

Định lượng đồng thời bromhexin hydrochlorid và salbutamol sulphat trong siro bằng phương pháp quang phổ đạo hàm

Nguyễn Thị Ngọc Yến, Đinh Minh Nguyên, Dương Đình Chung*

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

*ddchung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, phương pháp quang phổ đã được sử dụng để xác định đồng thời bromhexin hydrochlorid và salbutamol sulfat trong siro thuốc. Nghiên cứu được thực hiện bằng cách biến đổi quang phổ hấp thụ UV của bromhexin và salbutamol sử dụng đạo hàm bậc hai. Kết quả phổ đạo hàm bậc hai cho thấy độ hấp thụ bằng 0 ở bước sóng 240,4nm và 365,4nm lần lượt cho bromhexin và salbutamol. Do đó, định lượng bromhexin ở bước sóng 365,4nm và salbutamol ở bước sóng 240,4nm. Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH. Các đường cong tuyến tính thu được bằng phương pháp quang phổ đạo hàm bậc hai cho thấy độ tuyến tính trong khoảng nồng độ 20 – 80µg/ml cho bromhexin và 10 – 40µg/ml cho salbutamol với độ nhạy tương ứng là 0,141µg/ml và 0,369µg/ml. Kết quả độ phục hồi, độ chính xác tốt cho cả bromhexin và salbutamol. Giá trị phân tích trong ngày có độ đúng từ 98,57 – 99,86%, RSD của độ lặp lại từ 0,25 – 0,94%. Giá trị phân tích khác ngày cho độ đúng từ 99,80 – 101,50% và RSD của độ lặp lại từ 0,15 – 0,66%. Thử nghiệm cho thấy phương pháp này phù hợp để phân tích thường qui bromhexin và salbutamol ở dạng kết hợp trong siro thuốc.

Nhận 15.07.2019
Được duyệt 19.08.2019
Công bố 20.09.2019

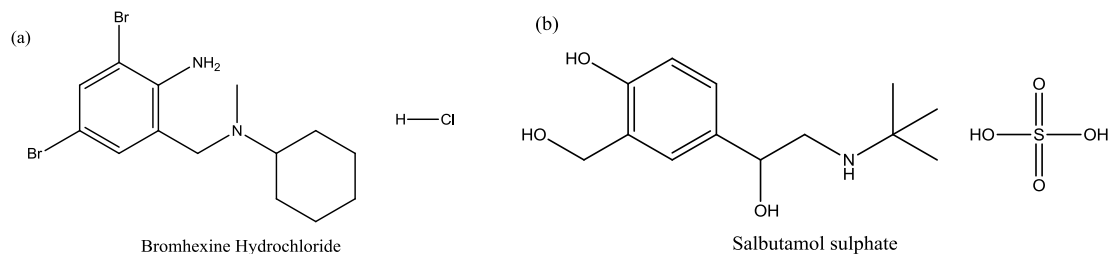
Từ khóa
salbutamol, bromhexin,
quang phổ đạo hàm

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Bromhexin hydrochlorid (Hình 1a) có tên hóa học là trans-4 - ((2-amino-3, 5-dibromobenzyl) amino) cyclohexanol hydrochlorid[1]. Trên lâm sàng, bromhexin tăng cường vận chuyển chất nhầy bằng cách giảm độ nhầy dính của chất nhầy và kích hoạt biểu mô có lông chuyển giúp long đàm. Salbutamol sulphat, được gọi là bis [(1RS) -2 - [(1, 1-

dimethylethyl) amino] -1- [4- hydroxy-3- (hydroxymethyl) phenyl] ethanol] sulphate (Hình 1b), là chất chủ vận β -adrenoceptor được sử dụng để làm giảm co thắt phế quản trong các tình trạng như hen suyễn hay bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính. Kết hợp bromhexin và salbutamol được sử dụng để điều trị hen suyễn và viêm phế quản[2].



