

# ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI HYDROCHLOROTHIAZIDE VÀ TELMISARTAN TRONG CHẾ PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ UV VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA CHEMOMETRICS

Phan Thị Diệu Hiền<sup>1</sup>, Phan Thị Như Quỳnh<sup>2</sup>

(1) Lớp Dược 5, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

(2) Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Hydrochlorothiazide (HCTZ) là một thuốc lợi tiểu thiazide tổng hợp và Telmisartan (TLM) là một thuốc đối vận receptor AT1 của angiotensin II. Dạng thuốc phối hợp của HCTZ và TLM này được sử dụng khá rộng rãi trên thị trường, do đó việc phát triển các phương pháp định lượng đồng thời HCTZ và TLM trong chế phẩm để đảm bảo chất lượng thuốc là điều rất cần thiết. Vì vậy, đề tài này được tiến hành với mục tiêu xây dựng một phương pháp phân tích sử dụng chemometrics để hỗ trợ phương pháp quang phổ UV trong định lượng HCTZ và TLM trong dạng thuốc phối hợp; Ứng dụng định lượng trên một số chế phẩm. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Chất chuẩn HCTZ và TLM được sử dụng để chuẩn bị mẫu chuẩn hóa và mẫu kiểm tra. Các mẫu được quét phổ từ 230-400 nm, đo độ hấp thụ tại mỗi 1nm. Kết quả được xử lý bằng phần mềm SIMCA và sử dụng thuật toán hồi quy bình phương tối thiểu từng phần (PLS). Bên cạnh đó, một phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) cũng được xây dựng và thẩm định để định lượng HCTZ và TLM trong chế phẩm. Chế phẩm nghiên cứu là viên nén Mibetel và Lowlip-H có hàm lượng ghi nhãn là 12,5 mg HCTZ và 40 mg TLM. Kết quả định lượng chế phẩm bằng phương pháp UV với sự hỗ trợ của chemometrics và phương pháp HPLC được so sánh. **Kết quả:** Phương pháp quang phổ UV dựa trên chemometrics để định lượng đồng thời HCTZ và TLM đã được xây dựng và thẩm định với khả năng dự đoán nồng độ tốt (PRESS: 0,71-0,92; SEP: 0,23-0,26; R<sup>2</sup>: 0,99). Phương pháp đã được ứng dụng để xác định hàm lượng HCTZ và TLM trong hai chế phẩm Mibetel và Lowlip-H, kết quả thu được so với phương pháp HPLC không có nhiều khác biệt. **Kết luận:** Nhóm nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp quang phổ UV sử dụng mô hình PLS để định lượng HCTZ và TLM trong chế phẩm. Phương pháp đã được sử dụng để định lượng đồng thời HCTZ và TLM trong chế phẩm Mibetel và Lowlip-H, kết quả cho thấy khả năng ứng dụng tốt.

**Từ khóa:** Telmisartan, Hydrochlorothiazide, Chemometrics, PLS, HPLC.

## Abstract

### CHEMOMETRICS-ASSISTED UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HYDROCHLOROTHIAZIDE AND TELMISARTAN IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

Phan Thi Dieu Hien<sup>1</sup>, Phan Thi Nhu Quynh<sup>2</sup>

(1) Class of D5, Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy

**Background:** Hydrochlorothiazide (HCTZ) is a synthetic thiazide diuretic and Telmisartan (TLM) is an AT1 receptor blocker. HCTZ and TLM are often used in combination forms, which are widely available in the marketplace, so it is necessary to develop a quantitative method for HCTZ and TLM in pharmaceutical forms to guarantee the drugs' quality. As a result, the study was performed with the

Địa chỉ liên hệ: Phan Thị Như Quỳnh, email: nhuquynhphan0302@gmail.com  
Ngày nhận bài: 25/3/2016 Ngày đồng ý đăng: 15/4/2016 Ngày xuất bản: 30/6/2016

