

Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời vildagliptin và metformin trong viên nén bao phim bằng HPLC

Trần Thị Huyền Trang, Nguyễn Ngọc Chiến, Nguyễn Thị Thuận*

Trường Đại học Dược Hà Nội

*Tác giả liên hệ: thuannt@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 26/7/2022 – Ngày duyệt đăng: 22/9/2022)

SUMMARY

An HPLC procedure was developed for the simultaneous determination of metformin.HCl and vildagliptin in their film-coated tablets as: column Hypersil ODS (150 x 4.6 mm, 5 μ m), detector 218 nm, injection volum 20 μ l, flow rate 1,0 ml/min, mobile phase: sodium 1-heptansulfonat solution (pH 3,85) – ACN with a gradient program. The validation results for system suitability, specificity, linearity range, precision, and accuracy showed that this method was conformed to the ASEAN requirements.

Từ khóa: định lượng đồng thời, vildagliptin, metformin, HPLC.

Đặt vấn đề

Vildagliptin là một thuốc hạ đường huyết có tác dụng ức chế enzym dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4). Thuốc được chấp nhận đưa vào sử dụng ở châu Âu từ năm 2007 với tên biệt dược là Galvus (Norvatis). Ngoài dạng đơn chất, thuốc còn được phối hợp với metformin trong viên hỗn hợp Galvus-Met (Norvatis) với hàm lượng metformin/vildagliptin tương ứng là 500/50, 850/50 và 1000/50 mg/viên. 2 hoạt chất này có tính tan khác nhau, nồng độ trong viên khác nhau rất xa. Chính vì vậy, nhà sản xuất đã dùng 2 quy trình định lượng riêng biệt để xác định hàm lượng 2 thành phần này.

Do có hiệu quả phối hợp tốt, dạng chế phẩm phối hợp metformin và vildagliptin xuất hiện ngày càng nhiều trên thị trường Việt Nam. Một số tác giả đã tìm cách xác định đồng thời 2 thành phần này trong dịch sinh học. Các phương pháp đã được sử dụng bao

gồm quang phổ tử ngoại [1] và HILIC-MS/MS [5]. Ở Việt Nam, tác giả Phan Thanh Dũng và cộng sự đã xây dựng quy trình định lượng đồng thời 2 thành phần này trong chế phẩm bằng HPLC [4]. Tuy nhiên kết quả khảo sát cho thấy phương pháp này chưa phù hợp trên đối tượng mẫu thực nghiệm tại cơ sở. Do vậy, để phục vụ cho quá trình nghiên cứu bào chế, chúng tôi đã xây dựng một phương pháp HPLC khác nhằm định lượng đồng thời vildagliptin và metformin trong viên bao đa thành phần phù hợp với điều kiện thực tế. Dưới đây là các kết quả nghiên cứu thu được.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, thuốc thử: các hóa chất loại HPLC do các hãng hóa chất Prolabo, Merck cung cấp; Chuẩn làm việc metformin.HCl, số lô: 20180808A, hàm lượng 99,7 %, do Fengcheng group Co.,Ltd sản xuất; Chuẩn làm việc vildagliptin số lô: 20181101Q, hàm lượng: 99,6 % do Jiangxi Synergy Pharmaceutical



Co.,Ltd sản xuất; Viên Galvus-Met (lot WUM66) có chứa 50 mg vildagliptin và 850 mg metformin.HCl do Novartis sản xuất.

Thiết bị: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu L20155518195 có hệ thống tiêm mẫu tự động, cân phân tích 4 số Mettler Toledo XPE 105 (Thụy Sĩ).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu chuẩn: chuẩn bị các dung dịch chuẩn trong acetonitril (ACN) - nước (1:40) có nồng độ metformin.HCl (MET) khoảng từ 40 đến 100 µg/ml và vildagliptin (VIL) từ 2,5 đến 6,0 µg/ml.

Chuẩn bị mẫu thử: Bóc bỏ lớp bao phim của 20 viên, cân, tính khối lượng trung bình viên (KLTB) rồi nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương đương với khoảng KLTB cho vào bình định mức 100,0 ml, thêm khoảng 70 ml nước cất 2 lần, siêu âm 15 phút, thêm nước vừa đủ. Lọc qua giấy lọc, bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Pha loãng dịch lọc 100 lần bằng ACN - nước (1:40). Lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm và tiến hành tiêm sắc ký.

