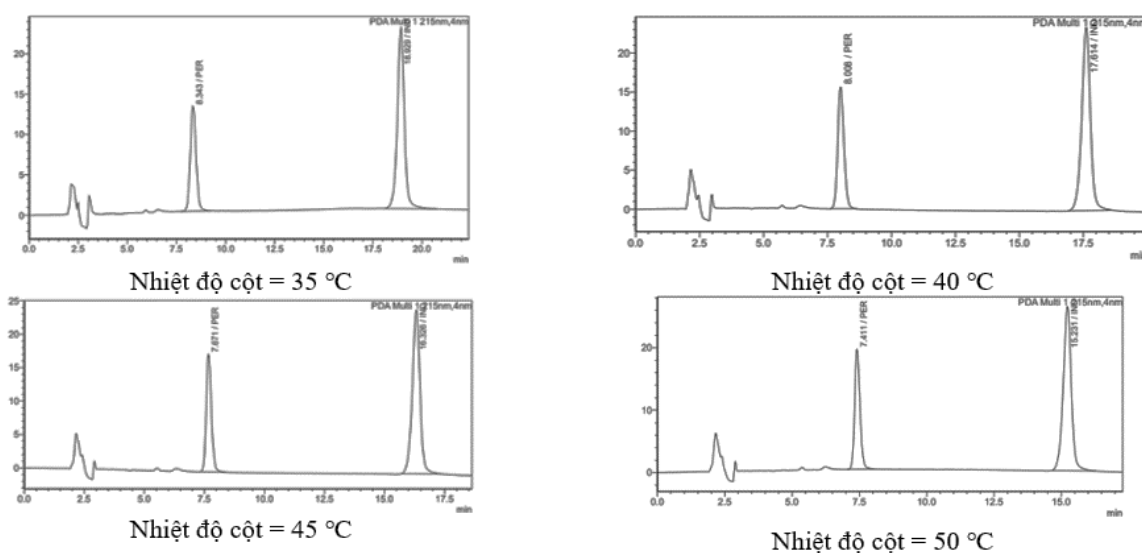


Hình 2 Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn ở các tốc độ dòng khác nhau

Nhận xét: tốc độ dòng tăng giúp rút ngắn thời gian sắc ký mà vẫn đảm bảo được khả năng phân tích của quy trình. Vì vậy, chọn tốc độ dòng là 1,2 mL/phút cho các thử nghiệm tiếp theo.

3.1.4 Khảo sát nhiệt độ cột

Kết quả khảo sát tốc độ dòng được thể hiện qua sắc ký đồ ở Hình 3.

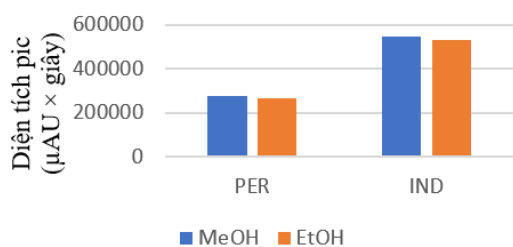


Hình 3 Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn ở các nhiệt độ cột khác nhau

Nhận xét: khi quan sát sắc ký đồ ở các nhiệt độ khác nhau, kết quả cho thấy nhiệt độ các cột cao thì các peak hoạt chất các được rửa giải ra sớm hơn. Tuy nhiên, nếu tiến hành sắc ký trong thời gian dài ở nhiệt độ cao, có thể làm gãy các liên kết của pha tĩnh do đó vẫn lựa chọn nhiệt độ cột là 35 °C để tiến hành phân tích.

Bảng 2 Kết quả khảo sát dung môi chiết

		Diện tích peak (μAU × giây)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số kéo đuôi	Độ phân giải
PER	Methanol	278 669	3 102	1,080	1,281
	Ethanol	265 706	2 964	1,078	2,790
IND	Methanol	546 378	11 045	0,937	15,966
	Ethanol	533 674	10 543	0,946	15,619



Hình 4 Ảnh hưởng của dung môi chiết tới diện tích peak của PER và IND trong dung dịch thử

Nhận xét: khi thay đổi dung môi chiết, diện tích peak của PER và IND thay đổi không đáng kể. Tuy nhiên, sắc ký đồ của mẫu thử được chiết bằng methanol cho thấy peak của PER chưa đạt độ phân giải trong khi mẫu thử được chiết bằng ethanol cho peak của PER và IND đều đạt yêu cầu về các thông số sắc ký. Vì vậy, chọn ethanol là dung môi chiết.

