

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời dextromethorphan hydrobromid và promethazin hydroclorid trong chế phẩm uống bằng phương pháp *HPLC*

Phạm Toàn Quyền, Đỗ Hoàng Hân, Nguyễn Nhân Hậu
Nguyễn Văn Hà, Nguyễn Thị Bảo Anh, Bùi Thị Phường
Huỳnh Linh Tý, Lê Minh Trí*

Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

Promethazine DM oral solution contains dextromethorphan HBr (DEX) 15 mg and promethazine HCl (PRO) 6.25 mg per each 5 ml is indicated for the temporary relief of coughs and upper respiratory symptoms associated with allergy or the common cold. Up to now, the simultaneous quantification of two active ingredients is not published in any pharmacopoeia and other Vietnamese references. Therefore, it is necessary to develop and validate a simple, rapid, precise and accurate method for the simultaneous determination of two compounds dextromethorphan HBr and promethazine HCl in oral solution by HPLC. The chromatographic analysis was performed using a RP C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) at room temperature (25 °C) with a mobile phase consisting of a mixture of 650 ml of acetonitrile and 350 ml of water with 3.11 g sodium lauryl sulfate (as a ion pair agent) and 0.56 g ammonium acetate; pH adjusted to 3.0 by glacial acetic acid; injection volume was 20 μ L. The flow rate was 1.2 ml/min and the detection wavelength was carried out at 280 nm. The results have shown good separation of two components: The retention times were recorded at 7.2 min and 8.6 min, respectively. The method was for system suitability, specificity, linearity, accuracy, precision, range and robustness. The validated method was successfully suitable for routine analysis of oral solution contains these compounds.

Keywords: Dextromethorphan HBr, promethazine HCl, oral solution, simultaneous determination, HPLC.

Đặt vấn đề

Ho không phải là một bệnh mà là một triệu chứng của nhiều bệnh và có thể kéo dài nhiều ngày. Đây là một phản xạ có điều kiện mang tính bảo vệ của cơ thể nhằm làm thông thoáng đường thở khi có ngoại vật (chất nhày, khói bụi, khí độc,...) xâm nhập vào hệ hô hấp làm cho niêm mạc đường hô hấp bị viêm hoặc bị kích thích gây co thắt. Cơ ho có khi ngắn

nhưng có khi rất dài làm cho người bệnh khó chịu, mệt mỏi do ho gây mất ngủ. Hiện nay, việc sử dụng kết hợp hai hoạt chất dextromethorphan HBr và promethazine HCl trong chế phẩm dung dịch uống để điều trị ho, ngứa, sổ mũi, hắt hơi trong lâm sàng đã được FDA (Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ) chấp thuận cho phép lưu hành với nhiều ưu điểm như giảm thiểu chi phí, thích hợp cho nhiều đối tượng kể cả trẻ em và bệnh nhân khó nuốt, quá trình hấp thu thuốc nhanh đồng thời hạn chế được nhược điểm của từng chế phẩm riêng biệt mà vẫn giữ được hiệu quả trị liệu. Tuy nhiên, vấn đề kiểm nghiệm còn gặp nhiều khó khăn do tiêu chuẩn kỹ thuật

Chịu trách nhiệm: Lê Minh Trí
Email: leminhtri@ump.edu.vn
Ngày nhận: 08/01/2021
Ngày phản biện: 08/02/2021
Ngày duyệt bài: 19/02/2021

của chế phẩm chứa đồng thời hai hoạt chất trên chưa từng được đưa vào bất kỳ Dược điển nào trên thế giới [1 - 4], trong khi tiêu chuẩn chất lượng cơ sở của từng nhà sản xuất lại mang tính chất nội bộ (in-house standard) và chưa thống nhất. Bên cạnh đó, các tài liệu nghiên cứu khác được công bố tại Việt Nam cũng chưa có quy trình phân tích đồng thời các hoạt chất này [5-7]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra một quy trình chung đơn giản, nhanh chóng, tiện lợi, tiết kiệm chi phí để định lượng đồng thời dextromethorphan HBr và promethazin HCl trong chế phẩm dung dịch

uống bằng cách ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm Promethazine DM Oral solution của Công ty Par Pharmaceutical (Hoa Kỳ) chứa 15 mg dextromethorphan hydrobromid và 6,25 mg promethazin hydroclorid trong mỗi 5 ml dung dịch uống.