Hình 1 Công thức cấu tạo: (a) Bromhexin hydrochlorid, (b) Salbutamol sulfat

Các tài liệu nghiên cứu về sự kết hợp giữa salbutamol hoặc bromhexin với các thuốc khác đã thực hiện định lượng các hoạt chất này bằng phương pháp quang phổ tử ngoại[3-7],

RP-HPLC[3,8,9]. Tuy nhiên, cho đến nay, Việt Nam chưa có tác giả nào công bố qui trình định lượng đồng thời bromhexin và salbutamol bằng ứng dụng đạo hàm trong

phương pháp quang phổ. Vì vậy, đề tài xây dựng và thẩm định qui trình định lượng bromhexin và salbutamol bằng phương pháp quang phổ đạo hàm nhằm đóng góp thêm một phương pháp để phân tích, để kiểm soát chất lượng trong nguyên liệu/sản phẩm thành phẩm chứa đồng thời 2 hoạt chất này.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng

Siro thuốc có hàm lượng 2mg salbutamol sulfat và 4mg bromhexin hydrochlorid trong mỗi đơn vị chia liều (5ml).

2.2 Thiết bị và vật liệu

Hệ thống máy quang phổ UV 1800, sử dụng phần mềm UVProbe phiên bản 2.6.1 (Shimadzu – Nhật Bản), máy khử ion Arium® pro (Sartorius – Đức), máy đo pH S220K và cân phân tích MS105DU 0,01 mg (Metler Toledo – Thụy Sĩ), máy sắc kí lỏng hiệu năng cao (Agilent 1260-Mĩ).

Methanol (Merck – Đức), acid hydrochloric và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích. Chất chuẩn bromhexin, salbutamol do Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.HCM cung cấp.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Chuẩn bị các dung dịch

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan các chất chuẩn bromhexin và salbutamol trong methanol để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ lần lượt là 800µg/ml và 400µg/ml.

Mẫu chuẩn: Thực hiện pha loãng dung dịch chuẩn gốc trong acid HCl 0,1N để có được dãy nồng độ từ 10 – 40µg/ml cho salbutamol và 20 – 80µg/ml cho bromhexin, các dung dịch chuẩn được sử dụng trong ngày.

Mẫu thử: Lấy chính xác 5ml siro thuốc chuyển vào bình định mức 100ml, thêm 20ml dung dịch methanol và 50ml acid HCl 0,1N, siêu âm 10 phút, bổ sung thêm acid HCl 0,1N đến vạch. Lọc bỏ dịch lọc đầu, dịch lọc sử dụng để quét phổ với bước sóng từ 210 – 370nm.

2.3.2 Xác định phổ đạo hàm

Tiến hành ghi phổ hấp thụ lần lượt các dung dịch chuẩn bromhexin và salbutamol trong vùng bước sóng từ 210 – 400nm. Thực hiện biến đổi phổ hấp thụ phân tử của các dung dịch chuẩn bromhexin và salbutamol (đạo hàm bậc 2, $\Delta\lambda = 16\text{nm}$ và hệ số Scaling Factor = 1.000), tìm bước sóng đo thích hợp mà tại đó giá trị phổ đạo hàm của chất bromhexin khác 0, còn giá trị phổ đạo hàm của salbutamol bằng 0 và ngược lại. Sau khi xác định được bước sóng phù hợp, tiến hành định lượng các hoạt chất theo phương pháp đường chuẩn.

2.3.4 Thẩm định phương pháp

Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH[10]. Các chỉ tiêu thẩm định tính chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại trong ngày, độ lặp lại khác ngày, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng dưới (LOQ).

2.3.5 Phương pháp HPLC

Máy HPLC Agilent 1260 (Mĩ), đầu dò DAD, bước sóng phát hiện 225nm, nhiệt độ cột 40°C, thể tích tiêm mẫu 10µl. Cột sắc kí C18 (250mm x 4,6mm; 5µm) với tiền cột tương ứng. Pha động rửa giải đẳng dòng với tỉ lệ 62% methanol và 38% nước chứa 0,2% acid phosphoric (62:38, v/v) với tốc độ dòng 0,9ml/phút.