Xây dựng phương pháp

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với cột Hypersil ODS (150 x 4,6 mm, 5 µm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 20 µl đã được lựa chọn để khảo sát xây dựng phương pháp phân tích đồng thời metformin và vildagliptin. Các yếu tố cần xác định gồm bước sóng phát hiện và pha động, trong đó khảo sát các hệ đẳng dòng là **a)** dung dịch đệm phosphat pH 3,5 - ACN

(85:15), **b)** dung dịch đệm phosphat pH 6,0 - ACN (80:20), **c)** dung dịch đệm natri 1-heptansulfonat pH 3,85 - ACN (90:10), và gradient với hệ dung dịch đệm natri 1-heptansulfonat pH 3,85 - ACN.

Thẩm định phương pháp

Theo hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng của ASEAN[2], phương pháp xây dựng đã được thẩm định các tiêu chí: tính tương thích của hệ thống, độ chọn lọc - đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, độ chính xác và độ ổn định của các dung dịch.

Xử lý số liệu

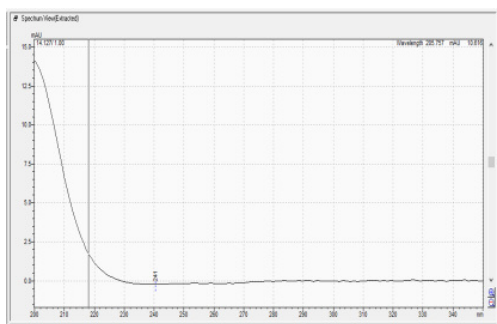
Các số liệu thu được được xử lý thống kê trên phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả nghiên cứu

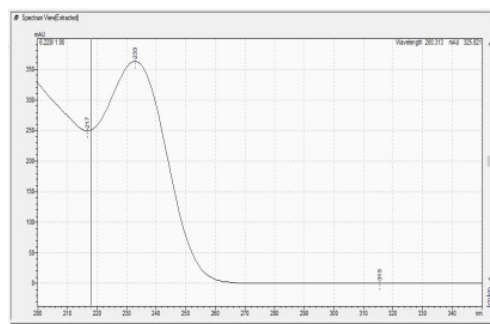
Xây dựng phương pháp

Xác định bước sóng phát hiện: Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch từng chất đã được xác định. Phổ hấp thụ của vildagliptin (hình 1-a) thể hiện khả năng hấp thụ tử ngoại kém, độ hấp thụ giảm dần từ 200 đến 240 nm trong khi đó metformin cho phổ hấp thụ (hình 1-b) với cường độ mạnh tại cực đại 239 và cực tiểu 218 nm. Trong nghiên cứu này, thành phần metformin có nồng độ vượt trội so với vildagliptin (850 mg vs 50 mg/viên). Vì vậy, ưu tiên cho vildagliptin, chúng tôi lựa chọn bước sóng cực tiểu của metformin là 218 ± 1 nm để tiến hành phép định lượng.

Xác định hệ pha động: Chuẩn hỗn hợp 2 thành phần và dung dịch pha mẫu lần lượt được phân tích với các pha động nghiên cứu.

