

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỒNG HIỆU NĂNG CAO ĐỊNH LƯỢNG ATORVASTATIN TRONG CHẾ PHẨM

DS. DƯƠNG ĐÌNH CHUNG

ThS. NGUYỄN THỊ NGỌC YẾN

TS. BẠCH LONG GIANG

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Phản biện khoa học: TS. TÔ MINH HÙNG

Giám đốc Viện KN-NC dược và TBYT Quân đội

TÓM TẮT: Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao định lượng Atorvastatin trong chế phẩm. Phương pháp sử dụng cột Gemini NX RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) làm pha tĩnh; hai dung môi là acetonitril và dung dịch nước (tỉ lệ 63:37 về thể tích) làm pha động; pH được điều chỉnh $2,5 \pm 0,2$ bằng acid acetic; tốc độ dòng duy trì 1 ml x phút⁻¹ ở nhiệt độ phòng trong suốt thí nghiệm; thể tích tiêm mẫu 20 μ l. Phát hiện bằng đầu dò dãy diod quang (PAD) ở bước sóng 240 nm. Khoảng tuyến tính nằm trong khoảng nồng độ từ 3-120 μ g x ml⁻¹ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9997$. Phương pháp định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH (2006) thể hiện được tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng dưới (LLOQ). Vì vậy, phương pháp này có thể áp dụng để xác định hàm lượng Atorvastatin trong các chế phẩm đang lưu hành trên thị trường Việt Nam. Kết quả kiểm tra các mẫu chế phẩm, hàm lượng Calcium Atorvastatin đều nằm trong khoảng từ 98,0-101,5%.

Từ khóa: Atorvastatin, thẩm định phương pháp, Rp-HPLC.

ABSTRACT: This research established a simple method for determination of Atorvastatin in pharmaceutical dosage form by HPLC-PAD method. It was developed by selecting Gemini NX-C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) column as stationary phase and acetonitrile : water (63:37 v/v) as mobile phase, pH adjusted at 2.5 ± 0.2 with acetic acid and flow rate of mobile phase was maintained at 1 ml.min⁻¹ at room temperature throughout the experiment; Injection volume 20 μ l. Quantification was achieved with Photodiode Arrays (PAD) detection at 240 nm. A good linearity was observed in the concentration range of 3-120 μ g x ml⁻¹ with a correlation coefficient ($R^2 = 0.9997$). This method has been validated according to ICH guidelines and shown to be Specificity, Precise, Accurate, Limit of Detection (LOD) and Lower Limit of Quantitation (LLOQ). Hence, this method can be applied for determination of Atorvastatin in dosage form currently available in local market. For the tested samples, the content of Calcium Atorvastatin was 98.0-101.5%.

Keywords: Atorvastatin, validation, Rp-HPLC.

Chịu trách nhiệm nội dung: DS. Dương Đình Chung, Email: ddchung@ntt.edu.vn.

Ngày nhận bài: 25/10/2018; mời phản biện khoa học: 03/11/2017; chấp nhận đăng: 26/4/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Bệnh lý tim mạch là nguyên nhân bệnh lý gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Có nhiều yếu tố nguy cơ dẫn đến bệnh tim mạch, trong đó rối loạn chuyển hóa lipid được coi là một trong nhóm yếu tố nguy cơ quan trọng nhất. Trong các nhóm thuốc điều trị rối loạn chuyển hóa lipid, nhóm statin (đặc biệt là Atorvastatin Calci trihydrat - ATV), cho thấy nhiều ưu điểm khi sử dụng với các mức liều từ phòng ngừa đến điều trị rối loạn chuyển hóa lipid vừa và nặng. Đồng thời, thuốc phối hợp dự phòng trong các phác đồ điều trị đột quỵ và nhồi máu cơ tim nhờ khả năng ức chế enzyme HMG - CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) làm giảm đáng kể cholesterol toàn phần và LDL-cholesterol. Việc định lượng ATV được nghiên cứu trong các tài liệu

chính thức như Dược điển Anh [2]. Ngoài ra còn có các phương pháp phân tích khác như quang phổ [3], [4], [5], sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (Rp-HPLC) [6], [7], [8], [9], hay UHPLC [10]. Tuy vậy, Dược điển Việt Nam IV cũng chưa có chuyên luận này.

Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm bổ sung thêm một phương pháp có thể định lượng Atorvastatin Calci trong một số chế phẩm có trên thị trường bằng Rp-HPLC.

