

ĐỊNH LƯỢNG FEXOFENADIN HYDROCLORID TRONG VIÊN NÉN BẰNG SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO

Vũ Văn Tuấn¹, Nguyễn Thị Thanh Phương²
Nguyễn Văn Bạch², Phan Vũ Thu Hà³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng, thẩm định phương pháp định lượng fexofenadin hydroclorid (FEX.HCl) trong viên nén bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và ứng dụng phương pháp để đánh giá chất lượng một số chế phẩm có trên thị trường. **Phương pháp:** Khảo sát để chọn điều kiện sắc ký tối ưu. Phương pháp xây dựng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH, gồm: Tính thích hợp hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ). **Kết quả:** Phương pháp sử dụng cột Sun FireTM (RP-C18, 5 μ m, 100Å, 250 x 4,6 mm), detector tử ngoại tại bước sóng 220 nm, pha động gồm acetonitril và đệm phosphat (pH 4,8) tỷ lệ 35:65 (v/v), tốc độ dòng: 1,0 ml/phút. LOD và LOQ của phương pháp lần lượt là 0,08 và 0,32 μ g/ml, khoảng tuyến tính từ 10 - 40 μ g/ml với độ lặp lại và độ đúng nằm trong giới hạn cho phép. Hàm lượng FEX.HCl trong một số chế phẩm lưu hành trên thị trường khi xác định bằng phương pháp này nằm trong khoảng 98,13 - 101,40% so với lượng ghi trên nhãn. **Kết luận:** Phương pháp HPLC đã xây dựng phù hợp và đủ tin cậy để định lượng FEX.HCl trong viên nén.

* Từ khóa: Fexofenadin; Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

ĐẶT VẤN ĐỀ

FEX.HCl là dược chất kháng histamin thế hệ 2, có tác dụng đối kháng đặc hiệu và chọn lọc trên thụ thể H₁ ngoại vi. FEX.HCl là một chất chuyển hóa có hoạt tính của terfenadin. Vì FEX.HCl có tác dụng nhanh và kéo dài, nên được sử dụng rộng rãi trong điều trị triệu chứng viêm mũi dị ứng theo mùa, mày đay mạn tính vô

căn ở người lớn và trẻ em > 6 tuổi [1]. Việc kiểm tra chất lượng thuốc nhằm đảm bảo hiệu quả điều trị và an toàn cho người sử dụng là một tiêu chí rất quan trọng. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần cung cấp các dữ liệu về phương pháp định lượng FEX.HCl trong viên nén và áp dụng để đánh giá chất lượng một số chế phẩm đang lưu hành.

1. Trường Đại học Đại Nam

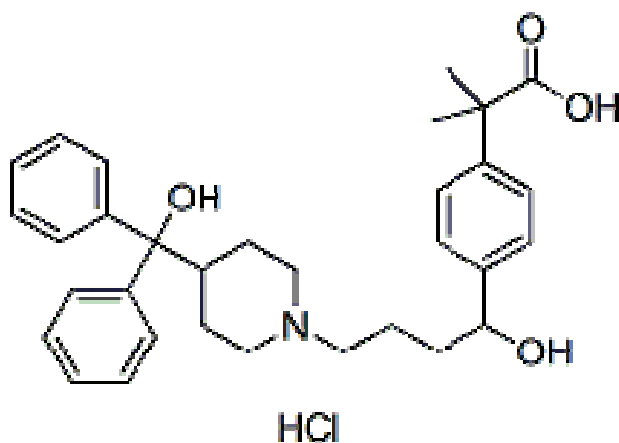
2. Học viện Quân y

3. Sở Y tế Phú Thọ

Người phản hồi: Vũ Văn Tuấn (vuvantuandkh@gmail.com)

Ngày nhận bài: 20/02/2020

Ngày bài báo được đăng: 9/4/2020



Hình 1: Công thức cấu tạo của fexofenadin hydroclorid.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu và thiết bị

* Nguyên liệu và hóa chất:

- FEX.HCl chuẩn: Hàm lượng 98,62% (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp).
- Viên nén chứa FEX.HCl đang lưu hành trên thị trường.

Bảng 1: Thông tin chế phẩm đang lưu hành được sử dụng trong nghiên cứu.