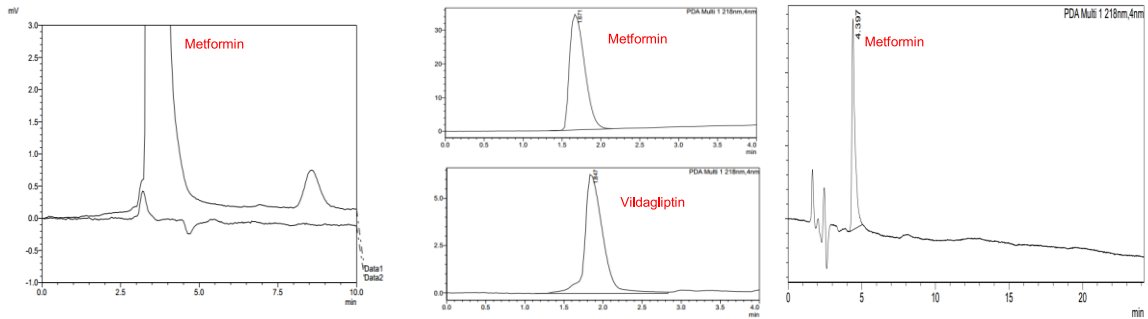


1-a: Vildagliptin



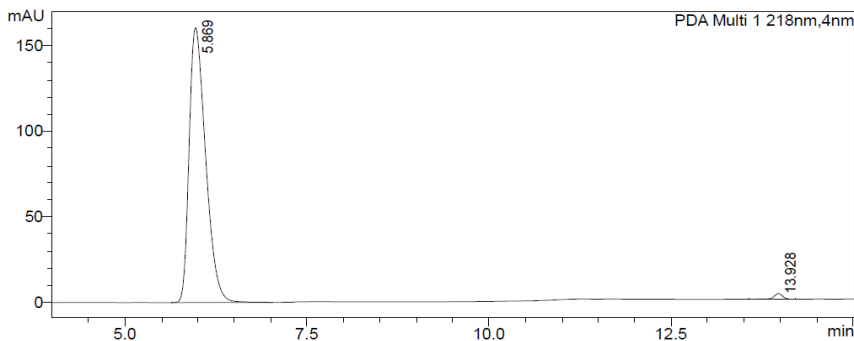
1-b: Metformin

Hình 1: Phổ hấp thụ tử ngoại của các chất



a) Dd đệm phosphat pH 3,5-ACN (85:15) b) Dd đệm phosphat pH 6,0 – ACN (80:20) c) Natri heptansulfonat 0,2 g-NaCl 0,5g/l) – ACN (90:10)

Hình 2: Sắc ký đồ của chuẩn hỗn hợp metformin và vildagliptin với các pha động đẳng dòng



<Peak Table> PDA Ch1 218nm

Peak#	Ret. Time	Area	Conc.	Tailing Factor	Resolution(USP)	NTP(USP)
1	5.869	2526681	98.953	1.460	--	3174
2	13.928	26725	1.047	0.924	24.887	64681
Total		2553407	100.000			

Hình 3: Sắc ký đồ của dung dịch metformin và vildagliptin với pha động 3 theo chương trình gradient.

Kết quả (hình 2) cho thấy cả 3 pha động khi chạy đẳng dòng đều không đạt yêu cầu phân tích. Pha động **a)** pic metformin trùng với pic dung môi. Pha động **b)** cho pic 2 chất gần trùng nhau hoàn toàn (1,6 và 1,8 phút). Pha động **c)** sau 25 phút phân tích vẫn chưa thấy pic vildagliptin (hình 2c). Trên cơ sở pha động **c)**, chúng tôi tiến hành gradient dung môi để thu được 1 sắc ký đồ có 2 pic tách nhau hoàn toàn (độ phân giải >24) (hình 3).

Chương trình dung môi phù hợp được đưa ra trong bảng 1.

Thẩm định quy trình

Tính tương thích của hệ thống: tiến hành

Bảng 1: Chương trình dung môi phù hợp để phân tích đồng thời metformin và vildagliptin

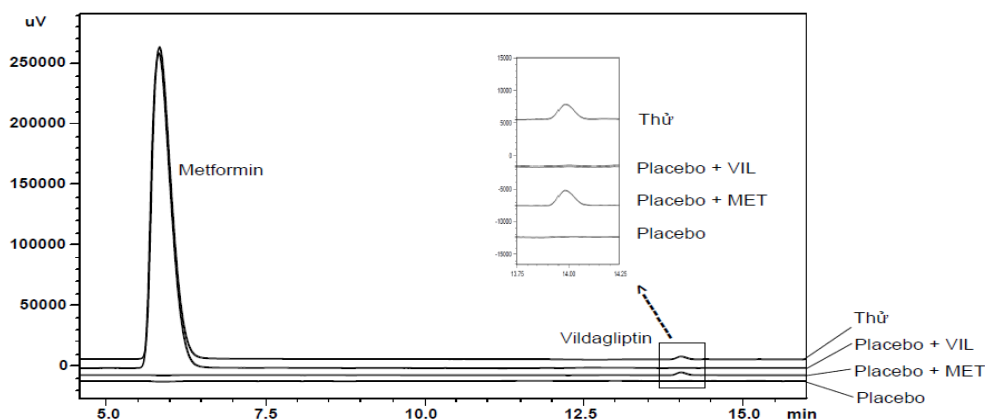
Thời gian	Tỷ lệ đệm (%)	Tỷ lệ ACN (%)	Thời gian	Tỷ lệ đệm (%)	Tỷ lệ ACN (%)
0	90	10	14	75	25
3	90	10	15	90	10
13	75	25	25	90	10