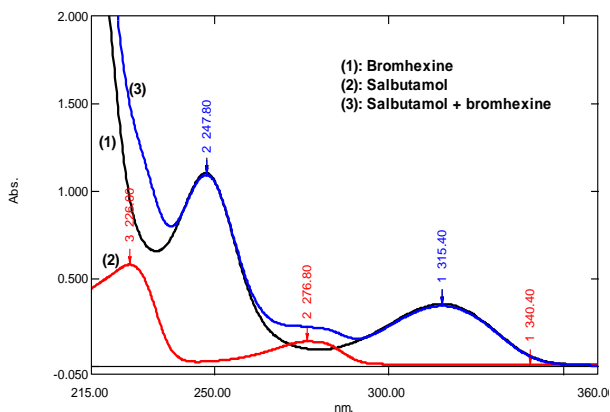
2.3.6 Xử lí số liệu

Số liệu thí nghiệm được nhập và xử lí bằng thuật toán thống kê ANOVA trên phần mềm Microsoft Office Excel. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Kiểm định các giá trị bằng t-test Student. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$.

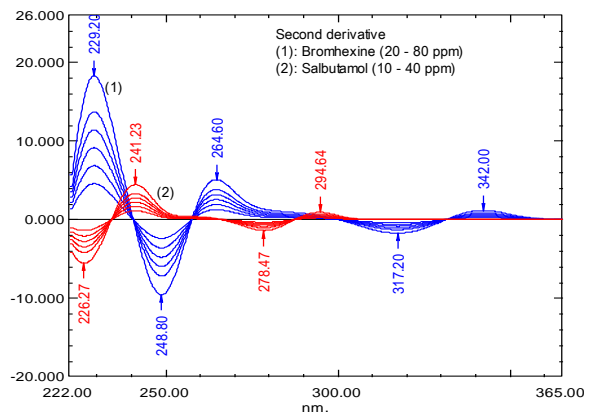
3 Kết quả và bàn luận

3.1 Phổ hấp thụ và phổ đạo hàm của bromhexin và salbutamol

Quét phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn salbutamol 10 – 40µg/ml và bromhexin 20 – 80µg/ml (tốc độ quét trung bình, cứ 0,2nm ghi nhận 1 giá trị). Sử dụng phần mềm UV Probe biến đổi phổ hấp thụ thành phổ đạo hàm bậc 2 ($\Delta\lambda = 16\text{nm}$ và hệ số Scaling Factor = 1000). Kết quả thể hiện ở Hình 2 và Hình 3.



Hình 2 Phổ hấp thụ phân tử trong acid HCl 0,1N: bromhexin 40µg/ml (1), salbutamol 20µg/ml (2) và (3) hỗn hợp bromhexin 40µg/ml và salbutamol 20µg/ml.



Hình 3 Phổ đạo hàm bậc 2 của dung dịch chuẩn bromhexin 20 – 80µg/ml (1) và salbutamol 10 – 40µg/ml (2).