Chất chuẩn đối chiếu

Bảng 1. Danh mục chất chuẩn đối chiếu do Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh cung cấp (hàm lượng được tính trên chế phẩm nguyên trạng)

Tên chất chuẩn	Hàm lượng	Số lô hiện hành	Số lô thay thế
Dextromethorphan HBr	94,4%	QT015 111017	QT015 121117
Promethazin HCl	99,4%	QT108 070420	

Hóa chất, dung môi

Natri lauryl sulfat, amoni acetat, acid acetic băng, đạt tiêu chuẩn phân tích (Hãng Fisher, Mỹ); acetonitril, nước đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC (Hãng Merk, Đức).

Trang thiết bị

Hệ thống HPLC Shimadzu LC-2030 3D với đầu dò PDA (phần mềm xử lý số liệu Lab Solutions) (Nhật), cột sắc ký pha đảo Phenomenex RP C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Mỹ); Bộ lọc chân không Advantec 0,45 µm (Nhật); Bể siêu âm Elma (Anh); Máy đo pH Mettler Toledo (Thụy Sĩ); Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ); các dụng cụ thủy tinh đạt tiêu chuẩn chính xác dùng trong phân tích (ISO 4787:2010).

Xử lý mẫu

Dung môi pha mẫu: Pha động.

Mẫu thử: Hút chính xác 1 ml dung dịch uống Promethazine DM Oral Solution cho vào bình định mức 25 ml, pha loãng với pha động. Lắc đến khi hòa tan hoàn toàn, bổ sung đủ thể tích với dung môi. Lọc qua màng lọc 0,45 µm vào vial 1,5 ml và siêu âm loại khí.

Mẫu chuẩn: Cân chính xác lần lượt các chất chuẩn đối chiếu 30 mg DEX và 12,5 mg PRO hòa tan trong cùng một bình định mức 25 ml

với pha động. Lấy 1 ml dung dịch này pha loãng thành 10 ml trong bình định mức với cùng dung môi. Nồng độ chuẩn thu được tương ứng khoảng 0,12 mg/ml DEX và 0,05 mg PRO. Lọc qua màng lọc 0,45 µm vào vial 1,5 ml và siêu âm loại khí.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định bước sóng phát hiện

Sử dụng phổ UV-Vis để xác định bước sóng hấp thụ cực đại của từng hoạt chất, từ đó lựa chọn bước sóng phát hiện đồng thời 2 chất với ưu tiên chất có bước sóng hấp thụ cực đại ngắn hơn.

Lựa chọn pha động và điều kiện sắc ký

Sử dụng HPLC pha đảo với đầu dò PDA có pha tĩnh kém phân cực, tiến hành khảo sát pha động là các hệ dung môi hữu cơ kết hợp với độ phân cực thích hợp, có chứa hệ đệm cùng tác nhân bắt cặp ion. Đồng thời ghi nhận và lựa chọn các điều kiện sắc ký phù hợp với tiêu chí: Các pic chính có thời gian lưu hợp lý; tách nhau hoàn toàn (hệ số phân giải $R_s \geq 1,5$); hệ số đối xứng A_s trong khoảng 0,8 đến 1,5; độ tinh khiết pic $\geq 99\%$.

Thẩm định quy trình phân tích

Sau khi lựa chọn được pha động và điều kiện sắc ký phù hợp, quy trình phân tích sẽ được

thẩm định theo các hướng dẫn của ASEAN 2008 [8] về thẩm định quy trình định lượng với các chỉ tiêu:

- **Tính phù hợp hệ thống:** Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần với cùng một mẫu chuẩn có nồng độ các chất chuẩn tương ứng 0,12 mg/ml DEX và 0,05 mg/ml PRO.