aim of developing an analytical procedure based on chemometrics to assist UV spectrophotometric method for simultaneous determination of HCTZ and TLM in combined dosage forms. The method was then applied to determine some pharmaceutical formulations. **Materials and methods:** Standards HCTZ and TLM were used to prepare calibration set and validation set. Their absorption spectra were measured from 230-400 nm with 1 nm intervals. Data was then subjected to the SIMCA software and partial least square regression (PLS) was applied. In addition, a HPLC method was also developed and validated to simultaneously determine HCTZ and TLM in the combined formulations. Two pharmaceutical formulations, Mibetel and Lowlip-H, with the labeled amounts of 12.5 mg for HCTZ and 40 mg for TLM were used in this study. The results of the developed chemometric-assisted UV spectrophotometric method were compared with those of HPLC method. **Results:** A chemometric-assisted UV spectrophotometric method using PLS for simultaneous determination of HCTZ and TLM was developed and validated with good predictive power (PRESS: 0.71-0.92; SEP: 0.23-0.26;  $R^2$ : 0.99). The method was applied to quantitate HCTZ and TLM in the two drugs, Mibetel and Lowlip-H, the results obtained were not significantly different from those obtained from the HPLC method. **Conclusion:** The study was successful in developing a chemometric-assisted UV spectrophotometric method to determine HCTZ and TLM in combined formulations and the method was also validated. The developed method was used for quantitation of HCTZ and TLM in Mibetel and Lowlip-H, and the results showed its ability for application.

**Key words:** Telmisartan, Hydrochlorothiazide, Chemometrics, PLS, HPLC.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hydrochlorothiazide (HCTZ) [1] và Telmisartan (TLM) [1] được sử dụng ở dạng phối hợp cố định liều theo tỉ lệ 12,5:40 để tạo tác dụng hiệp đồng điều trị tăng huyết áp.[2] Hiện nay các phương pháp định lượng hai hoạt chất này trong chế phẩm chủ yếu là các phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)[3-6] và sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS)[7]. Đây là những phương pháp rất tốn kém, cần nhiều thời gian để thực hiện và chỉ được tiến hành ở các đơn vị kiểm nghiệm quy mô lớn. Phương pháp quang phổ UV ngược lại có nhiều ưu điểm như đơn giản, sẵn có, chi phí thấp, có độ nhạy cao và đặc biệt là cho kết quả nhanh và chính xác. Tuy nhiên, việc định lượng đồng thời HCTZ và TLM không thể thực hiện trực tiếp bằng phương pháp quang phổ UV mà không qua quá trình tách sắc ký do sự chồng phổ của hai hoạt chất. Áp dụng chemometrics đối với các dữ liệu quang phổ có thể giải quyết được hạn chế này. Chemometrics là kỹ thuật phân tích dữ liệu đa biến có liên quan đến thiết kế thí nghiệm, tối ưu hóa, chọn lọc và đánh giá dữ liệu [8]. Hiện nay, trên thế giới có rất ít nghiên cứu sử dụng kỹ thuật chemometrics và tại Việt Nam vẫn chưa có bất kỳ một nghiên cứu nào sử dụng chemometrics để định lượng đồng thời HCTZ và TLM.

Vì vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành đề tài

*“Xác định đồng thời Hydrochlorothiazide và Telmisartan trong được phẩm bằng phương pháp quang phổ UV với sự hỗ trợ của chemometrics.”* với mục tiêu xây dựng một phương pháp phân tích sử dụng chemometrics để hỗ trợ phương pháp quang phổ UV trong định lượng HCTZ và TLM trong dạng thuốc phối hợp và ứng dụng định lượng một số chế phẩm.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Hai chế phẩm viên nén có hàm lượng ghi nhãn 12,5mg HCTZ và 40 mg TLM : viên Mibetel có số lô SX : 00515, hạn sử dụng : 06/10/2018 của Công ty TNHH Hasan-Dermapharm và viên Lowlip-H có số lô : SX LLHY0001, hạn sử dụng : 30/01/2018 của Micro Labs Limited, Unit-III - Ấn Độ.

### 2.2. Hóa chất - dụng môi

Chất chuẩn thử cấp HCTZ (hàm lượng 99,52% của Viện kiểm nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh) và TLM (hàm lượng 98,97% của trung tâm kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm TT-Huế). Acetonitril (ACN) và Methanol (MeOH) tinh khiết HPLC; Natri dihydrogen phosphat monohydrat, acid phosphoric đều của Merck, Đức.