3.1.6 Khảo sát thời gian siêu âm

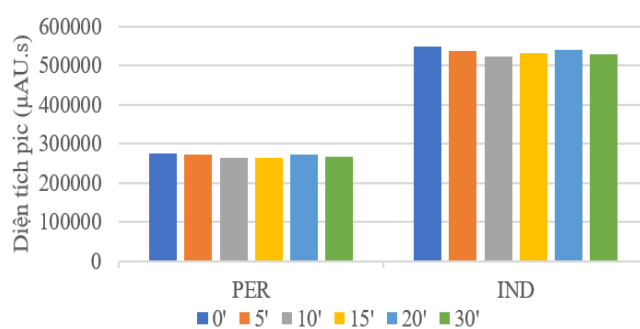
Tiến hành sắc ký 1 lần mỗi dung dịch thử được chiết bằng ethanol như trên với thời gian siêu âm lần lượt là (0, 5, 10, 15, 20 và 30) phút. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm được thiện qua Hình 5.

Bảng 3 Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống (n = 6)

		Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (μAU × giây)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số kéo đuôi	Độ phân giải
PER	Trung bình	8,594	273 036,8	3 181,167	1,01	2,94
	SD	0,01	2 016,08			
	RSD (%)	0,16	0,74			
IND	Trung bình	18,895	580 102,2	7 250,633	0,88	14,52
	SD	0,01	2 873,81			
	RSD (%)	0,06	0,50			

3.1.5 Khảo sát dung môi chiết

Tiến hành sắc ký 1 lần mỗi dung dịch thử được chiết bằng methanol và ethanol tương tự như Mục 2.2. Kết quả khảo sát dung môi chiết được trình bày trong Bảng 2 và Hình 4.



Hình 5 Ảnh hưởng của thời gian siêu âm tới diện tích peak của PER và IND trong dung dịch thử

Nhận xét: khi tăng thời gian siêu âm thì nồng độ PER và IND chiết xuất được thay đổi không đáng kể và các peak đều đạt yêu cầu về các thông số sắc ký. Do đó, không cần chiết siêu âm mẫu thử.

3.2 Thẩm định quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC

3.2.1 Khảo sát tính phù hợp hệ thống

Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống được trình bày trong Bảng 3.

Nhận xét: kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống cho thấy, giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích peak của IND và PER đều nhỏ hơn 2,0 %, số đĩa lý thuyết lớn hơn 2 000, hệ số kéo đuôi nằm trong khoảng (0,8-1,5) và độ phân giải đều lớn hơn 1,5. Như vậy, quy trình phân tích đạt tính phù hợp hệ thống.

3.2.2 Khảo sát độ đặc hiệu

Kết quả khảo sát độ đặc hiệu cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng không chứa peak có thời gian lưu tương ứng với peak của PER và IND trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp chuẩn xuất hiện 2 peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak PER và IND trong sắc ký đồ các dung dịch chuẩn riêng rẽ tương ứng. Trong sắc ký đồ của dung dịch thử thêm hỗn hợp chuẩn, chiều cao và diện tích của các peak PER và IND tăng lên so với dung dịch thử. Peak PER và IND tách hoàn toàn trên sắc ký đồ