- **Tính đặc hiệu:** Tiến hành sắc ký lần lượt đối với mẫu chuẩn, mẫu giả dược (placebo) là dung môi pha mẫu, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu thử phân hủy 24 giờ và mẫu thử phân hủy 7 ngày (mẫu thử để ở nhiệt độ phòng, tiếp xúc với ánh sáng ban ngày trong 24 giờ và 7 ngày) theo quy trình phân tích đã xây dựng.

- **Độ tuyến tính:** Chuẩn bị 5 dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ lần lượt 50, 75, 100, 125, 150% so với nồng độ gốc của hai hoạt chất trong chế phẩm cần phân tích từ một dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 3 mg/ml DEX và 1,25 mg/ml PRO. Tiến hành sắc ký mỗi nồng độ 3 lần, lấy kết quả trung bình để tính phương trình hồi quy.

- **Độ chính xác:** 2 thành viên bất kỳ lần lượt tiến hành phân tích trên 6 mẫu chuẩn ở những thời điểm khác nhau. Sự sai khác trong kết quả về phương sai và giá trị trung bình được so sánh bằng các phương pháp kiểm định thống kê tương ứng.

- **Độ đúng:** 3 mức nồng độ mẫu chuẩn 80%, 100%, 120% so với nồng độ gốc của hai hoạt chất trong chế phẩm cần định lượng được chuẩn bị độc lập bởi 3 thành viên khác nhau vào 3 thời điểm. Mỗi mẫu được tiêm mẫu 3 lần

và lấy kết quả trung bình để tính toán.

- **Khoảng xác định:** Chỉ tiêu này được xác định từ kết quả và sự tương quan giữa khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng của phương pháp.

- **Độ thô:** Tiến hành thay đổi một số yếu tố trong các điều kiện sắc ký đã thiết lập như: Tốc độ dòng $\pm 0,1$ ml/phút; nhiệt độ cột ± 2 °C; pH pha động $\pm 0,1$; các vị trí đặt mẫu khác nhau trong khay chứa mẫu. Đánh giá tính phù hợp hệ thống dựa trên các sắc ký đồ (SKĐ) thu được.

Xử lý số liệu

Phần mềm Excel 2013.

Kết quả và bàn luận

Khảo sát điều kiện sắc ký

Dựa vào phương pháp nghiên cứu đã đề ra và thông qua quá trình thực nghiệm, các điều kiện sắc ký phù hợp được lựa chọn là:

- Cột sắc ký: RP C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).
- Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút.
- Thể tích tiêm: 20 μ l.
- Nhiệt độ cột: 25 °C.
- Bước sóng phát hiện: 280 nm.

- Pha động: Hòa tan 3,11 g natri lauryl sulfat trong 650 ml acetonitril và 350 ml nước, thêm vào dung dịch 0,56 g amoni acetat. Điều chỉnh pH đến 3,0 bằng acid acetic băng, chạy theo chương trình isocratic.