2.3. **Thiết bị:** Hệ thống HPLC – detector PDA Shimadzu 20AD, Nhật; Máy đo quang phổ V-630, Đức ; Cân phân tích Mettler Toledo, Thụy Sĩ ( $d = 0,1\text{mg}$ ), máy đo pH Oakton pH700 (Nhật).

2.4. **Phần mềm:** SIMCA (Thụy Điển) sử dụng kỹ thuật chemometrics để đánh giá, tối ưu hóa và chọn lọc dữ liệu.

### 2.5. Phương pháp nghiên cứu

#### Chuẩn bị các dung dịch:

Dung dịch chuẩn gốc HCTZ: Cân chính xác khoảng 20 mg HCTZ vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH.

Dung dịch chuẩn gốc TLM: Cân chính xác khoảng 16 mg TLM vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Từ các dung dịch chuẩn gốc pha loãng bằng MeOH thành các dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa HCTZ nồng độ khoảng 100  $\mu\text{g/ml}$  và TLM nồng độ 320  $\mu\text{g/ml}$ .

Dung dịch thử: Cân chính xác 20 viên chế phẩm thử, tính khối lượng trung bình viên. Nghiền mịn. Cân chính xác một lượng bột viên

tương ứng 12,5 mg HCTZ và 40 mg TLM cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 20 ml MeOH, siêu âm trong 15 phút. Thêm MeOH đến vạch, lắc đều.

*Khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của HCTZ và TLM*

Khoảng tuyến tính được nghiên cứu trong khoảng nồng độ 2-12  $\mu\text{g/ml}$  đối với HCTZ và 3-18  $\mu\text{g/ml}$  đối với TLM. Giá trị độ hấp thụ được xác định tại cực đại hấp thụ của mỗi hoạt chất. Khoảng tuyến tính của mỗi hoạt chất được xác định bằng hồi quy bình phương tối thiểu (PLS) nồng độ và độ hấp thụ tương ứng.

#### Thiết kế thí nghiệm [9]

Chuẩn bị 15 mẫu chuẩn hóa và 8 mẫu kiểm tra chứa hỗn hợp hai chất HCTZ và TLM ở các nồng độ khác nhau. Nồng độ các dung dịch trong mẫu chuẩn hóa được tính toán dựa theo thiết kế cấu trúc có tâm (CCD). Các dung dịch trong mẫu kiểm tra có nồng độ các thành phần ngẫu nhiên nằm trong khoảng tuyến tính và không trùng với các dung dịch trong mẫu chuẩn hóa.

**Bảng 1.** Thành phần các mẫu chuẩn hóa và mẫu kiểm tra

Mẫu chuẩn hóa		Mẫu kiểm tra	
HCTZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	TLM ( $\mu\text{g/ml}$ )	HCTZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	TLM ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,000	9,000	2,0	3,0
12,000	9,000	3,0	4,0
6,000	0,000	5,0	6,0
6,000	18,000	7,0	8,0
1,757	2,635	8,0	8,5
10,243	2,635	9,0	10,0
10,243	15,365	10,0	11,0
1,757	15,365	11,0	12,0
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		
6,000	9,000		

*Xây dựng mô hình PLS [10]*

Các dung dịch mẫu chuẩn hóa và mẫu kiểm tra được quét phổ từ 230-400nm, đo độ hấp thụ của dung dịch tại mỗi 1 nm. Dữ liệu độ hấp thụ được lưu vào Excel và xử lý bằng phần mềm SIMCA. Dữ liệu của mẫu chuẩn hóa được dùng để xây dựng mô hình PLS và dữ liệu của

mẫu kiểm tra được sử dụng để thẩm định mô hình PLS.

So sánh với phương pháp HPLC

Điều kiện sắc kí :

Cột sắc ký: HiQ Sil C8 (150 x 4,6mm, 3µm)

Pha động:

Thời gian (phút)	Pha động	Tỉ lệ thể tích (%)
0,01-1,99	Acetonitril	35
	Đệm phosphat	65
2,00-6,49	Acetonitril	65
	Đệm phosphat	35
6,50-7,50	Acetonitril	35
	Đệm phosphat	65

Detector: UV 271 nm [3]

Tốc độ dòng: 1 ml/phút [3] [4]

Thể tích tiêm: 10µl [4]

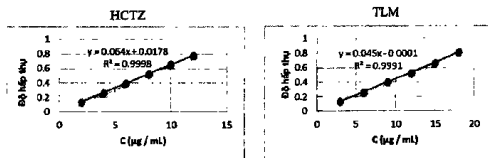
\* Tính toán: Hàm lượng HCTZ và TLM so với lượng ghi trên nhãn được tính bằng phương pháp so sánh với chuẩn có nồng độ tương đương làm song song.

