

Định lượng Diltiazem Hydrochlorid trong viên nén Diltiazem giải phóng theo nhịp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Nguyễn Văn Bạch**; *Vũ Tùng Lâm***; *Võ Xuân Minh***
*Phạm Thị Minh Huệ***; *Phạm Thị Phương Anh***

TÓM TẮT

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) là phương pháp có độ chính xác, độ nhạy cao và tiến hành đơn giản, được sử dụng để định lượng diltiazem hydrochlorid trong viên nén giải phóng theo nhịp (GPTN). Chương trình sắc ký gồm cột C18 với pha động là methanol: dung dịch đệm phosphat 0,05 M; pH 4,5 (60:40). Phương pháp có khoảng tuyến tính tại nồng độ từ 6 - 16 µg/ml, độ chính xác và độ lặp lại cao. Các tá dược trong viên nén không ảnh hưởng đến phương pháp phân tích.

* Từ khóa: Diltiazem; Định lượng viên nén; Viên nén giải phóng theo nhịp; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Determination of Diltiazem Hydrochlorid in Diltiazem pulsatile release tablets by hplc method

SUMMARY

A simple, sensitive and accurate high-performance liquid chromatographic method (HPLC) is presented for quantitative determination of diltiazem in tablets. The samples were chromatographed on C18 column and the mobile phase was 0.05 M phosphat buffer pH 4.5 - methanol (60:40, v/v). The method was linear between 6 - 16 µg/ml. It was also found that the excipients in the commercial tablets did not interfere with the method.

** Key words: Diltiazem; Quantitative analysis; Pulsatile release tablets; HPLC.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Diltiazem là thuốc có tác dụng ức chế dòng canxi ở màng tế bào cơ tim và cơ trơn mạch máu. Do đó, làm giảm nồng độ canxi trong tế bào, làm giãn động mạch vành, mạch ngoại vi, làm chậm nhịp tim, giảm co

bóp cơ tim và chậm dẫn truyền nút nhĩ thất. Diltiazem được sử dụng trong điều trị đau thắt ngực và tăng huyết áp [1]. Theo dược lý học thời khắc, các chế phẩm GPTN mang lại nhiều thuận lợi cho bệnh nhân và có hiệu quả điều trị cao. Để tiêu chuẩn hoá chất lượng của chế phẩm, cần phải xác định hàm

* Học viện Quân y

** Đại học Dược Hà Nội

Phân biện khoa học: PGS. Phan Trọng Khoa

lượng của dược chất trên trong viên nén GPTN. Vì vậy, chúng tôi ứng dụng phương pháp HPLC của dược điển Anh và Mỹ [2, 3] để định lượng diltiazem trong viên nén GPTN.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu và thiết bị nghiên cứu.

* *Hoá chất và nguyên liệu:*

- Methanol loại dùng cho HPLC.
- Kali dihydrophosphat tinh khiết phân tích (PA).
- Nước cất loại tinh khiết (dùng cho HPLC).
- Chất chuẩn quốc gia: diltiazem hydrochlorid (Viện Kiểm nghiệm Thuốc TW cung cấp).
- Viên nén diltiazem GPTN 60 mg (tự bào chế) gồm: diltiazem hydrochlorid (60 mg), lactose, L-HPC, EC, HPMC.

* *Thiết bị, dụng cụ:*

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu 10A-VP (Nhật Bản) với detector UV, cột Symmetry C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm).
- Cân phân tích Mettler với độ chính xác 0,1 mg (Thụy Sĩ).
- Máy lắc siêu âm Branson 5210 (Mỹ).
- Màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,45 µm.
- Các dụng cụ thuỷ tinh chính xác.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Điều kiện sắc ký:*

- Pha tĩnh: cột Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm).
- Nhiệt độ cột: 25°C.

- Pha động: methanol: dung dịch đệm phosphat 0,05M; pH 4,5 (60:40).

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

- Detector UV: 236 nm.

- Thể tích tiêm: 20 µl.