Thẩm định quy trình phân tích

Tính phù hợp hệ thống

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

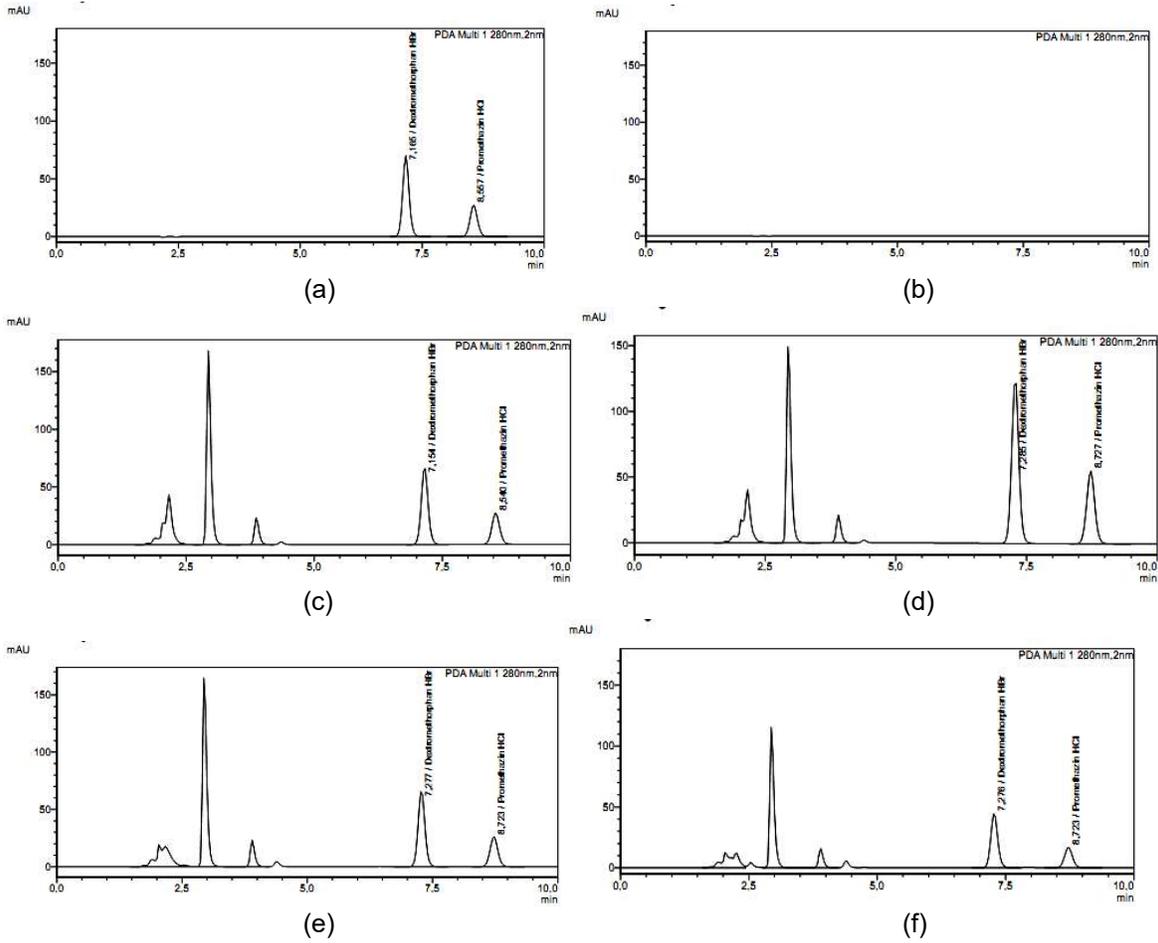
		t_R (phút)	S (mAU*s)	A_S	R_S	N
DEX	TB	7,169	622735	1,057	--	9436
	SD	0,003	1700,504	0,003	--	51,190
	RSD (%)	0,032	0,249	0,237	--	0,495
PRO	TB	8,562	292354	1,044	4,392	10190,500
	SD	0,03	296,986	0,002	0,0225	192,025
	RSD (%)	0,033	0,093	0,181	0,525	1,720

t_R : thời gian lưu, S: diện tích pic; A_S : hệ số đối xứng; R_S : Độ phân giải, N: số đĩa lý thuyết