2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Viên nén chứa hoạt chất ATV đang lưu hành trên thị trường Việt Nam, gồm: Atorlip của Công

ty Dược Hậu Giang (ATV1); AtorHASAN của Công ty Dược Hasan (ATV2); Atorvastatin của Công ty Dược Domesco (ATV3); Lipitor của Công ty Dược Pfizer (ATV4); pms-ATORVASTATIN của Công ty Dược Inmexpharm (ATV5).

2.2. Nguyên liệu:

- Dung môi, hóa chất:

+ Chất chuẩn: Atorvastatin (hàm lượng 94,6%, độ ẩm 0,3%, cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh).

+ Hóa chất: đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho Rp-HPLC (Merck, Đức).

+ Thiết bị: hệ thống sắc ký lỏng của Agilent 1260 Infinity với đầu dò PAD (Agilent, Mỹ), cân phân tích 5 số MS105DU (Mettler Toledo), bể siêu âm Elma S60H (Elma, Đức).

2.3. Xây dựng phương pháp:

- Điều kiện sắc ký: dựa vào tính chất hóa lý của ATV cố định cột sắc ký Gemini NX-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), hay tương đương; đầu dò dẫn quang (PAD); tốc độ dòng 1 ml x phút⁻¹ tại nhiệt độ phòng và thể tích tiêm mẫu là 20 μ l. Tiến hành khảo sát pha động với các dung môi methanol (MeOH), acetonitril (MeCN), nước điều chỉnh pH với các tỉ lệ khác nhau.

- Chuẩn bị pha động: MeCN với nước cất đã điều chỉnh pH đến 2,5 bằng acid acetic bằng; lọc qua màng lọc milipore 0,45 μ m; siêu âm khử khí trước khi sử dụng.

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn: dung dịch chuẩn gốc ATV 600 μ g x ml⁻¹ trong MeOH, từ dung dịch

trên pha các dung dịch chuẩn có nồng độ từ 3-120 μ g x ml⁻¹.

- Chuẩn bị mẫu phân tích: cân 20 viên, tính khối lượng trung bình 1 viên, nghiền thành bột mịn. Cân lượng bột cỡ tương ứng khối lượng trung bình 1 viên, chuyển vào bình định mức 50 ml, thêm 35 ml dung dịch MeOH, siêu âm 15 phút, định mức vừa đủ. Lọc bỏ dịch lọc đầu, lấy 1 ml dịch lọc pha loãng vừa đủ thành 10 ml với pha động và lọc qua màng lọc milipore 0,45 μ m làm mẫu để tiêm sắc ký.

- Thẩm định phương pháp: phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của ICH năm 2006 về độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng dưới.

2.4. Xử lý số liệu:

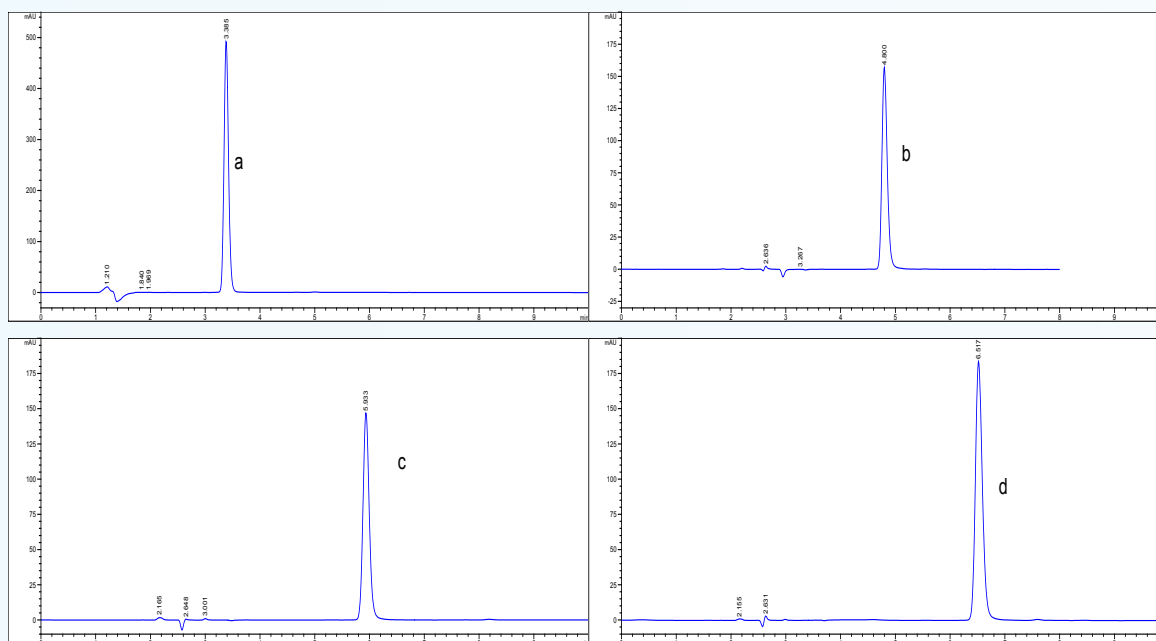
Số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý bằng thuật toán thống kê ANOVA trên phần mềm Microsoft Office Excel. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Kiểm định các giá trị bằng t-test Student. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.