* *Phương pháp xử lý mẫu:*

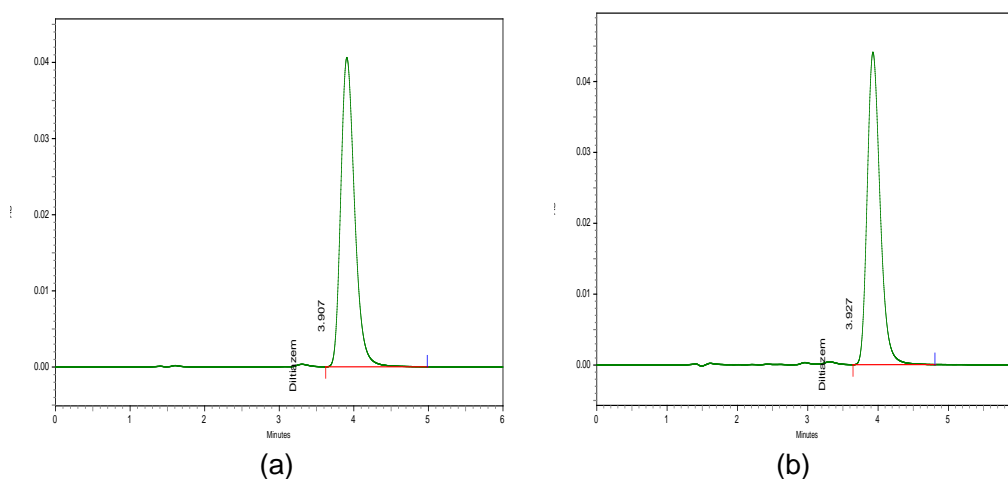
- Mẫu chuẩn: cân chính xác 50,0 mg diltiazem hydrochlorid chuẩn cho vào bình định mức 50 ml. Thêm MeOH vừa đủ đến vạch, lọc. Hút chính xác 2 ml dịch lọc cho vào bình định mức 200 ml, thêm dung dịch pha động đến vạch. Lắc đều thu được dung dịch có nồng độ khoảng 10 µg/ml. Lọc dung dịch trên qua màng lọc 0,45 µm và tiêm 20 µl vào cột HPLC.

- Mẫu thử: cân chính xác một lượng bột viên đã nghiền mịn tương đương khoảng 50,0 mg diltiazem cho vào bình định mức 50 ml. Thêm 20 ml MeOH, lắc siêu âm 20 phút. Tiếp tục thêm MeOH vừa đủ đến vạch, lọc. Hút chính xác 2 ml dịch lọc cho vào bình định mức 200 ml, thêm dung dịch pha động đến vạch. Lắc đều và thu được dung dịch có nồng độ khoảng 10 µg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm và tiêm 20 µl vào cột HPLC trong cùng điều kiện với dung dịch chuẩn.

- Tiến hành sắc ký với các điều kiện đã nêu, ghi lại sắc ký đồ. Từ diện tích pic của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, lượng cân của chế phẩm, độ pha loãng và nồng độ của diltiazemhydrochlorid trong dung dịch chuẩn để tính hàm lượng diltiazem hydrochlor trong viên nén GPTN.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Với điều kiện sắc ký đã chọn, pic diltiazem có hình dạng cân đối. Thời gian mỗi lần phân tích phù hợp (khoảng 6 phút). Sắc ký đồ của diltiazem trong mẫu chuẩn và trong mẫu thử được ghi ở hình 1.



Hình 1: Sắc ký đồ của diltiazem trong dung dịch chuẩn (a) và trong dung dịch thử (b).

1. Khảo sát độ tương thích của hệ thống sắc ký.

Khảo sát độ tương thích của hệ thống bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ 10 µg/ml và ghi lại giá trị về thời gian lưu (TR), diện tích pic, hệ số bất đối xứng, số đĩa lý thuyết.