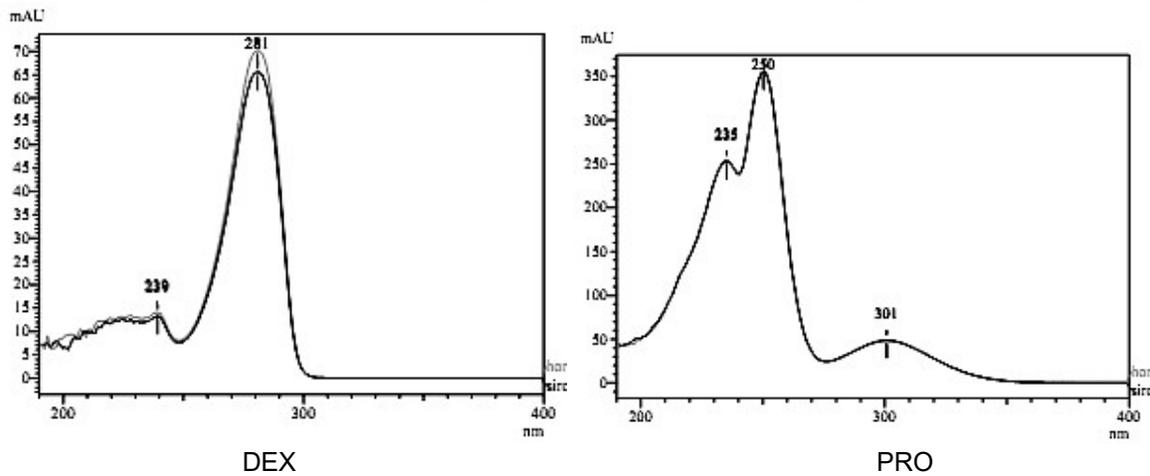
Các yêu cầu về RSD của thời gian lưu và diện tích pic của các hoạt chất đều $\leq 2\%$; độ phân giải $R_S \geq 1,5$; hệ số đối xứng nằm trong

khoảng 0,8 đến 1,5. Như vậy quy trình phân tích đạt tính phù hợp hệ thống.

Tính đặc hiệu



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn (a), mẫu placebo (b), mẫu thử (c), mẫu thử thêm chuẩn (d), mẫu thử phân hủy 24 giờ (e) và mẫu thử phân hủy 7 ngày (f)



Hình 2. Phổ UV-Vis của các pic tại thời gian lưu trong mẫu chuẩn và mẫu thử (mẫu thử: đường nét đậm; mẫu chuẩn: đường nét mờ)

Bảng 3. Thông số đặc hiệu của các pic hoạt chất trong sắc ký đồ

SKĐ	Hoạt chất	Hệ số bất đối xứng As	Độ tinh khiết pic	SKĐ	Hoạt chất	Hệ số bất đối xứng As	Độ tinh khiết pic
a	DEX	1,051	1,000	d	DEX	1,038	0,999
	PRO	1,047	1,000		PRO	1,037	0,999
b	DEX	---	---	e	DEX	1,069	0,999
	PRO	---	---		PRO	1,047	1,000
c	DEX	1,068	0,999	f	DEX	1,097	0,999
	PRO	1,058	0,999		PRO	1,048	0,999

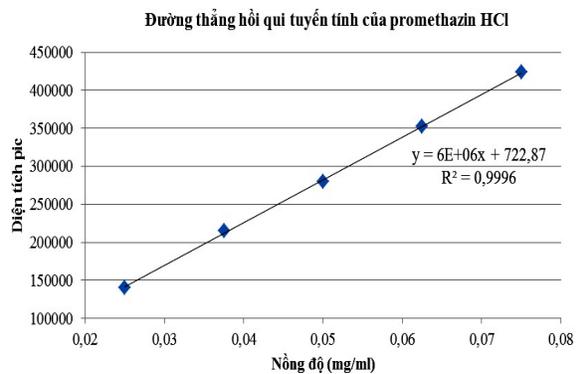
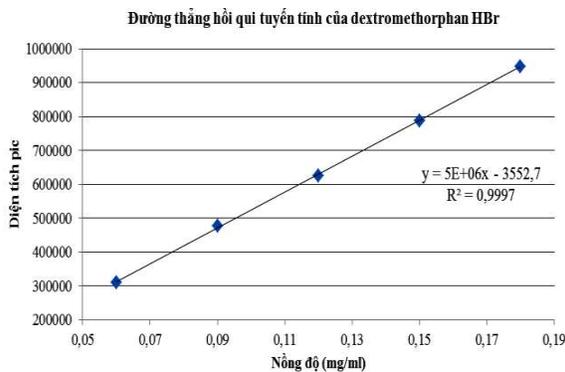
SKĐ mẫu placebo không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng của các pic hoạt chất trong SKĐ mẫu chuẩn. SKĐ mẫu thử có các pic chính cho thời gian lưu tương tự với các pic chính trên SKĐ mẫu chuẩn, các pic hoạt chất tách hoàn toàn ra khỏi các pic khác. Khi thêm một lượng chất chuẩn vào mẫu thử, diện tích và chiều cao của pic các hoạt chất tăng lên so với mẫu thử chưa thêm chuẩn. SKĐ của các mẫu thử ở điều kiện khác nghiệt (mẫu thử