3.1. Xây dựng điều kiện sắc ký:

- Khảo sát các điều kiện sắc ký:

Dựa vào cấu trúc hóa học của Atorvastatin là chất rất dễ hấp thụ ánh sáng trong vùng tử ngoại, đồng thời tham khảo chuyên luận Atorvastatin từ Dược Điển Anh [2] và các tài liệu [6], [7], [8], [9], [10]. Tiến hành khảo sát trên mẫu thử với các tỉ lệ dung môi hữu cơ tăng dần và pH thay đổi khác nhau, sắc ký đồ thu được như hình 2.



Hình 1. Sắc ký đồ của khảo sát điều kiện sắc ký, trong đó (a) MeOH: nước (pH 2,5), (80:20); (b) MeCN: nước (pH 2,5), (70:30); (c) MeCN: nước (pH 2,5), (63:37); (d) MeCN: nước (pH 2,5), (50:50).

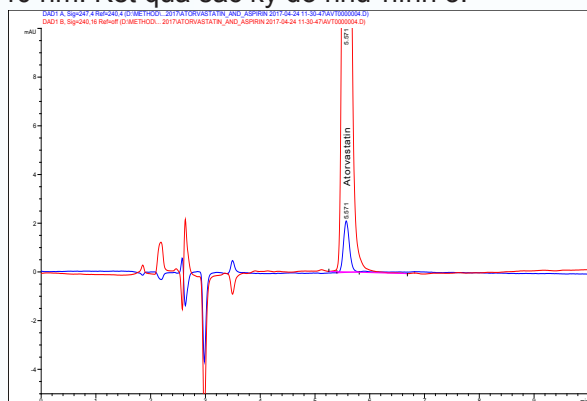
- Khảo sát các hệ pha động:

Bảng 1. Kết quả khảo sát các hệ pha động.

STT	Pha động	Thông số sắc ký			
		Thời gian lưu (tR)	Hệ số kéo đuôi (USP Tailing)	Độ tinh khiết pic (Purity %)	Hiệu lực cột (N)
1	MeOH: nước (pH 2,5), (80:20 v/v)	3,39	1,32	98,67	8461
2	MeCN: nước (pH 2,5), (70:30 v/v)	4,80	1,58	96,46	10579
3	MeCN: nước (pH 2,5), (63:37 v/v)	5,93	1,10	99,98	13361
4	MeCN: nước (pH 2,5), (50:50 v/v)	6,52	1,62	95,15	13584

Kết quả cho thấy, thay đổi tỉ lệ dung môi hữu cơ sẽ làm thay đổi khả năng phân bố của ATV giữa pha động và pha tĩnh. Với pha động (3) MeCN: nước (pH 2,5), (63:37 v/v) cho kết quả tách tốt, đỉnh cân đối, độ tinh khiết pic rất cao và thời gian lưu tương đối ngắn (dưới 12 phút) giúp tiết kiệm thời gian phân tích. Do đó, chúng tôi lựa chọn tỉ lệ pha động này để tiếp tục khảo sát thí nghiệm.

- Khảo sát bước sóng: qua tham khảo một số tài liệu [1], [2], [5], [6], [7], [8], dựa trên cấu trúc của Atorvastatin, kết hợp khả năng ghi phổ của đầu dò PAD, chúng tôi quyết định chọn ghi nhận tín hiệu đo trên cùng 1 mẫu thử ở 2 bước sóng 247 nm và 240 nm. Kết quả sắc ký đồ như hình 3.



Hình 2. Sắc ký đồ của khảo sát bước sóng phát hiện.

Trên cùng một nồng độ, mẫu thử ATV tại bước sóng 240 nm trên hệ thống sắc ký cho đáp ứng cao hơn nhiều lần so với bước sóng 247 nm. Nhận thấy độ đáp ứng của tín hiệu đo càng lớn cũng đồng nghĩa tăng độ nhạy của phương pháp. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn bước sóng 240 nm làm bước sóng phát hiện.