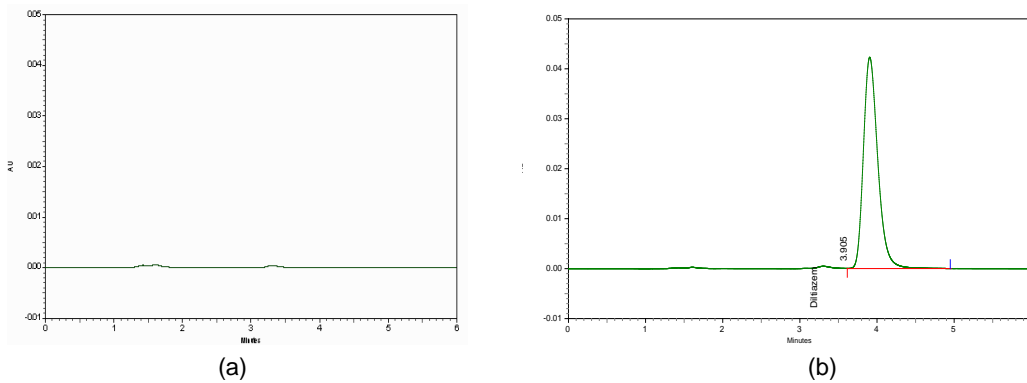
Bảng 1: Kết quả khảo sát độ tương thích của hệ thống sắc ký.

STT	THÔNG SỐ	GIÁ TRỊ
1	Thời gian lưu TR (phút)	3,896
2	RSD của thời gian lưu (%)	0,15
3	RSD của diện tích pic (%)	0,09
4	Số đĩa lý thuyết	2184
5	Hệ số bất đối xứng	1,286

Số liệu thu được cho thấy: hệ thống sắc ký trên phù hợp với phân tích định tính và định lượng diltiazem trong viên nén.

2. Khảo sát độ đặc hiệu của phương pháp.

Mục đích nhằm chứng minh sự có mặt của tá dược và dung môi pha động không ảnh hưởng đến phương pháp phân tích. Chúng tôi khảo sát trên mẫu tự tạo gồm mẫu diltiazem thử và mẫu tá dược (mẫu trắng) giống như công thức viên.



Hình 2: Sắc ký đồ của hỗn hợp tá dược (a) và của dung dịch thử (b).

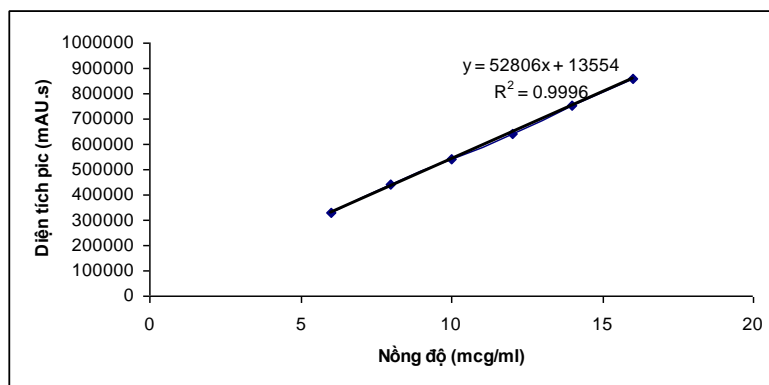
Sắc ký đồ của mẫu trắng không thấy xuất hiện pic lạ trong thời gian phân tích. Trong mẫu thử, pic của diltiazem xuất hiện sau 3,896 phút. Tại vị trí pic của diltiazem, không thấy xuất hiện pic lạ. Điều đó chứng tỏ tá dược và dung môi pha động không làm ảnh hưởng đến kết quả định lượng.

Khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ diltiazem hydrochlorid bằng cách pha một dãy dung dịch diltiazem hydrochlorid chuẩn có nồng độ từ 6 - 16 µg/ml. Tiến hành sắc ký theo như các điều kiện đã nêu.

3. Khảo sát độ tuyến tính của phương pháp.

Bảng 2: Kết quả khảo sát độ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic.