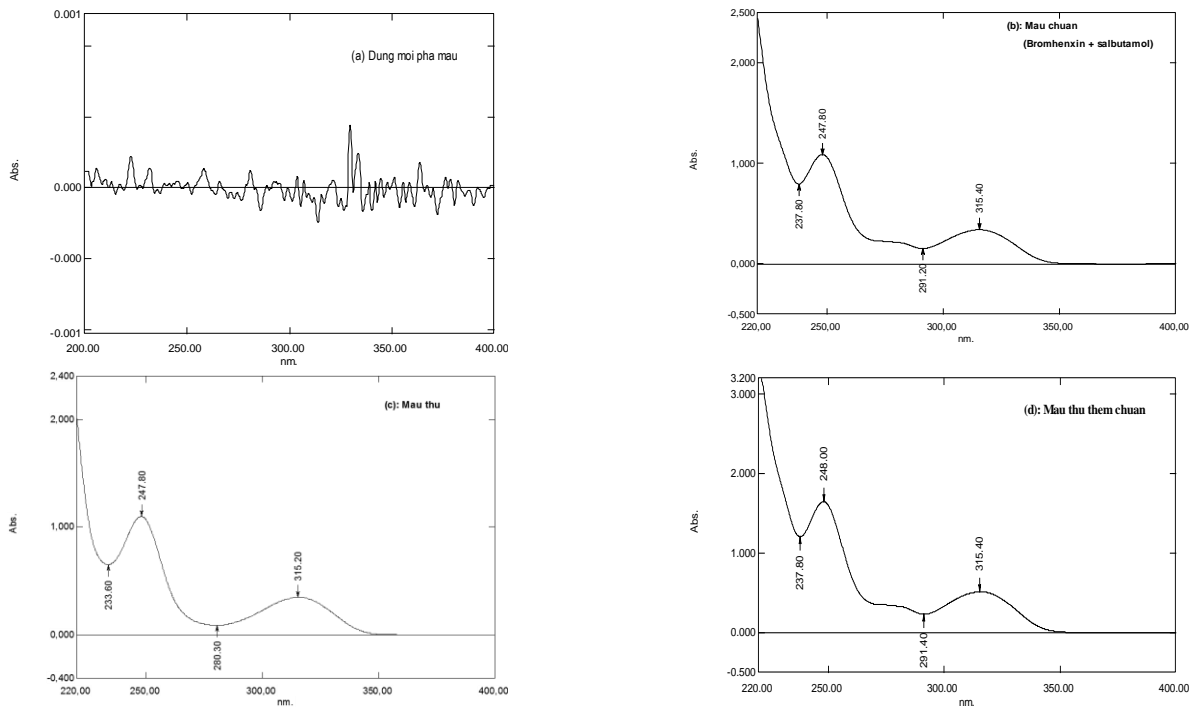
Nhận xét: Kết quả (Hình 2) cho thấy phổ hấp thụ phân tử của các dung dịch chuẩn bromhexin và salbutamol xen phủ nhau trong khoảng bước sóng 215 – 360nm. Phổ đạo hàm bậc 2 (Hình 3) của salbutamol bằng 0 tại các bước sóng 234,2nm, 265,4nm và vùng sóng 300 – 365nm. Do đó, có thể chọn các đỉnh 234,2nm, 265,4nm, 317,2nm, 342nm và 365,4nm để làm bước sóng định lượng bromhexin. Ngược lại, có thể định lượng salbutamol tại bước sóng 240,4nm vì tại đây giá trị đạo hàm bậc 2 của bromhexin bằng 0. Xây dựng đường biểu diễn giữa nồng độ bromhexin và giá trị đạo hàm tại 4 bước sóng lựa

chọn, tính lại nồng độ theo các đường chuẩn đã lập, phân tích ANOVA giá trị cho thấy ($P < 0,05$) khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, cặp bước sóng 365,4nm và 240,4nm được lựa chọn cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1 Độ chọn lọc

Tiến hành quét phổ các dung dịch: dung môi pha mẫu, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn từ bước sóng 210 – 400nm (tốc độ quét trung bình, khoảng bước sóng ghi nhận 0,2nm cho mỗi giá trị). Kết quả được trình bày trong Hình 4.



Hình 4 Phổ hấp thụ: bromhexin: (a) dung môi, (b) mẫu chuẩn, (c) mẫu thử, (d) mẫu thử thêm chuẩn

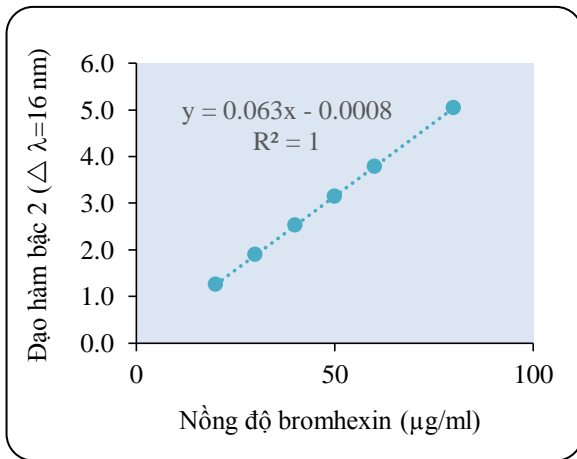
Nhận xét: Kết quả trên phổ hấp thụ của dung dịch mẫu thử (Hình 4c) có các đỉnh cực trị hấp thụ trùng với mẫu chuẩn (Hình 4b). Khi thêm dung dịch chuẩn vào mẫu thử, quét phổ thấy giá trị độ hấp thụ tăng thêm (Hình 4d). Tuy nhiên, các giá trị cực trị hấp thụ không khác so với mẫu chuẩn và mẫu thử ($P < 0,05$). Trong khi đó, trong dung môi pha mẫu (Hình 4a) không thấy xuất hiện độ hấp thụ tại vùng sóng khảo sát. Do vậy, khi thực hiện biến đổi đạo hàm từ phổ hấp thụ sẽ thu được phổ biến đổi có tính chọn lọc cho bromhexin và salbutamol.