sắc ký 6 lần cùng một dung dịch chuẩn hỗn hợp có chứa khoảng 85 µg/ml metformin và 5,0 µg/ml vildagliptin. Kết quả đưa ra trong bảng 2 cho thấy RSD của cả thời gian lưu,



Bảng 2: Kết quả xác định độ phù hợp hệ thống

STT	MET				VIL				
	T (phút)	S (mAu,s)	T	N	T (phút)	S (mAu,s)	R	T	N
1	5,860	5011514	1,626	2901	13,938	21667	5.433	1,076	66899
2	5,863	5012921	1,619	2881	13,927	21535	5.666	1,049	66676
3	5,866	5007265	1,620	2837	13,930	20779	5.868	1,039	67523
4	5,857	5005340	1,617	2870	13,921	21131	5.215	1,027	67024
5	5,865	5003015	1,619	2900	13,927	20882	5.541	1,021	67577
6	5,860	5001596	1,614	2856	13,926	20832	5.332	1,038	67611
TB	5,862	5006942	1,619	2874,2	13,928	21137,7		1,042	67218
RSD (%)	0,06	0,09	0,25	0,88	0,04	1,80		1,87	0,60



Hình 4: Sắc ký đồ các mẫu placebo, placebo thêm chuẩn và thử

diện tích pic, hệ số đôi xứng (T), và số đĩa lý thuyết (N) của từng chất đều không vượt quá 2 %, phù hợp với yêu cầu của ASEAN. Độ phân giải của pic vildagliptin với pic tạp gần nhất (thời gian lưu khoảng 11,2 phút) luôn lớn hơn 5.

Độ chọn lọc - đặc hiệu

Tiến hành phân tích các mẫu: placebo, placebo thêm chuẩn từng chất, placebo thêm chuẩn hỗn hợp, và mẫu thử theo phương pháp đã xây dựng.

Sắc ký đồ thu được (hình 4) cho thấy placebo không cho pic tại vị trí tương ứng với pic của các chất chuẩn. Dung dịch thử cho các pic có thời gian lưu và phổ hấp thụ tử ngoại giống với thời gian lưu và phổ tử ngoại tương ứng với các chất metformin và vildagliptin trên các sắc ký đồ placebo thêm chuẩn. Điều

đó chứng tỏ phương pháp tiến hành có tính đặc hiệu cao.

Mặc dù thời gian lưu của 2 pic cách nhau rất xa nhưng khi thay đổi tỉ lệ dung môi, một số tá dược cũng cho pic ở vùng giữa 2 pic. Vì vậy chúng tôi không điều chỉnh để vildagliptin ra sớm hơn.

Khoảng nồng độ tuyến tính: Tiến hành sắc ký dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ metformin từ 42,3 đến 101,6 µg/ml và vildagliptin từ 2,58 đến 6,18 µg/ml theo quy trình đã lựa chọn. Kết quả (bảng 3, hình 5) cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát, cả metformin và vildagliptin đều cho các đáp ứng tỉ lệ thuận với nồng độ mỗi chất, với hệ số tương quan cao ($r > 0,99$), độ chệch (CV) thấp (không quá 3%), phù hợp với yêu cầu chung của một phương pháp phân tích định lượng.

