

THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CETIRIZINE TRONG VIÊN NÉN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC ĐẦU DÒ UV-VIS TẠI MỘT SỐ NHÀ THUỐC TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Đỗ Phước Quý và Huỳnh Anh Duy

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 25/04/2017

Ngày nhận bài sửa: 03/08/2017

Ngày duyệt đăng: 30/10/2017

Title:

Quantification and determination of cetirizine in tablets by HPLC method with UV-Vis detector

Từ khóa:

Cetirizine, đầu dò UV-Vis, HPLC, viên nén

Keywords:

Cetirizine, HPLC method, tablets, UV-Vis detector

ABSTRACT

A rapid and effective HPLC method with UV-Vis detector is described for the assay of cetirizine in tablet formulation. The determination was performed with a Gemini-NX C18 column (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m) and UV detection at 230 nm. The elution was achieved isocratically with a mobile phase of KH_2PO_4 (pH 7) - acetonitrile (58:42, v/v). The method was validated for specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantitation. The validated method was successfully used for quantitative analysis of three commercial tablets.

TÓM TẮT

Một quy trình định tính, định lượng cetirizine nhanh chóng, hiệu quả bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò UV-Vis được khảo sát. Quy trình sử dụng cột Gemini-NX C18 (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m) bước sóng phát hiện là 230 nm, hệ pha động là dung dịch đệm KH_2PO_4 (pH 7) - acetonitril (58:42, v/v), kiểu rửa giải đẳng môi. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình có độ đặc hiệu cao, đạt độ tuyến tính, đạt độ lặp lại với RSD = 0,49%, đạt độ đúng với tỷ lệ hồi phục 100,42%, giới hạn phát hiện là 0,67 ppm và giới hạn định lượng là 2,03 ppm. Nghiên cứu đã sử dụng quy trình trên để kiểm nghiệm 3 loại thuốc viên nén cetirizine đang lưu hành trên thị trường thành phố Cần Thơ và kết quả cho thấy cả 3 mẫu thuốc đều đạt hàm lượng cetirizine theo quy định của Dược điển Việt Nam IV.

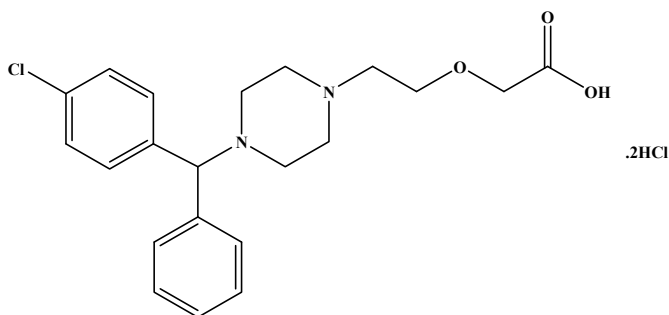
Trích dẫn: Đỗ Phước Quý và Huỳnh Anh Duy, 2017. Thẩm định quy trình định lượng cetirizine trong viên nén bằng phương pháp HPLC đầu dò UV-Vis tại một số nhà thuốc trên địa bàn thành phố Cần Thơ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52a: 12-16.

1 TỔNG QUAN

Cetirizine thuộc nhóm thuốc kháng histamin H_1 được sử dụng rộng rãi, chỉ định trong các trường hợp dị ứng, hỗ trợ trong điều trị cấp cứu sốc phản vệ... (Bộ Y tế, 2007). Nhận thấy rằng, việc kiểm nghiệm chất lượng của dược phẩm nhằm đảm bảo hiệu quả điều trị và an toàn cho người sử dụng là một vấn đề đáng quan tâm. Với mong muốn góp phần tìm kiếm quy trình kiểm nghiệm dược phẩm, nghiên cứu này nhằm khảo sát cũng như thẩm định

quy trình định lượng phù hợp và sử dụng quy trình để định lượng một số mẫu viên nén chứa cetirizine đang được lưu hành trên địa bàn thành phố Cần Thơ.