trong tất cả các mẫu. Phổ UV tại thời gian lưu của các peak PER và IND trong dung dịch thử, dung dịch thử thêm hỗn hợp chuẩn giống với phổ UV tại thời gian lưu của các peak PER và IND trong dung dịch hỗn hợp chuẩn. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết cho thấy peak PER và IND đạt độ tinh khiết trong tất cả các mẫu. Trong sắc ký đồ của các mẫu phân hủy, peak của PER và IND xuất hiện trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các peak chính trong sắc ký đồ của dung dịch hỗn hợp chuẩn, 2 peak này tách nhau hoàn toàn và tách hoàn toàn khỏi các peak tạp khác và đạt độ tinh khiết trên sắc ký đồ. Như vậy quy trình đáp ứng các yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2.3 Khảo sát tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Kết quả khảo sát tính tuyến tính được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4 Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Perindopril tert-butylamin		Indapamid	
Nồng độ (ppm)	Diện tích peak ($\mu\text{AU} \times \text{giây}$)	Nồng độ (ppm)	Diện tích peak ($\mu\text{AU} \times \text{giây}$)
10	65 543	5	226 030
20	136 104	10	450 548
40	268 601	15	667 580
50	341 931	20	900 844
80	542 834	30	1 352 309
100	673 109	35	1 555 299

Từ kết quả khảo sát thu được tiến hành xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2016, kết quả xác định được phương trình thể hiện sự tương quan giữa nồng độ và diện tích peak của PER và IND lần lượt là $y = 6758,3x$ và $y = 44590x$. Dựa vào độ lệch chuẩn và độ dốc của phương trình hồi quy tuyến tính của IND và PER, kết quả LOD, LOQ được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5 Kết quả giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

	Hệ số a	Độ lệch chuẩn SD	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
PER	6 758,3	3 008,8	1,47	4,45
IND	44 590	7 974,6	0,59	1,79

Nhận xét: từ kết quả khảo sát cho thấy, quy trình phân tích đạt tính tuyến tính trong khoảng (10-100) ppm với PER và (5-35) ppm với IND. Xác định được giới hạn phát hiện của PER và IND là 1,47 ppm và 0,59 ppm, giới hạn định lượng lần lượt là 4,45 ppm và 1,79 ppm.

3.2.4 Độ chính xác và độ đúng: kết quả khảo sát độ đúng và độ chính xác được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6 Kết quả khảo sát độ đúng và độ chính xác

Độ đúng (n = 9)	Tỷ lệ phục hồi (%)	PER		IND	
	RSD (%)	(99,17-99,64)		(98,60-99,63)	
		0,34		0,62	
Độ chính xác		Hàm lượng so với nhân (%)	RSD (%)	Hàm lượng so với nhân (%)	RSD
	Độ lặp lại (n = 6)	100,29	0,39	99,25	0,44
	Độ chính xác trung gian (n = 12)	99,78	0,90	99,21	0,71

Nhận xét: từ kết quả khảo sát cho thấy, tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng từ (98,0-102,0) %. Hàm lượng của PER và IND ở mỗi ngày phân tích đều có RSD < 2,0 % và kết quả định lượng ở 2 ngày khác nhau khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Do đó, quy trình đạt độ đúng và độ chính xác.

Kết quả thẩm định cho thấy, quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH về tính phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

3.3 Ứng dụng quy trình để định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong một số mẫu viên nén trên thị trường

Tiến hành đánh giá hàm lượng perindopril tert-butylamin và indapamid trong một số chế phẩm viên nén trên thị trường bằng phương pháp HPLC theo quy trình đã xây dựng.

Bảng 7 Kết quả định lượng perindopril tert-butylamin và indapamid trong chế phẩm viên nén có trên thị trường bằng phương pháp HPLC-PDA

Mẫu	Perindopril tert-butylamin				Indapamid			
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (µAU × giây)	HLN (mg)	HL (%)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (µAU × giây)	HLN (mg)	HL (%)
Coperil Plus	8,408	276 415	4	100,87	18,818	559 072	1,25	99,53
Prenewel	8,400	267 928	4	101,83	18,797	527 320	1,25	95,84
Bi Preterax	8,405	270 065	4	100,77	18,816	527 576	1,25	96,04