Thứ tự	Kí hiệu	Ngày sản xuất - Hạn sử dụng	Hàm lượng ghi trên nhãn (mg)
1	T	10/9/15 - 09/9/17	60
2	F	11/11/15 - 11/11/18	60
3	H	29/9/16 - 29/9/19	60

- Acetonitril (ACN) và methanol (MeOH) (HPLC-Merck) và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

* Thiết bị:

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Alliance Waters 2695D (Mỹ), 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, detector UV2487, có buồng gia nhiệt cột; máy quang phổ LABOMED UV-VIS Spectro UVD 2960 (Mỹ), máy đo pH Mettler Toledo (Thụy Sĩ), cân phân tích Sartorius (độ chính xác 0,1 mg).

2. Phương pháp nghiên cứu

* Khảo sát điều kiện sắc ký:

- Lựa chọn bước sóng phân tích: Ghi phổ tử ngoại dung dịch chuẩn FEX.HCl nồng độ 20 µg/ml. Bước sóng có cực đại hấp thụ được lựa chọn để phát hiện FEX.HCl.

- Lựa chọn pha tĩnh: So sánh hai cột C18 có kích thước 5 μm x 4,6 x 250 mm: cột SunFire™ (100Å) và cột Phenomenex (110Å). Lựa chọn cột có khả năng tách tốt với pic cân đối, hệ số bất đối không quá 1,5 và số đĩa lý thuyết lớn hơn để tiến hành phân tích.

- Lựa chọn pha động: Khảo sát các tỷ lệ pha động giữa ACN và đệm phosphat ở các tỷ lệ 32/68, 35/65, 40/60, (v/v) để xác định tỷ lệ pha động tối ưu nhất.

- Khảo sát pH: Giữ nguyên các điều kiện sắc ký khác và khảo sát giá trị pH của đệm phosphat tại các giá trị 3,0; 3,9; 4,8 để lựa chọn pH phù hợp.

** Các điều kiện sắc ký khác được cố định:*

- Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng.

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Thể tích tiêm: 10 μl .

- Cách pha đệm phosphat: Cân 2,72g KH_2PO_4 hòa trong 900 ml nước cất, điều chỉnh pH bằng acid phosphoric. Sau đó, bổ sung thể tích vừa đủ thành 1.000 ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi tiến hành sắc ký.

** Thẩm định phương pháp:*

Quy trình thẩm định phương pháp định lượng tiến hành theo hướng dẫn của ICH [3]:

- Tính thích hợp hệ thống: Hòa tan FEX.HCl chuẩn trong methanol để được nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành sắc ký 6 lần cùng một dung dịch chuẩn.

- Tính đặc hiệu: Chuẩn bị dung dịch thử bằng cách cân chính xác một lượng bột viên tương ứng khoảng 50 mg FEX.HCl, thêm 30 ml MeOH, lắc siêu âm 15 phút và thêm dung môi đến vừa đủ 50 ml. Lọc, lấy

1 ml dịch lọc và thêm MeOH vừa đủ 50 ml. Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn, dung dịch thử và mẫu trắng (MeOH) theo phương pháp đã xây dựng.

- Khoảng tuyến tính: Hòa tan 10 mg FEX.HCl chuẩn vừa đủ trong 10 ml MeOH, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng bằng MeOH thành dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 10, 15, 20, 25, 30 và 40 $\mu\text{g/ml}$. Phân tích các dung dịch chuẩn theo phương pháp đã xây dựng. Sử dụng diện tích pic FEX.HCl làm tín hiệu đáp ứng để lập đường chuẩn.

- Độ lặp lại: Tiến hành phân tích 6 dung dịch thử được chuẩn bị song song theo phương pháp đã xây dựng. Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của kết quả phân tích.

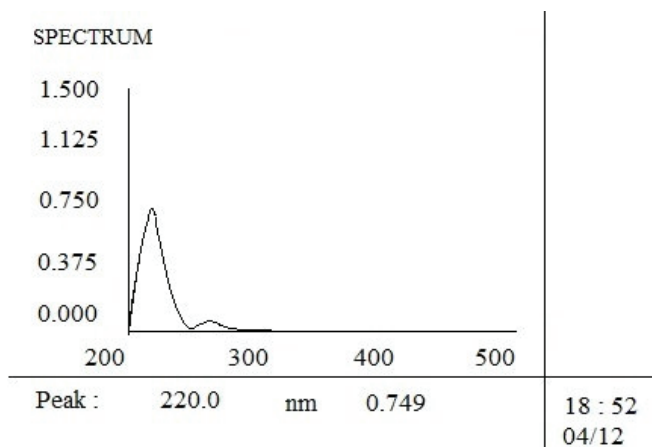
- Độ đúng: Các dung dịch thử thêm chuẩn được chuẩn bị bằng cách cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khoảng 10 mg FEX.HCl (9 mẫu) cho vào bình định mức 10 ml, thêm lần lượt 8; 10; 12 mg FEX.HCl chuẩn và 7 ml MeOH, lắc siêu âm 15 phút. Thêm MeOH vừa đủ đến vạch định mức. Lọc, lấy 1 ml dịch lọc và pha loãng đến 100 ml bằng MeOH. Tiến hành sắc ký 9 dung dịch thử thêm chuẩn, dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Từ kết quả phân tích, tính độ thu hồi của phương pháp tại 3 mức nồng độ.

- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Pha loãng dung dịch chuẩn đến nồng độ có tín hiệu/nhiều bằng 3 (LOD) và bằng 10 (LOQ).

Phương pháp đã xây dựng và thẩm định được ứng dụng để định lượng FEX.HCl trong 3 mẫu chế phẩm đang lưu hành.

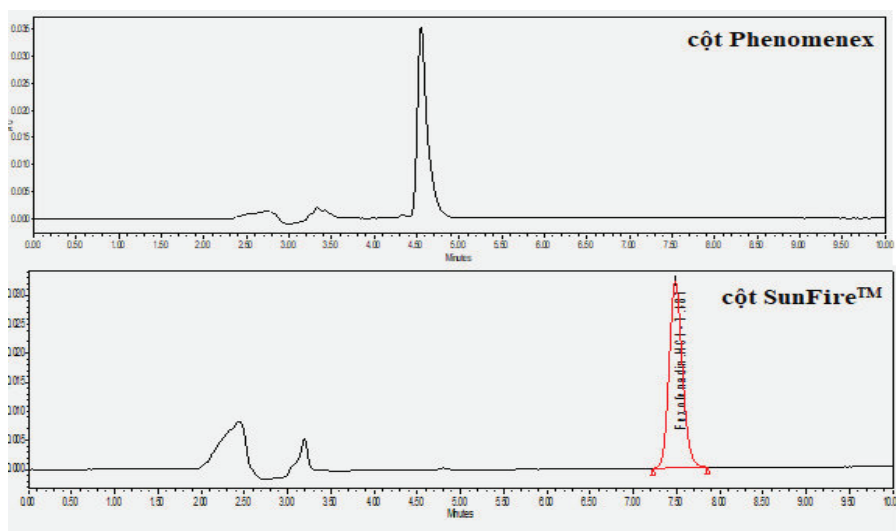
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký



Hình 2: Phổ tử ngoại của dung dịch FEX.HCl chuẩn.

Phổ tử ngoại cho thấy: 2 cực đại hấp thụ ở bước sóng 220 và 265 nm. Trong đó, bước sóng 220 nm có độ hấp thụ cao hơn (0,749) so với bước sóng 265 nm (0,057). Kết quả này cũng phù hợp với công bố của Breier A.R. và CS [2]. Do vậy, bước sóng 220 nm được chọn là bước sóng phát hiện trong nghiên cứu này.



Hình 3: Sắc ký đồ dung dịch chuẩn phân tích bằng 2 cột khác nhau.

Trên 2 cột phenomenex và SunFireTM, cột phenomenex có số đĩa lý thuyết (3400) nhỏ hơn nhiều cột SunFireTM (12065). Ngoài ra, cột phenomenex còn cho pic kéo đuôi với hệ số đối xứng 1,64. Vì vậy, cột SunFireTM được chọn để sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2: Kết quả khảo sát tỷ lệ pha động.

Tỷ lệ dung môi ACN/đệm (v/v)	Thời gian lưu T_R (phút)	Hệ số bất đối (AF)	Số đĩa lý thuyết (n)
32/68	9,261	1,15	13255
35/65	7,487	1,13	11427
40/60	4,455	1,16	7806

Khi tăng tỷ lệ ACN trong pha động từ 32 - 40%, thời gian lưu giảm từ 9,26 phút xuống 4,45 phút, số đĩa lý thuyết giảm từ 13255 xuống 7806. Để tiết kiệm thời gian phân tích mà vẫn đảm bảo cột có hiệu lực tách tốt, tỷ lệ dung môi ACN/đệm phosphat 35/65 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.