3.2.2 Độ lặp lại, độ đúng, khoảng tuyến tính và LOD, LOQ

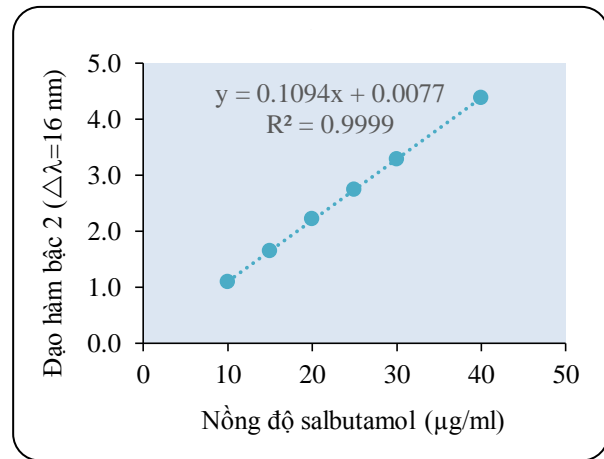
Độ tuyến tính được xây dựng trong khoảng nồng độ bromhexin từ 20 – 80 $\mu\text{g/ml}$ và salbutamol từ 10 – 40 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành quét phổ, lấy đạo hàm bậc 2. Từ dữ liệu phân tích thiết lập mối tương quan giữa nồng độ và giá trị đạo hàm bậc 2. Dựa vào độ lệch chuẩn của đáp ứng với độ dốc của phương trình hồi qui tuyến tính, kết luận giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng dưới (LOQ) của bromhexin lần lượt là 0,141 $\mu\text{g/ml}$ và 0,466 $\mu\text{g/ml}$; salbutamol lần lượt là 0,369 $\mu\text{g/ml}$ và 1,218 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1, Hình 5 và Hình 6.

Bảng 1 Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính và LOD, LOQ

Phương pháp	Bromhexin	Salbutamol
Khoảng tuyến tính	20 – 80 ($\mu\text{g/ml}$)	10 – 40 ($\mu\text{g/ml}$)
Phương trình hồi qui ($y = ax+b$)	$y = 0,063x - 0,0008$	$y = 0,1094x + 0,0078$
Hệ số a	0,0630	0,1094
Hệ số b	-0,0008	0,0078
Hệ số tương quan R ²	1,0	0,9999
Độ lệch chuẩn (SD)	0,0027	0,0122
Giới hạn phát hiện (LOD)	0,141 ($\mu\text{g/ml}$)	0,369 ($\mu\text{g/ml}$)
Giới hạn định lượng (LOQ)	0,466 ($\mu\text{g/ml}$)	1,218 ($\mu\text{g/ml}$)



Hình 5 Đồ thị thể hiện tính tuyến tính của bromhexin 20 – 80µg/ml



Hình 6: Đồ thị thể hiện tính tuyến tính của salbutamol 10 – 40µg/ml

Độ đúng và độ chính xác trong ngày và khác ngày của phương pháp phân tích được xác định bằng các phương pháp thêm chuẩn. Trong nghiên cứu, chuẩn bị 9 mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 10%, 20% và 30% tương ứng là 4µg/ml, 8µg/ml và 12µg/ml so với mức nồng độ định lượng (40µg/ml) của bromhexin và 2µg/ml, 4µg/ml và 6µg/ml so với mức nồng độ định lượng (20µg/ml) của salbutamol. Độ đúng và độ chính xác của phương pháp phân tích là tỉ lệ % (Rev) và giá trị độ lệch chuẩn tương đối

(RSD) giữa lượng hoạt chất tìm được so với lượng thêm vào. Công thức tính tỉ lệ phục hồi (1). Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

$$\text{Tỉ lệ phục hồi (\%)} = \frac{(x_2 - x_0)}{x_1} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: x_0 là nồng độ chất phân tích trong mẫu; x_1 là nồng độ chất phân tích thêm chuẩn vào mẫu; x_2 là nồng độ tìm lại chất phân tích trong mẫu đã thêm chuẩn.