3.4 Bàn luận

Thông qua phổ UV của PER và IND cho thấy, PER có độ hấp thu cao trong khoảng bước sóng (200-230) nm còn IND có độ hấp thu cao trong khoảng bước sóng (200-260) nm. Do đó, lựa chọn bước sóng 215 nm để phát hiện đồng thời PER và IND là phù hợp với kết quả của các công trình nghiên cứu đã công bố trước đó [13-16]. Trong kỹ thuật sắc ký pha đảo (Rp-HPLC), khả năng phân tích các chất phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loại pha tĩnh, bản chất và tỷ lệ các thành phần trong pha động, chất phân tích, ... Tùy vào bản chất của chất phân tích để lựa chọn hệ pha động phù hợp dựa trên các tài liệu tham khảo hoặc từ kết quả thực nghiệm. Dựa trên các công trình đã công bố [13, 15-18] cũng như các chuyên luận riêng của từng hoạt chất trong Dược điển [9-12] về quy trình định lượng đối tượng cần phân tích là IND và PER cho thấy, pha động để phân tích IND và PER gồm ACN và nước hoặc nước acid, có thể có hoặc không có methanol. Vì vậy, ban đầu nghiên cứu này đã lựa chọn pha động gồm ACN và nước để khảo sát. Các

Hàm lượng perindopril tert-butylamin và indapamid có trong một đơn vị chế phẩm so với hàm lượng ghi trên nhãn được tính theo công thức:

$$H (\%) = \frac{S_t}{S_c} \times \frac{m_c}{m_t} \times C \times \frac{D_t}{D_c} \times \frac{m_{tb}}{HLN} \times 100$$

Trong đó:

S_t: diện tích peak của hoạt chất trong dung dịch thử

S_c: diện tích peak của hoạt chất trong dung dịch chuẩn

m_c: Khối lượng cân của chất chuẩn (mg)

m_t: khối lượng cân của mẫu thử (mg)

C: hàm lượng % chuẩn đối chiếu tính trên chế phẩm làm khan

D_t: độ pha loãng của dung dịch thử

D_c: độ pha loãng của dung dịch chuẩn

m_{tb}: khối lượng trung bình viên (mg)

HLN: hàm lượng hoạt chất ghi trên nhãn (mg)

Kết quả được trình bày trong Bảng 7.

peak thu được có sự bất thường về hình dạng peak và vẫn chưa đạt yêu cầu về độ tinh khiết và hệ số kéo đuôi. Thay thế nước bằng nước acid percloric 0,01 % và thay đổi tỷ lệ dung môi để khảo sát. Việc acid hóa pha động sẽ hạn chế các gốc silanol tự do trong pha tĩnh bị ion hóa gây tương tác xấu với chất phân tích từ đó cải thiện được hình dạng peak. Bên cạnh đó, khi tăng tỷ lệ acid trong pha động thì thời gian lưu của các peak hoạt chất tăng do tỷ lệ dung môi phân cực tăng làm tăng tương tác giữa chất phân tích với pha tĩnh dẫn tới các chất được rửa giải trễ hơn, tăng thời gian lưu của các chất. Tuy nhiên, các peak tách nhau tốt và đạt yêu cầu về các thông số sắc ký. Tiếp tục thay đổi các điều kiện về tốc độ dòng và nhiệt độ cột để cải thiện thời gian sắc ký. Việc tăng tốc độ dòng từ 1,0 mL/phút lên 1,2 mL/phút giúp cải thiện thời gian lưu của từng chất phân tích mà vẫn đạt yêu cầu về số đĩa lý thuyết, độ tinh khiết, hệ số kéo đuôi và độ phân giải đối với từng peak. Khi khảo sát nhiệt độ cột, kết quả cho thấy nhiệt độ cột tăng thì thời gian lưu của các peak hoạt chất và áp suất hệ thống



giảm xuống do nhiệt độ cột tăng lên sẽ làm giảm độ nhớt của pha động, giảm áp suất hệ thống và các chất được rửa giải ra sớm hơn. Tuy nhiên, việc vận hành ở nhiệt độ cao trong thời gian dài sẽ làm gãy các liên kết trong pha tĩnh, đồng thời nhiệt độ càng cao thì càng ít loại cột sắc ký phù hợp. Do đó, lựa chọn 35 °C là nhiệt độ phân tích để không ảnh hưởng tới các liên kết của pha tĩnh và phù hợp với nhiều loại cột sắc ký khác nhau mà vẫn đảm bảo được các thông số sắc ký đối với từng peak hoạt chất.