- Điều kiện lựa chọn sắc ký: qua các thí nghiệm khảo sát chúng tôi lựa chọn điều kiện sắc ký sau: cột sắc ký Gemini NX-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); cột bảo vệ Zorbax SB-C18 (4,6 x 15 mm, 5 µm); pha động MeCN: nước (63:37 v/v) pH điều chỉnh tới $2,5 \pm 0,2$; thể tích tiêm mẫu 20 µl; tốc độ dòng 1 ml x phút⁻¹; bước sóng phát hiện: 240 nm.

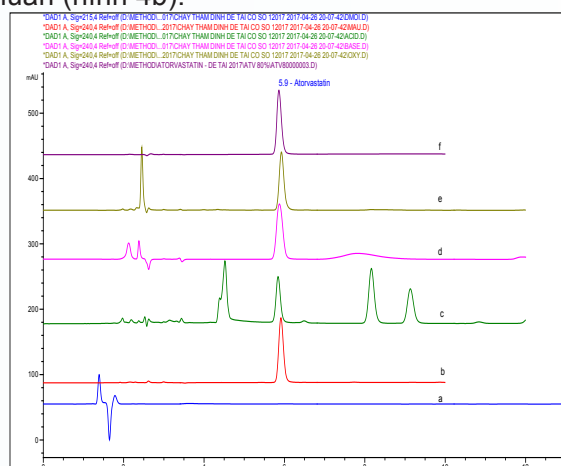
Tóm lại, qua khảo sát thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy quá trình sắc ký sử dụng các dung môi, hóa chất thường quy, điều kiện sắc ký không quá ngặt nghèo (không cần ổn nhiệt cột), các pic sắc ký

nhọn, gọn và các thông số đạt yêu cầu. Mặt khác, chương trình sắc ký đẳng dòng trong nghiên cứu này đơn giản hơn chương trình sắc ký gradient của Dược điển Anh 2013. Hệ pha động rửa giải không sử dụng dung dịch đậm sẽ thuận lợi, tiết kiệm thời gian hơn cho giai đoạn rửa cột sau phân tích.

3.2. Thẩm định phương pháp:

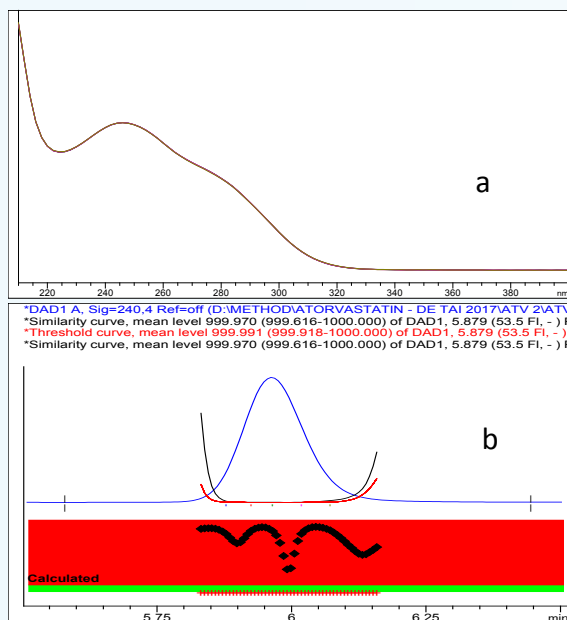
3.2.1. Tính đặc hiệu:

- Quy trình phân tích được chứng minh đặc hiệu bằng cách so sánh kết quả thu được mẫu chuẩn, mẫu trắng với mẫu thử có chứa các sản phẩm giáng hóa được pha chế trong các điều kiện khác nghiệt (acid HCl 2M, NaOH 2M, H₂O₂ 3%, chiếu tia UV trong 24 giờ). Sắc ký đồ của mẫu có chứa các sản phẩm phân hủy (hình 4 c, d, e, f) có các pic tách rời nhau so với pic của tín hiệu của ATV tại thời gian lưu (5,916 phút) trong mẫu chuẩn (hình 4b).



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu có chứa các sản phẩm phân hủy: a. Pha động; b. Mẫu chuẩn; c. ATV pha trong acid HCl 2M; d. ATV pha trong NaOH 2M; e. ATV pha trong H₂O₂ 3%; f. Mẫu chuẩn để ở nhiệt độ phòng.