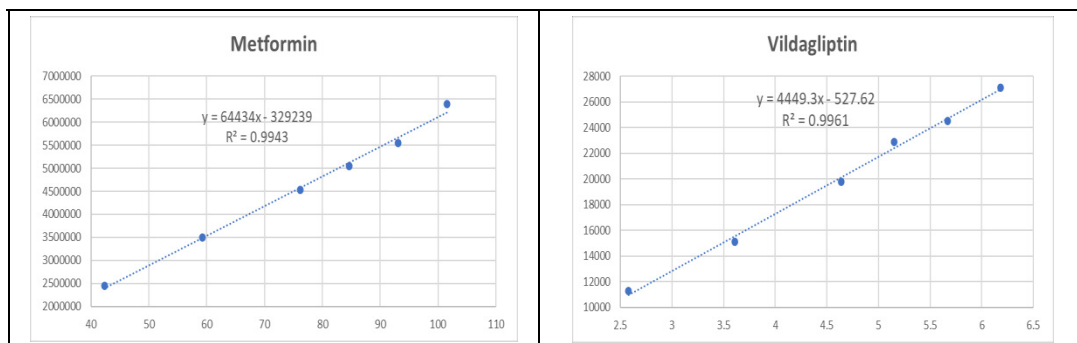


Bảng 3: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

STT	MET			VIL		
	Nồng độ (µg/ml)	S (mAu.s)	CV (%)	Nồng độ (µg/ml)	S (mAu.s)	CV (%)
1	42,3	2450967	-2,00	2,58	11288	-2,93
2	59,2	3493795	-0,22	3,61	15103	2,69
3	76,2	4530466	1,02	4,64	19791	1,58
4	84,6	5041997	1,47	5,15	22868	-2,10
5	93,1	5555441	1,90	5,67	24510	0,75
6	101,6	6398264	-2,76	6,18	27098	-0,47
	$y = 64434x - 329239$			$y = 4449,29x - 527,62$		
	$r^2 = 0,9943$			$r^2 = 0,9961$		

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác

	Phép thử	Metformin				Vildagliptin			
		Lượng chuẩn thêm vào (g)	Lượng chuẩn tìm thấy (g)	Tỷ lệ thu hồi (%)	RSD (%)	Lượng chuẩn thêm vào (g)	Lượng chuẩn tìm thấy (g)	Tỷ lệ thu hồi (%)	RSD (%)
LQC	1	0,5078	0,5021	98,9	1,16	0,0309	0,0310	100,4	1,79
	2		0,4988	98,2			0,0313	101,3	
	3		0,4989	98,2			0,0321	104,0	
	4		0,4951	97,5			0,0310	100,4	
	5		0,5040	99,2			0,0306	99,2	
	6		0,4877	96,0			0,0319	103,1	
MQC	1	0,8464	0,8383	99,0	0,84	0,0515	0,0509	98,8	1,02
	2		0,8394	99,2			0,0510	99,1	
	3		0,8454	99,9			0,0502	97,5	
	4		0,8308	98,2			0,0517	100,3	
	5		0,8307	98,2			0,0513	99,6	
	6		0,8266	97,7			0,0505	98,1	
HQC	1	0,9310	0,9143	98,2	0,92	0,0567	0,0558	98,5	1,32
	2		0,9215	99,0			0,0573	101,1	
	3		0,9330	100,2			0,0556	98,0	
	4		0,9314	100,0			0,0570	100,5	
	5		0,9216	99,0			0,0570	100,5	
	6		0,9122	98,9			0,0572	100,9	



Hình 5: Đồ thị biểu diễn tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất

Độ đúng, độ chính xác: Tiến hành phân tích các mẫu LQC, MQC và HQC là các placebo thêm chuẩn tương ứng với khoảng 60, 100 và 110 % so với nồng độ dung dịch thử theo quy trình vừa xây dựng, mỗi nồng độ 6 mẫu độc

lập. Tính toán hàm lượng, so sánh với hàm lượng thực của mẫu. Kết quả được đưa ra trong bảng 4 cho thấy phương pháp có độ đúng và độ chính xác cao với tỉ lệ tìm lại đều từ 98 đến 102 %, RSD < 2 %.