Bên cạnh đó, việc lựa chọn ethanol làm dung môi chiết mẫu thử vì không ảnh hưởng tới diện tích peak của các hoạt chất mà các peak lại có độ phân giải tốt hơn so với việc sử dụng methanol làm dung môi chiết. Đồng thời, ethanol ít độc hại hơn so với methanol nên sẽ an toàn cho người sử dụng hơn. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm cho thấy, thời gian siêu âm không ảnh hưởng tới tín hiệu của các peak thu được, do đó lựa chọn không siêu âm để đơn giản hóa quy trình xử lý mẫu.

Từ các kết quả khảo sát, đã lựa chọn được quy trình phân tích phù hợp để định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng

phương pháp Rp-HPLC với đầu dò PDA. Quy trình đã được thẩm định đạt tính phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng và độ chính xác theo hướng dẫn của ICH.

4 Kết luận

Quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp HPLC đã được xây dựng thành công với điều kiện sắc ký như sau: cột sắc ký HiQ sil C18HS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột 35 °C, đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 215 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μL, tốc độ dòng 1,2 mL/phút, pha động gồm acetonitril-nước acid perchloric 0,01 % (33:67). Các dung dịch mẫu được hòa tan và pha loãng bằng ethanol, không cần siêu âm. Quy định đã được thẩm định đạt tính phù hợp hệ thống; độ đặc hiệu; khoảng tuyến tính (5-35) ppm với indapamid và (10-100) ppm với perindopril tert-butylamin; độ đúng và độ chính xác theo hướng dẫn của ICH. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của indapamid là 0,59 ppm và 1,79 ppm; perindopril tert-butylamin là 1,47 ppm và 4,45 ppm.