- Độ tinh khiết pic và phổ hấp thụ của pic ATV được đánh giá bằng đầu dò PAD cho và kết quả đáp ứng trên 99,99% (hình 5a, b). Trong khi mẫu trắng (hình 4a) không có pic trùng với thời gian lưu của chất khảo sát, chứng tỏ quy trình phân tích rất chọn lọc với hoạt chất ATV, cho dù có nhiều ảnh hưởng của nền mẫu chứa chất phân hủy.



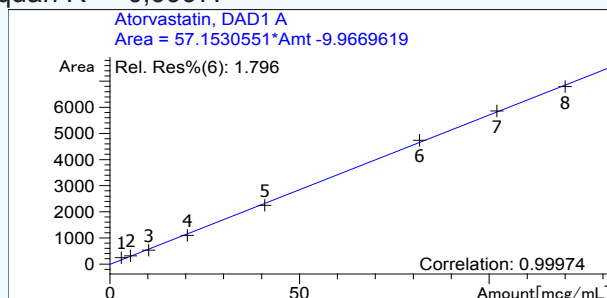
Hình 4. Phổ hấp thụ của tín hiệu ATV đo bằng đầu dò PAD (a) và độ tinh khiết tín hiệu, phân tích với điều kiện sắc ký thiết lập (b).

3.2.2. Khoảng nồng độ tuyến tính:

Bảng 2. Khoảng nồng độ tuyến tính.

STT	Nồng độ ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$); X	Diện tích pic (mAU x giây); Y
1	3,0	244,190
2	5,4	312,530
3	10,2	530,030
4	20,4	1099,900
5	40,8	2245,100
6	81,6	4737,300
7	102,0	5859,400
8	120,0	6794,300
Phương trình hồi quy:		$Y = 57,15 \times X - 9,97$
Hệ số tương quan:		$R^2 = 0,9997$

Kết quả cho thấy, tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của ATV trong khoảng nồng độ khảo sát $3-120 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, với hệ số tương quan $R^2 = 0,9997$.



Hình 5. Đồ thị tương quan giữa diện tích pic ATV với nồng độ.

3.2.3. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng dưới (LLOQ):

Dựa vào độ lệch chuẩn của đáp ứng và độ dốc của đường tuyến tính, chúng tôi xác định được LOD và LLOQ của ATV lần lượt là $0,14 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ và $1,4 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.

3.2.4. Độ lặp lại:

- Tính tương thích của hệ thống sắc ký: chuẩn bị một mẫu thử có nồng độ $20 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, tiêm lặp lại 6 lần.

Bảng 3. Kết quả phân tích tính tương thích hệ thống.

Đặc điểm	Giới hạn theo USP	ATV (n = 6)
Thời gian lưu (tR)	-	5,91
% RSD của (tR)	$\leq 2,0$	0,014
Độ phân giải (Rs)	-	10,61
% RSD của diện tích pic	$\leq 2,0$	0,034
Hệ số kéo đuôi (As)	0,8-1,5	1,13
Hệ số (k')	0,5-20	1,372
Số đĩa lý thuyết (N)	≥ 2000	13112

Kết quả thu được RSD% của thời gian lưu là 0,014%, diện tích pic 0,034%. Hệ số kéo đuôi từ 1,117-1,171, RSD là 1,87%, chứng tỏ hệ thống sắc ký phù hợp để tiến hành định lượng. Giá trị hàm lượng kết quả định lượng hoạt chất ATV có trong các mẫu đều đạt từ 98,0-102,0%.

- Độ lặp lại của phương pháp: phân tích trên 6 mẫu thử bằng cách cân lượng bột thuốc, xử lý mẫu và tiến hành sắc ký, mỗi mẫu 1 lần. Kết quả tóm tắt trong bảng 4 cho thấy, phương pháp phân tích cho kết quả lặp lại tốt với RSD 0,84%.

Bảng 4. Kết quả xác định độ lặp lại (n = 6).

Khối lượng (mg)	mAU.s	Hàm lượng % so với nhãn
15,144	1082,48547	101,30
15,168	1076,47266	101,09
15,441	1074,09814	99,13
15,267	1077,98464	100,62
15,165	1074,17517	100,94
15,178	1080,35315	101,43
% $\bar{X} \pm SD$		$100,75 \pm 0,84$
% RSD		0,84

3.2.5. Độ đúng:

Chuẩn bị 9 mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với mức nồng độ định lượng ($20 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) của ATV. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu, mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp phân tích biểu diễn theo bảng 3.