để ở nhiệt độ phòng, tiếp xúc với ánh sáng ban ngày trong 24 giờ và 7 ngày), các pic tạp chất xuất hiện tách ra khỏi các pic hoạt chất cần phân tích. Phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu của các pic trong mẫu thử tương tự phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu của các pic trong mẫu chuẩn. Các pic hoạt chất cần phân tích đều đạt độ tinh khiết pic $\geq 99\%$. Như vậy, quy trình phân tích có tính đặc hiệu.

Độ tuyến tính

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ tuyến tính

Dextromethorphan HBr			Promethazin HCl		
C (mg/ml)	S trung bình (mAU*s)	RSD (%)	C (mg/ml)	S trung bình (mAU*s)	RSD (%)
0,06	311.074,333	0,115	0,025	140.244	0,116
0,09	477.764	0,105	0,0375	215.186,667	0,078
0,12	624.474,333	0,104	0,05	279.834,667	0,162
0,15	786.649,333	0,04	0,0625	352.273,333	0,040
0,18	948.084	0,06	0,075	423.575,667	0,038



Hình 3. Đường thẳng hồi qui tuyến tính của dextromethorphan HBr và promethazin HCl

Phương trình hồi quy tuyến tính của cả hai hoạt chất đều có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,999$. Như vậy, quy trình đạt độ tuyến tính

trong khoảng 50% – 150% so với nồng độ hoạt chất gốc.

Độ chính xác

Bảng 5. Kết quả thống kê độ chính xác

Hoạt chất	Độ lặp lại				Độ chính xác trung gian			
	Thành viên 1 Ngày 28/01/2021		Thành viên 2 Ngày 29/01/2021					
	TB (%) n = 6	RSD (%) n = 6	TB (%) n = 6	RSD (%) n = 6	TB (%) n = 12	RSD (%) n = 12	$F_{tn} < F_{0,05} = 0,198$	$T_{tn} < T_{0,05} = 2,228$
DEX	100,052	0,034	99,631	0,515	99,842	0,411	0,004	2,008
PRO	99,998	0,060	100,117	0,291	100,058	0,195	0,042	0,974

RSD của hàm lượng chuẩn so với hàm lượng ghi trên nhãn của các hoạt chất đều $\leq 2\%$ và độ sai khác giữa 2 thành viên khác nhau tiến hành thử nghiệm $\leq 2\%$. Kiểm tra bằng F-test và T-test cho thấy $F_{tn} < F_{0,05} = 0,198$ và $T_{tn} < T_{0,05} = 2,228$. Quy trình đạt độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Độ đúng

Bảng 6. Kết quả thống kê độ đúng

Mức nồng độ	DEX		PRO	
	Độ phục hồi (%)	RSD (%)	Độ phục hồi (%)	RSD (%)
80%	99,727	0,925	99,946	1,542
100%	99,805	1,127	99,824	1,346
120%	100,272	0,420	99,967	1,615

Tỷ lệ thu hồi của cả hai hoạt chất đều nằm trong khoảng cho phép từ 98,0 – 102,0%; RSD của các mẫu đều $\leq 2\%$. Quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Khoảng xác định

Bảng 7. Kết quả khoảng xác định

Hoạt chất	DEX	PRO
Khoảng xác định (mg/ml)	0,096 – 0,0144	0,04 – 0,06

Độ thô

Các SKĐ thu được ở giai đoạn này đều cho kết quả đạt tính phù hợp hệ thống. Các thông số

đều có $RSD \leq 2\%$; hệ số đối xứng $0,8 \leq A_S \leq 1,5$; độ phân giải $R_S \geq 1,5$. Như vậy, quy trình phân tích đạt độ thô.