Bảng 5: Kết quả xác định độ chính xác trung gian

	STT	Hàm lượng % so với nhãn của MET			Hàm lượng % so với nhãn của VIL		
		Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
	1	99,4	99,1	100,4	101,4	100,2	102,0
	2	100,5	98,5	98,1	104,1	101,8	100,2
	3	100,0	100,0	99,8	102,5	101,7	102,2
	4	100,9	98,2	101,1	101,2	102,1	100,0
	5	100,5	99,1	100,5	101,7	98,4	102,3
	6	100,8	97,5	100,0	101,2	103,6	100,3
Mỗi ngày (%)	TB	100,4	98,7	100,0	102,0	101,3	101,2
	RSD	0,56	0,88	1,03	1,11	1,76	1,09
3 ngày (%)	TB	99,7			101,5		
	RSD	1,07			1,33		

Bảng 6: Kết quả định lượng mẫu thử

Mẫu	Lượng cân (g)	MET			VIL		
		S (mAu.s)	Hàm lượng		S (mAu.s)	Hàm lượng	
			(mg)	(%)		(mg)	(%)
Chuẩn MET	0,8670	5455341			21976		
Chuẩn VIL	0,0507						
Thử 1	0,9924	5177239	836,43	98,4	22481	49,75	99,5
Thử 2	0,9788	5114436	837,77	98,6	22159	49,72	99,4
Thử 3	0,9968	5227964	840,90	98,9	23067	50,82	101,7
TB (%)			98,6			100,2	



Độ chính xác trung gian: so sánh kết quả định lượng cùng 1 mẫu thử trong 3 ngày khác nhau bởi những người khác nhau. Kết quả (bảng 5) cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian với RSD mỗi ngày và cả 3 ngày đều không quá 2 %.

Như vậy, phương pháp vừa xây dựng đã đáp ứng được các yêu cầu của ASEAN về quy trình phân tích.

Ứng dụng

Phương pháp đã được sử dụng để định lượng các thành phần có trong chế phẩm Galvus-Met 50mg/850mg (lot WUM66). Kết quả thu được (bảng 6) hàm lượng của metformin và vildagliptin lần lượt là 98,6 ($\pm 0,27$) % và 100,2 ($\pm 1,2$) % so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Bàn luận

Metformin là một hoạt chất thường được sử dụng trong điều trị bệnh tiểu đường và rất hay được dùng dạng phối hợp với các thuốc trị tiểu đường nhóm khác như các sulfonyleurea (glibenclamid, gliclazid, glimepirid,...), các gliflozin (dapagliflozin, canagliflozin,...), các thuốc ức chế DPP-4 (saxagliptin, alogliptin, vildagliptin,...). Trong hầu hết các trường hợp, do tính tan quá khác nhau (metformin.HCl thân nước, tan tốt trong nước, còn vildagliptin thân dầu, tuy rằng cũng tan trong nước) và chênh lệch nồng độ giữa 2 chất quá lớn, các thành phần này thường được định lượng bằng các quy trình định lượng khác nhau, trong đó quy trình định lượng metformin thường có chất tạo cặp ion như natri hexasulfonat, natri heptasulfonat,... [3]. Do vậy chúng tôi cùng dùng một trong các chất tạo cặp ion này để phân tích metformin. Tuy nhiên, qua khảo sát, ở điều kiện trên vildagliptin lại lưu lại quá lâu trong cột. Vì vậy, chương trình dung môi là hết sức cần thiết để có thời gian phân tích ngắn hơn.

Vì có pha động và chương trình chạy đơn giản hơn nên phương pháp của tác giả Phan Thanh Dũng và cộng sự [4] (pha động **a**) cũng đã được khảo sát. Tuy nhiên kết quả thu được không khả quan: có thể do sự khác nhau của cột, hệ thống phân tích và tá dược trong viên,

ở điều kiện này, chúng tôi thu được pic metformin.HCl ra quá nhanh (do hoạt chất này thân nước nên ít bị lưu giữ trong cột) và lẫn với các pic tạp, làm ảnh hưởng tới quá trình phân tích. Chính vì vậy chất tạo cặp ion (natri heptasulfonat) đã được sử dụng để làm tăng thời gian lưu của metformin và chương trình dung môi đã giúp vildagliptin ra nhanh hơn. Kết quả thẩm định cho thấy các xử lý trên là hoàn toàn phù hợp. Phương pháp vừa xây dựng cho phép định lượng đồng thời 2 thành phần có nồng độ và tính tan rất khác nhau là metformin và vildagliptin với độ đặc hiệu cao, độ đúng và độ chính xác tốt, có tương quan tuyến tính trong khoảng nồng độ nghiên cứu.