Bảng 5. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp phân tích (n = 3).

Mẫu	Nồng độ 80% (16 µg x ml ⁻¹)		Nồng độ 100% (20 µg x ml ⁻¹)		Nồng độ 120% (24 µg x ml ⁻¹)	
	Nồng độ tìm lại (µg x ml ⁻¹)	Độ đúng (%)	Nồng độ tìm lại (µg x ml ⁻¹)	Độ đúng (%)	Nồng độ tìm lại (µg x ml ⁻¹)	Độ đúng (%)
1	16,37	102,3	20,40	102,0	24,02	100,1
2	16,26	101,6	20,34	101,7	24,19	100,8
3	16,21	101,3	20,38	101,9	24,08	100,4
TB		101,7		101,8		100,4
SD		0,51		0,16		0,37
RSD%		0,50%		0,16%		0,37%

Độ đúng của phương pháp phân tích nằm trong khoảng 98,0-102,0% và giá trị RSD ≤ 2,0%. Vậy, quy trình định lượng ATV đạt yêu cầu về độ đúng.

3.2.6. Ứng dụng quy trình định lượng ATV đã được thẩm định để kiểm nghiệm các đối tượng nghiên cứu:

Bảng 6. Kết quả phân tích hàm lượng so sánh giữa 2 phương pháp.

Mẫu ATV2	Phương pháp HPLC xây dựng	Phương pháp TCCS
1	101,74	101,80
2	103,37	102,08
3	101,82	103,36
4	100,74	102,82
5	101,50	104,02
6	102,14	103,77
TB	101,89	102,98
SD	0,87	0,90
RSD%	0,85%	0,88%
T-test = 2,02 < 2,57 T tra bảng (0,05; Df = 5)		

Theo kết quả phân tích hàm lượng ATV trên mẫu thử ATV2 so với hàm lượng ghi trên nhãn bằng phương pháp HPLC mới xây dựng và phương pháp HPLC đã được đăng ký trong TCCS [1] của thuốc viên nang Atorvastatin 10 mg của Công ty Hasan-Dermapharm (tại bảng 6), cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mức độ tin cậy 95%.

Chúng tôi ứng dụng phương pháp HPLC đã xây dựng để tiến hành định lượng Atorvastatin trong 5 chế phẩm thuốc nghiên cứu, được cung cấp bởi 5 nhà sản xuất khác nhau đã được phép lưu hành trên thị trường Việt Nam, gồm ATV1 (Công ty Dược Hậu Giang), ATV2 (Công ty Dược Hasan), ATV3 (Công ty Dược Domesco), ATV4 (Công ty Dược Pfizer), ATV5 (Công ty Dược Inmexpharm). Kết quả thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phân tích các chế phẩm đang lưu hành.

Mã số mẫu	Thứ tự mẫu	Hàm lượng % so với nhãn	Trung bình ± SD
AVT1	1	101,52	101,00 ± 0,76
	2	100,13	
	3	101,35	
AVT2	1	97,97	99,00 ± 0,92
	2	99,29	
	3	99,74	
AVT3	1	98,19	98,58 ± 0,39
	2	98,62	
	3	98,94	
AVT4	1	101,35	100,75 ± 0,81
	2	99,83	
	3	101,06	
AVT5	1	98,18	98,72 ± 0,56
	2	99,29	
	3	98,72	

Từ kết quả định lượng 5 mẫu chế phẩm thuốc chứa Atorvastatin 10 mg đang lưu hành trên thị trường Việt Nam, mỗi mẫu thực hiện 3 lần cho thấy kết quả định lượng đều đạt yêu cầu cho phép về giới hạn hàm lượng thuốc ở Phụ lục 11.1, Dược Điển Việt Nam IV.

Sắc ký đồ thể hiện kết quả thẩm định tính đặc hiệu của phương pháp (hình 4) cho thấy điều kiện sắc ký có tính chọn lọc rất cao. Mặc dù, có sự hiện diện của các tạp chất phân hủy từ ATV trong các mẫu pha trong acid, pha trong base hay trong pha trong oxy già, nhưng với điều kiện sắc ký này đã tách hoàn toàn ATV ra khỏi nền mẫu với độ tinh khiết trên 99,99% (hình 5). Hơn nữa, phương pháp xây dựng với khoảng tuyến tính rộng 3-20 µg x ml⁻¹ có thể áp dụng để phân tích định tính, định lượng trong phép thử độ hòa tan và theo dõi độ ổn định chế phẩm.

(Xem tiếp trang 64)