Bảng 3: Kết quả khảo sát pH.

pH	Thời gian lưu T_R (phút)	Hệ số bất đối
3,00	9,36	1,16
3,90	8,84	1,17
4,80	7,58	1,11

Khi tăng pH từ 3,00 lên 4,80, thời gian lưu giảm từ 9,36 xuống 7,58 phút và hệ số bất đối giảm từ 1,16 xuống 1,11. Trong khi đó, ở pH 4,8, pic FEX.HCl có thời gian lưu ngắn nhất và hệ số bất đối gần với 1 nhất. Vì vậy, dung dịch đệm phosphat được điều chỉnh về pH 4,8 trước khi dùng làm dung môi pha động để tiến hành sắc ký.

2. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng

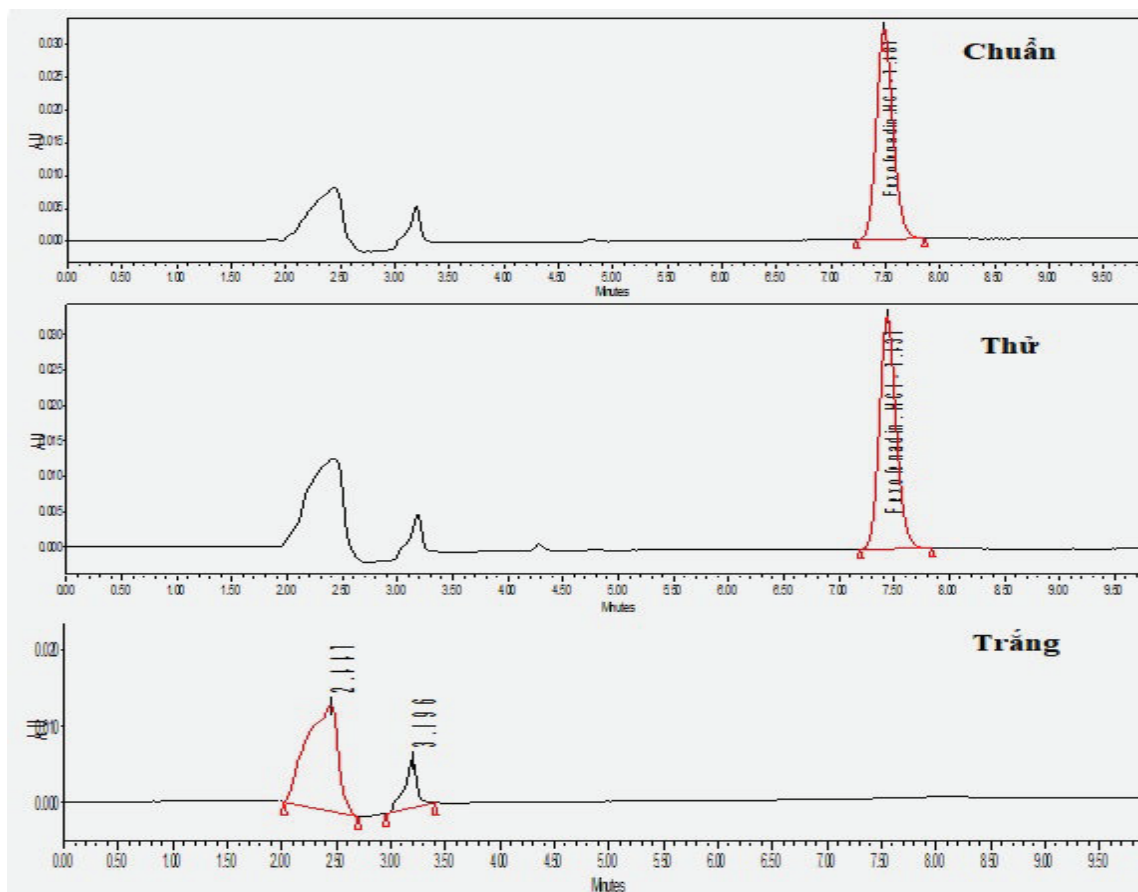
* *Tính thích hợp hệ thống:*

Bảng 4: Kết quả phân tích 6 lần dung dịch chuẩn.

Lần	Thời gian lưu T_R (phút)	Diện tích pic ($\mu V.s$)	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết
1	7,56	333811	1,096	12059
2	7,56	334473	1,104	12048
3	7,54	338112	1,109	12065
4	7,55	335984	1,111	12069
5	7,53	336088	1,109	11964
6	7,54	336671	1,110	11993
Trung bình	7,55	335857	1,107	12033
RSD (%)	0,19	0,46	0,51	0,36

RSD của thời gian lưu là $0,19 < 1\%$ và RSD của diện tích pic, hệ số bất đối, số đĩa lý thuyết đều $< 2\%$. Kết quả này nằm trong giới hạn cho phép, do vậy, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao phù hợp để định lượng FEX.HCl.