Cetirizine tồn tại dưới dạng muối dihydroclorid với công thức phân tử là $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_3$ (M=461,8), dạng bột kết tinh màu trắng hoặc gần trắng, dễ tan trong nước, không tan trong acetone và dichloromethane (Bộ Y tế, 2009).



Hình 1: Công thức cấu tạo của cetirizine dihydroclorid

2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Ba loại thuốc viên nén khác nhau chứa cetirizine đang được lưu hành trên thị trường được mua ngẫu nhiên tại các nhà thuốc trên địa bàn thành phố Cần Thơ. Thông tin mẫu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Thông tin về 03 mẫu thuốc viên nén cetirizine 10 mg trên thị trường

STT	Ký hiệu	Số lô	Hàm lượng cetirizine ghi trên nhãn
Mẫu 1	I	00115	10 mg
Mẫu 2	D	0030415	10 mg
Mẫu 3	S	061214	10 mg

2.2 Hóa chất, dung môi và dụng cụ

Hóa chất, dung môi

Cetirizine dihydroclorid chuẩn được cung cấp bởi Công ty Cổ phần XNK Y tế Domesco, số lô: SLL/CTR/0814016, hàm lượng: 99,87% $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$ chế phẩm nguyên trạng.

Dung môi dùng cho nghiên cứu bao gồm: Acetonitril (Mecrk, Đức); methanol (Merck, Đức); nước cất 2 lần (Intertek, Việt Nam); KH_2PO_4 (Việt Nam).

Dụng cụ

Cân điện tử Sartorius CP225D (độ chính xác 0,00001 g); Máy siêu âm Transsonic 570; Máy HPLC Shimadzu SCL đầu dò UV/Vis Spectrophotometer Jenway 6800.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại (λ_{max}) của cetirizine

Tiến hành quét phổ hấp thụ (spectrum scan) mẫu chuẩn cetirizine trên máy quang phổ UV-Vis. Từ đó, ghi nhận λ_{max} của cetirizine để sử dụng cho quy trình định lượng.

Khảo sát quy trình định lượng cetirizine

Quy trình định tính, định lượng cetirizine được khảo sát tại phòng thí nghiệm Sắc ký Quang phổ, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, có tham khảo các quy trình theo một số tài liệu và điều chỉnh phù hợp với tình hình thực tế của phòng thí nghiệm (Jilenska *et al.*, 2000; Nguyễn Thị Hạnh, 2007; Bộ y tế, 2009; The British Pharmacopoeia Commission, 2015); từ đó, đưa ra quy trình định tính, định lượng phù hợp cho cetirizine. Mẫu chuẩn và mẫu thử được tiêm riêng biệt vào hệ thống HPLC, ghi lại sắc ký đồ, thời gian lưu t_R và diện tích peak.

Theo các tài liệu tham khảo, tất cả các quy trình định lượng cetirizine trong viên nén đều dùng cột sắc ký C18 với kích thước lớn là 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m, hệ dung môi là dung dịch đệm KH_2PO_4 - acetonitril dùng với các tỷ lệ (65:35), (85:15), (70:30) (Jilenska *et al.*, 2000; Bộ Y tế, 2009; The British Pharmacopoeia, 2015) hoặc dung dịch H_2SO_4 0,5%- acetonitril (7:93) (Nguyễn Thị Hạnh, 2007). Qua tìm hiểu cho thấy một số phương pháp có thời gian phân tích thường khá dài và các quy trình trên sau khi thực hiện đều cho thấy không phù hợp trên hệ thống máy HPLC tại phòng thí nghiệm. Vì thế, dựa trên các tài liệu tham khảo, nghiên cứu thăm dò được tiến hành nhằm tìm điều kiện sắc ký mới phù hợp hơn bằng cách thay đổi cột sắc ký và hệ dung môi pha động. Từ đó, quy trình định tính, định lượng cetirizine bằng HPLC đầu dò UV-Vis được đề nghị như sau:

Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký: Cột Gemini-NX C18 (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m); Hệ pha động: Dung dịch đệm KH_2PO_4 (pH 7) - acetonitril (58:42); Kiểu rửa giải: Đẳng môi (isocratic); Bước sóng phát hiện: 230 nm; Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút; Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L; Nhiệt độ: 25 $^{\circ}C$.