Dung dịch	1	2	3	4	5	6
Nồng độ (µg/ml)	6	8	10	12	14	16
Diện tích pic (mAU.s)	329.020	441.921	538.297	643.143	754.102	860.024
Kết quả	Phương trình hồi quy: $Y = 52806; X + 13554$ Hệ số tương quan tuyến tính: $R^2 = 0,9996$					



Hình 3: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích pic và nồng độ diltiazem hydrochlorid.

Trong khoảng nồng độ khảo sát có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ diltiazem hydrochlorid với hệ số tương quan 0,9996 (≈ 1). Trên cơ sở đó, lựa chọn nồng độ để định lượng diltiazem hydrochlorid trong chế phẩm khoảng 10 $\mu\text{g/ml}$.

4. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp.

Tiến hành khảo sát độ lặp lại của phương pháp đối với mẫu viên nén diltiazem GPTN 60 mg. Độ lặp lại được đánh giá dựa trên độ lặp lại của 6 thí nghiệm riêng biệt.

Bảng 3: Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp.

STT	LƯỢNG CÂN (g)	DIỆN TÍCH PIC (mAU.s)	HÀM LƯỢNG (%)	CÁC SỐ LIỆU THỐNG KÊ (n = 6; p = 0,95; α = 2,571)
1	0,1897	546.720	100,16	$\bar{X} = 100,7\%$ SD = 0,37% RSD = 0,36%
2	0,1956	566.255	100,61	
3	0,1971	571.131	100,70	
4	0,1901	549.959	100,54	
5	0,1930	561.891	101,18	
6	0,1936	562.773	101,03	

Với chương trình sắc ký đã chọn, phương pháp định lượng diltiazem hydrochlorid có độ chính xác cao, độ lệch chuẩn tương đối 0,36%. Kết quả này đạt tiêu chuẩn kiểm nghiệm quy định (độ lệch chuẩn tương đối phải < 2%).

5. Khảo sát độ đúng của phương pháp.

Sau khi xác định lượng diltiazem hydrochlorid trong viên nén, tiến hành xác định độ đúng bằng phương pháp thêm chuẩn. Thêm một lượng diltiazem hydrochlorid chuẩn khoảng 10 mg vào mẫu thử sao cho nồng độ vẫn nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát.

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp.

STT	LƯỢNG THÊM VÀO (mg)	DIỆN TÍCH PIC CỦA MẪU THỬ (mAU.s)	DIỆN TÍCH PIC MẪU THỬ + CHUẨN (mAU.s)	LƯỢNG TÌM THẤY (mg)	TỶ LỆ TÌM THẤY (%)	CÁC SỐ LIỆU THỐNG KÊ (n = 6; p = 0,95; α = 2,571)
1	10,14	430.788	540.034	10,19	100,5	$\bar{X} = 100,45\%$ SD = 0,53% RSD = 0,53%
2	10,14	450.004	560.969	10,27	101,3	
3	10,14	441.885	550.969	10,18	100,4	
4	10,14	447.098	555.504	10,12	99,8	
5	10,14	448.953	558.422	10,21	100,7	
6	10,14	445.497	554.187	10,14	100,0	

Phương pháp có tỷ lệ tìm lại là 100,45%; độ lệch chuẩn tương đối 0,53% (< 2), chứng tỏ phương pháp có độ đúng cao.

KẾT LUẬN

Chương trình HPLC mà chúng tôi xây dựng cho phép xác định hàm lượng diltiazem hydrochlorid trong viên nén. Phương pháp có khoảng tuyến tính thích hợp, độ đúng và độ lặp lại cao, cho kết quả đáng tin cậy. Phương pháp tiến hành đơn giản, nhanh chóng, thuận tiện và phù hợp với thiết bị hiện có tại các cơ sở kiểm nghiệm thuốc ở nước ta. Phương pháp trên có khả năng áp dụng để xác định hàm lượng diltiazem hydrochlorid trong viên nén nói chung và viên nén GPTN nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Dược thư quốc gia*. NXB Y học. Hà Nội. 2002.
2. *BP 2007 (CD-ROM)*. Monograph: diltiazem hydrochlorid.
3. *USP 30 NF 25 (CD-ROM)*. Monograph: diltiazem hydrochlorid. 2007.