* Tính đặc hiệu:



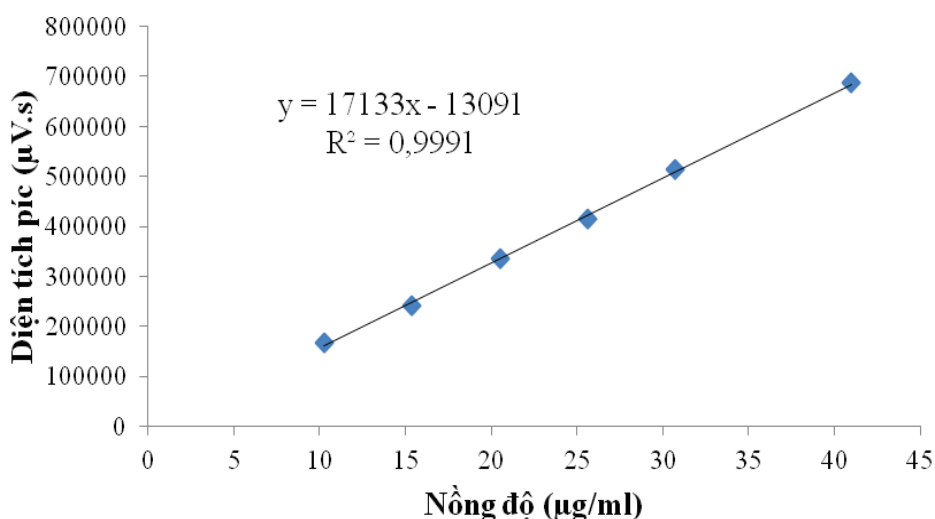
Hình 4: Sắc ký đồ dung dịch chuẩn, dung dịch thử và mẫu trắng.

Pic chính trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn và sắc ký đồ dung dịch thử có thời gian lưu tương tự ở 7,55 phút. Trên sắc ký đồ mẫu trắng, không thấy pic xung quanh thời điểm 7,55 phút. Kết quả này chứng tỏ phương pháp đã xây dựng đặc hiệu cho phân tích FEX.HCl.

* Khoảng nồng độ tuyến tính:

Bảng 5: Diện tích pic của dãy dung dịch chuẩn FEX.HCl.

Thứ tự	1	2	3	4	5	6
Nồng độ dung dịch chuẩn (µg/ml)	10	15	20	25	30	40
Diện tích pic (µV.s)	168186	242279	335664	415465	513720	686801



Hình 5: Đồ thị mô tả sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ FEX.HCl.

Kết quả hình 5 và bảng 5 cho thấy: Đường chuẩn có hệ số tương quan $R^2 = 0,9991$ nằm trong khoảng từ 0,99 - 1. Điều này khẳng định có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic với nồng độ FEX.HCl trong khoảng nồng độ từ 10 - 40 μg/ml. Vì vậy, có thể sử dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng FEX.HCl bằng cách so sánh diện tích pic của dung dịch thử với dung dịch chuẩn có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính.

* Độ lặp lại:

Bảng 6: Kết quả định lượng lặp lại 6 mẫu thử song song.

TT	Khối lượng bột (mg)	Diện tích pic (μV.s)	Hàm lượng so với nhãn (%)	Kết quả
1	187,4	335287	99,83	n = 6 $\bar{x} = 337.910$ RSD = 0,92% Giới hạn RSD: < 2% Kết luận: Đạt yêu cầu
2	187,6	339764	101,16	
3	187,6	341715	101,74	
4	187,8	340630	101,42	
5	187,3	335345	99,85	
6	187,7	334720	99,66	

RSD của kết quả định lượng 6 mẫu thử song song là 0,92% < 2%. Điều này chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại tốt.

* Độ đúng:

Bảng 7: Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi tại 3 nồng độ khác nhau.

Thứ tự	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic (μV.s)	Lượng tìm thấy (mg)	Tỷ lệ % thu hồi	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1	8,03	291309	7,8328	97,66	98,37 ± 0,72	0,73
2	8,08	292676	7,9891	98,87		
3	8,05	291200	7,944	98,32		
4	10,05	331881	10,17	101,82	101,57 ± 0,95	0,93
5	9,98	332080	10,244	100,83		
6	10,09	331640	10,178	101,90		
7	12,09	362978	12,11	100,80	99,79 ± 0,34	0,34
8	11,99	361298	11,93	99,79		
9	12,03	361134	11,994	98,87		

Phân tích các dung dịch thử thêm chuẩn, dung dịch thử, dung dịch chuẩn theo phương pháp đã xây dựng.