Bảng 2 Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày

Thuốc	Nồng độ mẫu thử	Nồng độ thêm vào	Trong ngày (n=9)			Khác ngày (n=18)		
	(µg/ml)	(µg/ml)	Rev (%)	SD	% RSD	Rev (%)	SD	% RSD
Salbutamol	19,53	2	99,44	0,014	0,25	99,88	0,097	0,15
		4	98,68	0,007	0,57	101,50	0,299	0,66
		6	99,25	0,013	0,94	101,60	0,197	0,32
Bromhexin	40,10	4	99,57	0,003	0,27	99,79	0,257	0,41
		8	98,57	0,002	0,85	99,80	0,154	0,20
		12	99,86	0,003	0,88	100,33	0,126	0,18

Nhận xét: Phương pháp có độ đúng, độ chính xác tốt cho cả bromhexin và salbutamol. Giá trị phân tích trong ngày (n = 9) có độ đúng từ 98,57 – 99,86%, RSD độ lặp lại từ 0,25 – 0,94%. Giá trị phân tích khác ngày (n = 18) cho độ đúng từ 99,80 – 101,50% và RSD độ lặp lại từ 0,15 – 0,66%. Thực nghiệm cho thấy sự phục hồi của bromhexin và salbutamol ở mỗi cấp độ được tìm thấy nằm trong giới hạn yêu cầu 98 – 102%; RSD < 2% [10].

Kết luận: Kết quả thẩm định cho thấy qui trình định lượng bromhexin và salbutamol trong siro thuốc bằng phương

pháp quang phổ đạo hàm đạt tất cả các yêu cầu về độ chọn lọc, tính tuyến tính – khoảng xác định, độ chính xác và độ đúng, giới hạn định lượng theo qui định của ICH.

3.3 Kết quả định lượng bromhexin và salbutamol trong siro Salmodil Expectorant®

Tiến hành định lượng 6 mẫu trong chế phẩm thuốc bằng qui trình phân tích đã xây dựng song song với qui trình định lượng bằng phương pháp sắc kí lỏng. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3 Kết quả định lượng siro Salmodil Expectorant®

STT	Hàm lượng bromhexin ($\mu\text{g/ml}$)		Phân tích ANOVA	Hàm lượng salbutamol ($\mu\text{g/ml}$)		Phân tích ANOVA
	Phương pháp để xuất	Phương pháp HPLC		Phương pháp để xuất	Phương pháp HPLC	
1	3,926	3,895	F-test < F_{α} (1,55 < 4,96); P = 0,240; Df = 10	1,926	1,957	F-test < F_{α} (4,37 < 5,17); P = 0,069; Df = 10
2	3,886	3,985		1,945	1,958	
3	3,929	3,806		1,946	1,958	
4	4,060	3,919		1,952	1,952	
5	3,943	3,901		1,954	1,952	
6	3,983	3,911		1,957	1,958	
TB	3,954	3,919		1,947	1,956	
SD	0,060	0,033		0,011	0,003	
RSD	1,53	0,84		0,56	0,15	

Bảng 3 cho thấy hàm lượng của bromhexin và salbutamol đạt yêu cầu mức chất lượng qui định trong Dược điển Việt Nam V. Theo kết quả phân tích ANOVA, hàm lượng bromhexin và salbutamol so với hàm lượng ghi trên nhãn được định lượng bằng 2 phương pháp: (i) phương pháp mới xây dựng và (ii) phương pháp HPLC cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mức độ tin cậy 95%.