Điều kiện chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác khoảng 50 mg chuẩn cetirizine và cho vào bình định mức 50 mL, thêm khoảng 30

mL nước, siêu âm 5 phút, thêm nước vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 0,1 mL dung dịch này vào bình định mức 10 mL, thêm acetonitril đến vạch. Dung dịch được lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Điều kiện chuẩn bị mẫu thử

Cân 20 viên nén, tính khối lượng trung bình, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 10 mg hoạt chất cetirizine và cho vào bình định mức 25 mL, thêm 20 mL nước, siêu âm 5 phút, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều rồi lọc qua giấy lọc. Hút chính xác 0,25 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, thêm acetonitril đến vạch. Dung dịch được lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Hàm lượng cetirizine được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{S_T \times m_C \times C\% \times P \times 100}{S_C \times m_T \times 10} \quad (\%)$$

Trong đó:

- S_T (mAU*min) là diện tích peak cetirizine trong dung dịch thử.
- S_C (mAU*min) là diện tích peak cetirizine trong dung dịch chuẩn.
- m_C (mg) là khối lượng mẫu chuẩn đã cân.
- $C\%$ là hàm lượng chuẩn tinh khiết.
- P (mg) là khối lượng trung bình của 1 viên.
- 10 là lượng ghi nhãn của cetirizine trong một viên.

Thẩm định quy trình định lượng cetirizine

Quy trình được đánh giá theo hướng dẫn của các tài liệu tham khảo (Phạm Xuân Đà và *ctv.*, 2010), bằng việc khảo sát các chỉ tiêu sau đây: độ đặc hiệu, độ tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.

Sau đó, tiến hành kiểm nghiệm 03 mẫu viên nén chứa cetirizine 10 mg đang lưu hành trên thị trường.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Bước sóng hấp thụ cực đại của cetirizine

Phổ đồ UV-Vis cho thấy λ_{\max} của cetirizine là 230 nm. Từ đó, chọn bước sóng 230 nm là bước sóng để khảo sát cetirizine bằng phương pháp HPLC.

3.2 Quy trình định tính, định lượng cetirizine

3.2.1 Định tính

Với điều kiện đã chọn, tiến hành định tính hoạt chất cetirizine trong mẫu chuẩn và các mẫu thử dựa

vào thời gian lưu (t_R) của peak cetirizine trên sắc ký đồ.

Bảng 2: Kết quả định tính cetirizine bằng phương pháp HPLC/UV-Vis

Mẫu	t_R của peak dung môi (phút)	t_R của peak cetirizine (phút)
Chuẩn	3,83	7,72
I	3,25	7,75
D	3,83	7,83
S	3,47	7,75
Trung bình (TB)		$7,76 \pm 0,047$

Kết quả được trình bày trong Bảng 2 cho thấy mẫu chuẩn và thử có thời gian lưu giống nhau, giá trị t_R là $7,76 \pm 0,047$ phút; thời gian được rút ngắn rất nhiều so với quy trình định lượng mô tả trong Dược điển Anh với thời gian đến 40 phút (The British Pharmacopoeia Commission, 2015).

3.2.2 Thẩm định quy trình định lượng cetirizine

Kiểm tra tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm mẫu cetirizine chuẩn 6 lần vào hệ thống với điều kiện sắc ký đã chọn và ghi nhận sắc ký đồ. Kết quả Bảng 3 cho thấy thời gian lưu, diện tích đỉnh đều có $RSD < 2\%$; từ đó cho thấy quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 3: Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

Mẫu chuẩn	t_R (phút)	Diện tích peak (mAU*min)
1	7,39	1.286.956
2	7,30	1.344.427
3	7,21	1.331.902
4	7,21	1.322.838
5	7,19	1.349.166
6	7,42	1.341.166
TB	7,29	1.329.401,17
SD	0,09	22.828,74
RSD (%)	1,37%	1,72%

Độ đặc hiệu

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ đặc hiệu

Mẫu	t_R (phút)	Diện tích peak (mAU*min)
Chuẩn	7,01	1.093.271
Thử	6,81	939.469
Thử thêm chuẩn	6,78	1.570.806