Bàn luận

Dựa vào cấu trúc hóa học của hai hoạt chất đều là những chất kém phân cực, có nối đôi liên hợp với tính base yếu, việc sử dụng **HPLC** với đầu dò PDA cùng cột RP C18, pha động là sự kết hợp acetonitril-nước chứa amoni acetat ở pH 3,0 giúp ổn định hoạt chất, đồng thời bổ sung natri lauryl sulfat đóng vai trò tác nhân bắt cặp ion làm tăng khả năng rửa giải, đã cho thấy kết quả phân tích định lượng tốt đồng thời cả hai hoạt chất ở bước sóng 280 nm. Các dung môi, hóa chất, và trang thiết bị được lựa chọn sử dụng có tính phổ biến cao, thông dụng tại hầu hết các phòng thí nghiệm giúp tăng khả năng ứng dụng vào thực tế. Quy trình phân tích sau khi xây dựng được thẩm định theo hướng dẫn của ASEAN 2008 đã đáp ứng đầy đủ các chỉ tiêu cần thiết và hoàn toàn phù hợp để hỗ trợ cho quá trình nộp hồ sơ đăng ký thuốc tại Việt Nam, bao gồm: Tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, khoảng xác định và độ thô.

Kết luận

Đã xây dựng được quy trình định lượng đồng thời dextromethorphan HBr và promethazin HCl trong chế phẩm dung dịch uống bằng phương pháp **HPLC** với đầu dò PDA. Phương pháp đã được thẩm định và chứng minh đáp ứng đầy đủ

các chỉ tiêu với thời gian phân tích ngắn, tiết kiệm chi phí, nhân lực. Quy trình này có thể áp dụng để định lượng đồng thời các chế phẩm có trên thị trường Việt Nam (sản xuất hay nhập khẩu) chứa hai hoạt chất trên.

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2020-44-05.

Tài liệu tham khảo

1. Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V*, "Chuyên luận Dextromethorphan hydrobromid", Hà Nội, NXB Y học, tr. 297.

2. Hội đồng Dược điển Việt Nam (2017), *Dược điển Việt Nam V*, "Chuyên luận Promethazin hydroclorid", Hà Nội, NXB Y học, tr. 704-706.

3. United States Pharmacopeial Convention (2018), *The United States Pharmacopeia 2018: USP 41*, The national formulary: NF 36, "Dextromethorphan hydrobromide", pp. 1231-1233.

4. United States Pharmacopeial Convention (2018), *The United States Pharmacopeia 2018: USP 41*, The national formulary: NF 36, "Promethazine hydrochloride", pp. 3463-3464.

5. Nguyễn Thị Như Ngọc, Phan Thanh Dũng (2018), "Xây dựng quy trình định lượng đồng thời Paracetamol, Dextromethorphan hydrobromid, Loratadin, Phenylephrin bitartrat trong viên sủi bọt bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 22 (1), tr. 189 - 96.

6. Đỗ Thị Thu Hường (2011), "Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời paracetamol, dextromethorphan hydrobromid, loratadin trong chế phẩm bằng HPLC", *Khóa luận Dược sĩ Đại học*, Trường Đại học Dược Hà Nội, tr. 55.

7. Dongala T., N. K. Katari (2019), "Development and validation of a generic RP-HPLC PDA method for the simultaneous separation and quantification of active ingredients in cold and cough medicines", *Biomedical Chromatography*, 33 (11), pp. 4641.

8. ASEAN (2008), Asean guideline for validation of analytical procedures, pp. 1-17