4 Kết luận

Đề tài nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng bromhexin và salbutamol trong siro thuốc bằng phương pháp quang phổ đạo hàm. Phương pháp đã được

thẩm định với các thông số theo hướng dẫn của ICH và đạt yêu cầu. Phương pháp có độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày với độ lệch chuẩn tương đối đều <2%. Phương pháp có độ đúng từ 99,25 – 99,86% trong khoảng tuyến tính từ 20 – 80 $\mu\text{g/ml}$ cho bromhexin và từ 10 – 40 $\mu\text{g/ml}$ cho salbutamol.

Quy trình đã được ứng dụng để xác định hàm lượng bromhexin và salbutamol trong siro, kết quả đạt yêu cầu hàm lượng theo qui định của Dược điển Việt Nam V.

Từ kết quả đạt được, đề tài có thể được phát triển để áp dụng trong việc kiểm soát hàm lượng của chế phẩm siro thuốc chứa bromhexin và salbutamol.

Tài liệu tham khảo

- Bộ Y Tế, *Dược điển Việt Nam V*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 2017: tr. 163-164, 852-855.
- Bộ Y tế, *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y Học, 2017: tr. 269, 1262.
- Chitlange, S.S., K.K. Chaturvedi, and S.B. Wankhede, Development and validation of spectrophotometric and HPLC method for the simultaneous estimation of salbutamol sulphate and prednisolone in tablet dosage form. *J Anal Bioanal Techniques*, 2011. 2(117): pp. 2.
- Tantishaiyakul, V., et al., Simultaneous determination of dextromethorphan HBr and bromhexine HCl in tablets by first-derivative spectrophotometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1998. 17(2): pp. 237-243.
- Narayana, A., C.N. Rao, and K. Sivakumar, Spectrophotometric Determination of Bromhexine Using Charge Transfer Complex Reaction. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, 2015. 3(2): p. 128-132.
- Kalyani, L. and C.V. Rao, Simultaneous spectrophotometric estimation of Salbutamol, Theophylline and Ambroxol three component tablet formulation using simultaneous equation methods. *Karbala International Journal of Modern Science*, 2018. 4(1): p. 171-179.
- Dave, H., R. Mashru, and A. Thakkar, Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 2007. 597(1): p. 113-120.
- Pai, P.S., et al., Simultaneous determination of salbutamol sulphate and bromhexine hydrochloride in tablets by reverse phase liquid chromatography. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 2009. 71(1): pp. 53.
- Njaria, P.M., et al., A versatile HPLC method for the simultaneous determination of bromhexine, guaifenesin, ambroxol, salbutamol/terbutaline, pseudoephedrine, triprolidine, and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrups. *Chromatographia*, 2016. 79(21-22): pp. 1507-1514.
- Guideline, ICH Harmonised Tripartite. "Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)." *International conference on harmonization, Geneva, Switzerland*. 2005: PP 1-12.

Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and salbutamol sulphate in syrup by the derivative spectrophotometric method

Ngoc Yen Nguyen Thi, Nguyen Dinh Minh, Chung Duong Dinh*

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
ddchung@ntt.edu.vn

Abstract In this study, the spectrophotometric method was used to simultaneously identify bromhexine hydrochloride and salbutamol sulfate in medicine syrup. The study was carried out by transforming the UV absorption spectrum of bromhexine and salbutamol using second derivatives. The results of the second derivative spectrums showed that the absorption was zero at wavelengths of 240.4nm and 365.4nm for bromhexine and salbutamol respectively. Therefore, the determination of bromhexine and salbutamol was carried out at wavelengths of 365,4nm and 240,4nm- respectively. The method has been validated according to ICH guidelines. The linear curves obtained by the second derivative spectral method show that linearity in the range of 20 – 80µg/ml for bromhexine and 10 – 40µg/ml for salbutamol with the sensitivity values of bromhexine and salbutamol of 0.141µg/ml and 0.369µg/ml, respectively. This method showed the high values of recovery and accuracy for bromhexine and salbutamol. The analytical value of the intraday analysis was 98.57 – 99.86%, while the RSD of repeatability was 0.25 – 0.94%. The interday analytical values for correctness ranged from 99.80% to 101.50% and the RSD of repeatability was from 0.15% to 0.66%. The results of the research were suitable for routine analysis of bromhexine and salbutamol in the combined dosage form of syrup.

Keywords Salbutamol, Bromhexine, derivative spectrophotometry.