Tỷ lệ thu hồi ở các nồng độ khác nhau đạt từ 98,37 - 101,57% đều nằm trong khoảng 98 - 102% so với lượng chuẩn thêm vào; RSD thu được từ 0,34 - 0,93% đều không > 2%. Chứng tỏ phương pháp đã xây dựng có độ đúng cao.

* Xác định LOD và LOQ:

Bảng 8: Kết quả xác định LOD và LOQ.

Giới hạn	Diện tích pic ước lượng, S (μV.s)	Nồng độ chất chuẩn (μg/ml)	Diện tích pic đo được (μV.s)
LOD	2379 (3 x N)	0,07	2238
		0,08	2412
		0,09	2623
LOQ	7930 (10 x N)	0,30	7601
		0,32	8007
		0,34	8379

Trên sắc ký đồ của mẫu trắng, đo được tín hiệu nền trong khoảng thời gian từ 7,30 - 7,90 phút là N = 793 μV.s. LOD được xác định là nồng độ có S/N = 3. LOQ được xác định là nồng độ có S/N = 10.

LOD được xác định là 0,08 μg/ml và LOQ là 0,32 μg/ml.

3. Kết quả định lượng FEX.HCl trong một số chế phẩm đang lưu hành

Bảng 9: Kết quả định lượng 3 mẫu viên nén FEX.HCl đang lưu hành.

Mẫu	Phép thử	Lượng cân m_t (mg)	Diện tích pic ($\mu V.s$)	Hàm lượng so với nhãn (%)	Trung bình (%)
T	1	174,9	335030	101,52	101,40
	2	174,4	332235	100,94	
	3	174,5	334881	101,70	
F	1	186,3	326287	99,30	99,61
	2	186,4	327764	99,70	
	3	186,1	327630	99,82	
H	1	182,7	323724	99,37	98,13
	2	183,0	321598	98,75	
	3	182,7	320986	98,72	

Sau khi thẩm định phương pháp, 3 mẫu viên nén chứa FEX.HCl được định lượng bằng phương pháp đã xây dựng. Hàm lượng của viên so với nhãn được xác định bằng cách so sánh diện tích pic FEX.HCl trên sắc ký đồ của dung dịch thử với diện tích pic FEX.HCl trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn tiến hành song song.

Kết quả trên cho thấy hàm lượng FEX.HCl trong 3 mẫu thử nghiên cứu lần lượt là 101,40; 99,61 và 98,13% so với hàm lượng ghi trên nhãn. Như vậy, cả 3 mẫu thử trên đều đạt yêu cầu về hàm lượng FEX.HCl theo USP 38 [5].

KẾT LUẬN

Xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng FEX.HCl bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao như sau: FEX.HCl chuẩn hoặc bột viên được hòa tan trong methanol để được nồng độ khoảng 20 $\mu g/ml$, tiến hành sắc ký và so sánh diện tích pic thu được. Điều kiện sắc ký: Cột SunFire™ (RP-C18, 5 μm , 100Å, 250 x 4,6 mm), detector tử ngoại tại bước sóng 220 nm, pha động gồm acetonitril và đệm phosphat pH 4,8 tỷ lệ 35:65 (v/v), tốc độ dòng: 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl ở nhiệt độ phòng. Phương pháp cũng được thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu theo hướng dẫn của ICH về thẩm định phương pháp phân tích. Bên cạnh đó, phương pháp cũng được ứng dụng để định lượng 3 mẫu viên

nén chứa FEX.HCl đang lưu hành trên thị trường. Hàm lượng các mẫu đạt từ 98,13 - 101,40% so với lượng ghi trên nhãn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Dược thư Quốc gia Việt Nam. Nhà Xuất bản Y học. 2015, tr.657-658.
2. Breier A.R., Steppe M., Schapoval E.E.S. Validation of UV spectrophotometric method for fexofenadine hydrochloride in pharmaceutical formulations and comparison with HPLC. Analytical Letters. 2007, 40(12), pp.2329-2337.
3. International Conference on Harmonisation. ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology. 2005.
4. Sweetman S.C. et al. Martindale 36th. RPS Publishing. 2009, pp.579-580.
5. The United States Pharmacopeial Convention. USP 38: Fexofenadin hydrochloride tablets. 2015, p.3487.