Các nghiên cứu trước đây khi định lượng đồng thời 2 thành phần này (MET và VIL) đều dùng bước sóng xác định từ 210 nm trở xuống [4], [6]. Ngoài lý do ưu tiên cho VIL như đã nói ở trên, chúng tôi lựa chọn bước sóng 218 nm nhằm hạn chế phần lớn ảnh hưởng có thể xảy ra do độ hấp thụ cao của các tạp (có trong dung môi và trong một số tá dược) ở vùng bước sóng thấp.

Phương pháp mới xây dựng cũng đã được sử dụng để định lượng 1 mẫu Galvus-Met (lot WUM66) mua trên thị trường. Do không đủ hóa chất, chúng tôi không thể so sánh với phương pháp của nhà sản xuất ra thuốc gốc (Norvatis). Tuy nhiên kết quả thu được cũng cho thấy viên đạt chỉ tiêu này của tiêu chuẩn cơ sở (95,0 đến 105,0 % so với hàm lượng ghi trên nhãn của mỗi chất), đạt yêu cầu về hàm lượng của thuốc đang lưu hành trên thị trường.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được một phương pháp hiệu quả, chính xác để định lượng đồng thời metformin và vildagliptin trong chế phẩm dạng viên hỗn hợp. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu tốt, độ đúng và độ chính xác cao trong khoảng tuyến tính (từ 42,3 đến 101,6 $\mu\text{g/ml}$ với metformin và từ 2,58 đến 6,18 $\mu\text{g/ml}$ với vildagliptin), có thể sử dụng để kiểm tra chất lượng một số chế phẩm có trên thị trường.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel-Ghany, M.F., Abdel-Aziz, O., et al., 2014. Validation of different spectrophotometric methods for determination of vildagliptin and metformin in binary mixture. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, **125**: 175-82.
2. ASEAN, 2012, ASEAN guidelines for validation of analytical procedure.
3. Hội đồng Dược điển Việt Nam, 2017, Dược điển Việt nam V.
4. Phan Thanh Dũng, Lưu Hoàng Long, Hoàng Anh Việt, 2019. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời metformin hydroclorid và vildagliptin trong chế phẩm đa thành phần bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Dược học*, **59** (11).
5. Pontarolo, R., Gimenez, A.C., et al., 2014. Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 965: 133-41.
6. Satheeshkumar, N., Pradeepkumar, M., et al., 2014. Development of validated stability indicating assay method for simultaneous estimation of metformin hydrochloride and vildagliptin by RP-HPLC. *Drug Res (Stuttg)*, 64(3): 124-9.

Tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn và...

(Tiếp theo trang 39)

6. Qaddouri Bouchra Guadaoui, Abdelkarim Bellirou, Ahmed Hamal, Abdellah Melhaoui, Ahmed Brown, Grant W. Bellaoui, Mohammed (2011), "The Budding Yeast "Saccharomyces cerevisiae" as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties", *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011, pp. 954140-954140.
7. Shao Chun-Jie Kasai Ryoji, Xu Jing-Da, Tanaka Osamu (1989), "Saponins from Roots of Kalopanax septemlobus (THUNB.) KOIDZ., Ciqui : Structures of Kalopanax-saponins C, D, E and F", *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 37(2), pp. 311-314.
8. Tamokou J. D. D. Mbaven, A. T., Kuete V. (2017), "Chapter 8 - Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables", *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Kuete Victor, Academic Press, pp. 207-237.
9. Tuyet Nguyen Thi Anh (2009), Chemical compositions of some medicinal plants from the genus Polyscias in the *Araliaceae* family, University of Science - VNUHCM.
10. Vanden Bergher D.A., Vlietinck (1991), *Screening methods for Antibacterial and Ativiral Agent from Higher Plants*, Academic Press, pp. 100-125.