*Nhận xét: Kết quả thể hiện qua Bảng 4 cho thấy quy trình có tính đặc hiệu cao

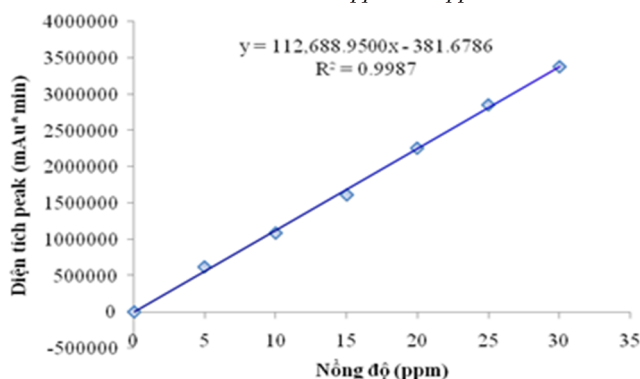
Tiến hành tiêm mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn vào hệ thống sắc ký. Kết quả cho thấy mẫu trắng không có peak trùng với peak cetirizine

chuẩn. Mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn có thời gian lưu giống nhau. Mẫu thử thêm chuẩn do nồng độ tăng lên nên có diện tích peak lớn hơn diện tích peak mẫu chuẩn. Kết quả được thể hiện qua Bảng 4.

Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị dãy chuẩn có nồng độ: 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm và 30 ppm; tiến hành phân tích với hệ thống HPLC.

Phương trình hồi quy tuyến tính là: $y = 112.688,95x - 381,68$ ($R^2 = 0,9987$). Kết quả được thể hiện trong Bảng 5 và Hình 1.



Hình 2: Đồ thị đường chuẩn của cetirizine

Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,67 ppm, giới hạn định lượng là 2,03 ppm.

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a} = \frac{3,3 \times 22.828,749}{112.688,950} = 0,67 \text{ ppm}$$

Bảng 5: Kết quả khảo sát độ tuyến tính

Mẫu	Nồng độ mẫu chuẩn (ppm)	Diện tích peak (mAU*min)
1	0	0
2	5	620.671
3	10	1.093.271
4	15	1.619.064
5	20	2.259.817
6	25	2.859.286
7	30	3.377.559

* Nhận xét: Với $R^2 = 0,9987$ nằm trong khoảng giới hạn $0,99 \leq R^2 \leq 1$ cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak trong khoảng nồng độ từ 5 ppm – 30 ppm

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a} = \frac{10 \times 22.828,749}{112.688,950} = 2,03 \text{ ppm}$$

Khảo sát độ lặp lại

Tiêm 6 mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình và tiêm vào hệ thống HPLC. Kết quả khảo sát độ lặp lại được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6: Kết quả khảo sát độ lặp lại quy trình định lượng cetirizine

Mẫu	Khối lượng cân mẫu thử (mg)	t_R (phút)	Diện tích peak (mAU*min)	Kết quả
1	125,30	6,57	854.220	n=6
2	125,31	6,57	855.409	$X_{TB} = 858.923$
3	125,34	6,75	856.321	$RSD = 0,49\%$
4	125,35	6,57	860.544	$P = 0,95 \rightarrow t = 2,57$
5	125,35	6,69	862.235	$e = \pm 4.439,47$
6	125,39	6,56	864.809	Khoảng tin cậy: $\mu = 858.923 \pm 4.439,47$

* Nhận xét: quy trình đạt độ lặp lại, với $RSD = 0,49\% < 2\%$

Quy trình nghiên cứu cho độ lặp lại cao hơn khi so sánh với các phương pháp trước đây của Jilenska *et al.* (2000) với RSD là 1,40% và Nguyễn Thị Hạnh (2007) với RSD là 1,10% và 1,20%.