Tài liệu tham khảo

1. Zhou, B., Perel, P., Mensah, G. A., et al. (2021). Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nature Reviews Cardiology*, 18(11), 785-802. DOI:10.1038/s41569-021-00559-8
2. Bộ Y tế. (2024). Việt Nam có khoảng 12 triệu người mắc căn bệnh được coi là 'kẻ giết người thầm lặng'. https://moh.gov.vn/hoat-dong-cua-dia-phuong/-/asset_publisher/gHbla8vOQDuS/content/viet-nam-co-khoang-12-trieu-nguoi-mac-can-benh-la-ke-giet-nguoi-tham-lang-. Access date.
3. Hội Tim mạch Việt Nam. (2022). Khuyến cáo chẩn đoán và điều trị tăng huyết áp VNHA/VSH 2022. <https://hntmmtn.vn/upload/attach/202291214352.pdf>. Access date.
4. World Health Organization. (2021). Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults: World Health Organization.
5. Umemura, S., Arima, H., Arima, S., et al. (2019). The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2019). *Hypertens Res*, 42(9), 1235-1481. DOI:10.1038/s41440-019-0284-9
6. Unger, T., Borghi, C., Charchar, F., et al. (2020). 2020 International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines. *Journal of Hypertension*, 38(6), 982-1004. DOI:10.1097/hjh.0000000000002453
7. Lévy, B. I., & Taddei, S. (2018). Vascular legacy beyond blood pressure control: benefits of perindopril/indapamide combination in hypertensive patients with diabetes. *Current Medical Research and Opinion*, 34(9), 1557-1570. DOI:10.1080/03007995.2018.1425674
8. Chalmers, J., Mourad, J. J., Brzozowska-Villatte, R., et al. (2023). Benefit of treatment based on indapamide mostly combined with perindopril on mortality and cardiovascular outcomes: a pooled analysis of four trials. *Journal of Hypertension*, 41(3), 508-515. DOI:10.1097/hjh.0000000000003368
9. British Pharmacopoeia. (2023). In Monograph: Indapamide Tablets. *Perindopril ter-butylamine Tablets*.
10. European Pharmacopoeia. (2023). In Monograph: Indapamide Tablets. *Perindopril ter-butylamine Tablets*.
11. Xie, M., Tang, T., & Liang, H. (2023). Efficacy of single-pill combination in uncontrolled essential hypertension: A systematic review and network meta-analysis. *Clinical Cardiology*, 46(8), 886-898. DOI:10.1002/clc.24082
12. Bộ Y tế. (2018). *Chuyên luận viên nén Indapamid, viên nén Perindopril tert-butylamin*. In Dược điển Việt Nam V: Nhà xuất bản Y học.
13. Carje, A. G., Hancu, G., Muntean, D.-L., et al. (2017). Simultaneous chiral separation of perindopril erbumine and indapamide enantiomers by high performance liquid chromatography. *Farmacia*, 65(6), 900-907.
14. Patel, K. P., Chhalotiya, U. K., Kachhiya, H. M., et al. (2020). A new RP-HPLC method for simultaneous quantification of perindopril erbumine, indapamide, and amlodipine besylate in bulk and pharmaceutical dosage form. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 80. DOI:10.1186/s43094-020-00092-4
15. Saleh, S. S., Lotfy, H. M., Tiris, G., et al. (2020). Analytical tools for greenness assessment of chromatographic approaches: Application to pharmaceutical combinations of Indapamide, Perindopril and Amlodipine. *Microchemical Journal*, 159, 105557. DOI:10.1016/j.microc.2020.105557
16. Swamy, G. K., Kumar, J. R., & Rao, J. S. J. W. J. P. R. (2015). Development and validation of a novel stability indicating rphplc method for simultaneous estimation of perindopril. *Indapamide and Amlodipine in Bulk and Combined tablet Dosage forms*. 4(6), 2440-2456. DOI:
17. Dawud, E. R., & Shakya, A. K. (2019). HPLC-PDA analysis of ACE-inhibitors, hydrochlorothiazide and indapamide utilizing design of experiments. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(5), 718-728. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.10.052>
18. Mandić-Kovačević, N., Kasagić-Vujanović, I., & Popović Bijelić, A. (2023). Analysis of Fixed-Dose Combination of Three Antihypertensive Drugs by a Green and Quality by Design Approach. *Journal of Chromatographic Science*, 61(3), 256-268. DOI: 10.1093/chromsci/bmac044

Developing and validating of rp-hplc method for simultaneous quantification of indapamide and perindopril tert-butylamine in tablets

Linh Dinh Thi Lan*, Nghia Nguyen Thanh
Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
Email: dtlinh@ntt.edu.vn

Abstract Hypertension is the world's leading cause of death. The number of people with hypertension, particularly at a young age, is constantly increasing. The proportion of patients with uncontrolled hypertension also grows due to ineffective monotherapy. Therefore, the use of fixed-dose combination drugs such as Indapamide (IND – Thiazid-like) and Perindopril tert-butylamine (PER – ACE inhibitor) has become common. However, the Pharmacopoeia from Viet Nam and from other countries do not include specific guidelines on the process of simultaneous quantification of these 2 substances. Thus, this study was conducted to develop and validate the simultaneous quantification process of Indapamide and Perindopril tert-butylamine in tablets by high-performance liquid chromatography (HPLC). A method has been developed for the simultaneous quantification of Indapamide and Perindopril tert-butylamine with mobile phase consisting of acetonitril/0.01 % perchloric acid water (33:67), HiQ sil C18HS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), column temperature 35 °C, flow rate 1.2 mL/min, injection 10 μl, detector PDA, and wavelength 215 nm. Sample processing conditions: ethanol extraction, no ultrasonication. The method has been validated according to the ICH guidelines, including: system suitability; specificity; linearity from (5-35) ppm and (10-100) ppm, respectively for Indapamide and Perindopril tert-butylamine ($R > 0.9999$); the detection limit and the quantitative limit for Indapamide and Perindopril tert-butylamine were 0.59 ppm and 1.79 ppm, and 1.47 ppm and 4.45 ppm respectively; accuracy (recovery rate of (98.0-102.0) %); precision (RSD < 2.0 %).

Keywords Hypertension, Indapamide, Perindopril tert-butylamine, HPLC, Validating.