3.2.3 Khảo sát độ đúng

Xác định tỷ lệ hồi phục (%) khi tính toán lượng chuẩn cần thêm vào mẫu thử với các tỷ lệ lần lượt

là 80%, 100%, 120%, mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần trong cùng điều kiện khảo sát. Kết quả được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7: Kết quả khảo sát độ đúng

Phép thử	% thêm vào	Diện tích peak (mAU*min)	m ^{chuẩn} theo lý thuyết (mg)	m ^{chuẩn} tìm thấy thực tế (mg)	Tỷ lệ hồi phục (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
1	80%	1.775.450	18	17,95	100,27	100,78	0,04
2		1.785.221	18	17,75	101,43		
3		1.778.629	18	17,89	100,63		
4	100%	1.979.369	20	20,04	99,82	100,63	0,15
5		2.013.144	20	19,79	101,05		
6		1.991.889	20	19,80	101,01		
7	120%	2.160.177	22	22,16	99,29	99,86	0,19
8		2.190.043	22	21,62	101,76		
9		2.149.673	22	22,33	98,54		
Trung bình tỷ lệ hồi phục (%)						100,42	

* Nhận xét: trong tất cả các lần thử RSD đều nhỏ hơn 2% và tỷ lệ hồi phục trung bình của phương pháp đạt 100,42% nằm trong giới hạn cho phép 98% - 102% nên phương pháp đạt độ đúng. Kết quả này cũng khá phù hợp khi so sánh với nghiên cứu của Nguyễn Thị Hạnh (2007) với tỷ lệ hồi phục là 99,6% và 99,8%

Kết quả định lượng 03 mẫu chế phẩm trên thị trường

Sau khi thẩm định quy trình, tiến hành định lượng cetirizine trong 03 mẫu thuốc viên nén trên thị trường bằng cách tiêm 03 mẫu thử viên nén

cetirizine được chuẩn bị theo quy trình vào hệ thống HPLC đã chọn và ghi nhận các giá trị. Sử dụng diện tích peak sắc ký của dung dịch cetirizine chuẩn 10 ppm để tính toán với S_{peak} chuẩn = 1.093.271 (mAU*min). Kết quả được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8: Kết quả định lượng 03 mẫu thuốc viên nén cetirizine trên thị trường

Mẫu	Phép thử	Lượng cân (mg)	Diện tích peak (mAU*min)	Hàm lượng (%)	Trung bình (%)
I	1	164,96	1.121.781	102,47	102,51
	2	164,97	1.122.582	102,54	
D	1	185,08	1.048.621	95,76	94,29
	2	185,06	1.016.204	92,81	
S	1	144,20	1.197.360	109,32	104,17
	2	144,01	1.083.073	99,02	

* Nhận xét: Cả 03 chế phẩm (ký hiệu lần lượt là I, D, S) có hàm lượng cetirizine nằm trong khoảng giới hạn cho phép về quy định hàm lượng cho thuốc viên nén là 90% - 110% theo quy định của Dược điển Việt Nam IV

4 KẾT LUẬN

Đã thẩm định quy trình định lượng cetirizine bằng phương pháp HPLC với đầu dò UV-Vis. Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng, khảo sát được tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp. Điều này chứng tỏ đây là quy trình phù hợp để định lượng cetirizine trong các dược phẩm.

Trên cơ sở đó, quy trình trên được áp dụng để định lượng cetirizine trong 03 mẫu thuốc viên nén trên thị trường thành phố Cần Thơ và tất cả mẫu dược phẩm đều đạt yêu cầu về hàm lượng theo quy định của Dược điển Việt Nam IV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Y tế, (2007). Dược Thư Quốc gia Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. Trang 29.

British Pharmacopoeia Commission, 2015. The British Pharmacopoeia IV-Monograph of Cetirizine. The Stationery Office.

Phạm Xuân Đà, 2010. Thẩm định phương pháp phân tích trong hóa học và vi sinh vật. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội, 102 trang.

Hội đồng Dược điển, 2009. Dược điển Việt Nam IV. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội. Trang 75.

Nguyễn Thị Hạnh, 2007. Nghiên cứu định lượng cetirizine trong chế phẩm rắn phân liều bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ Đại học - Đại học Dược Hà Nội.

Jilenska, A., Stanisz, B., Zajac, M., Musial, W., Ostrowicz, A., 2000. Determination of Cetirizine dichloride in tablets by HPLC method. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 57 (3), 171-173.