### 3. KẾT QUẢ

3.1. Phương pháp UV với sự hỗ trợ của chemometrics

3.1.1. Khoảng nồng độ tuyến tính của HCTZ và TLM

Dung dịch chuẩn HCTZ và TLM được quét phổ từ 200-400 nm, thu được  $\lambda_{max}$  của HCTZ là 271nm và của TLM là 298nm. Khoảng nồng độ tuyến tính của HCTZ là 2-12 µg/ml và TLM là 3-18 µg/ml. (Hình 1)



Hình 1. Đường chuẩn của HCTZ và TLM

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và độ hấp thụ tương ứng

#### 3.1.2. Mô hình PLS

Mô hình PLS được xây dựng bởi phần mềm SIMCA bằng cách sử dụng các dung dịch chuẩn hóa. Mô hình được thẩm định trong (internal

validation) bằng phương pháp thẩm định chéo LOO-CV [11]. Các thông số của mô hình tối ưu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Các thông số thống kê cho mô hình PLS tối ưu

Các thông số	HCTZ	TLM
Khoảng bước sóng	230-400 nm	
Số thành phần chính tối ưu	2	
PRESS*	0,9174	0,7098
SEP**	0,2560	0,2252
R <sup>2</sup>	0,9947	0,9983

\*PRESS : tổng bình phương phần dư dự đoán

\*\*SEP : sai số chuẩn của dự đoán

Ngoài ra, mô hình còn được thẩm định ngoài (external validation) thông qua việc dự đoán nồng độ của các dung dịch mẫu kiểm tra. Kết quả dự đoán và độ hồi phục được trình bày trong Bảng 3. [11]

**Bảng 3.** Nồng độ dự đoán của HCTZ và TLM trong mô hình PLS

STT	Nồng độ thật sự ( $\mu\text{g/ml}$ )		Nồng độ dự đoán ( $\mu\text{g/ml}$ )		% độ hồi phục	
	HCTZ	TLM	HCTZ	TLM	HCTZ	TLM
1	2,00	3,00	2,02	3,01	101,07	100,50
2	3,00	4,00	2,95	4,03	98,49	100,63
3	5,00	6,00	5,01	5,97	100,28	99,42
4	7,00	8,00	6,93	7,57	99,03	94,62
5	8,00	8,50	8,20	8,45	102,50	99,43
6	9,00	10,00	9,29	9,98	103,22	99,86
7	10,00	11,00	9,88	10,94	98,78	99,44
8	11,00	12,00	11,28	11,99	102,51	99,90
				Trung bình	100,74	99,23
				%RSD	1,87	1,92

Các kết quả cho thấy, mô hình PLS có khả năng dự đoán tốt hàm lượng HCTZ và TLM trong hỗn hợp hoạt chất với độ hồi phục 100,74% đối với HCTZ và 99,23% đối với TLM và % RSD nhỏ hơn 2%.

### 3.2. Phát triển và thẩm định phương pháp HPLC

#### 3.2.1. Phát triển phương pháp HPLC

Qua tham khảo tài liệu và với điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm, nhóm nghiên cứu sử dụng cột HiQ Sil C8 (150 x 4,6mm, 3 $\mu\text{m}$ ) trong nghiên cứu này. Đệm phosphat được điều chỉnh bằng axit o-phosphoric đến pH=3. [3] Pha động bao gồm Acetonitril và đệm phosphat được phối hợp theo các tỉ lệ khác nhau theo bảng 4.

**Bảng 4.** Tỉ lệ dung môi pha động

Thời gian (phút)	Pha động	Tỉ lệ thể tích (%)
0,01-1,99	Acetonitril	35
	Đệm phosphat	65
2,00-6,49	Acetonitril	65
	Đệm phosphat	35
6,50-7,50	Acetonitril	35
	Đệm phosphat	65

Để lựa chọn bước sóng định lượng thích hợp, nhóm nghiên cứu phân tích phổ UV của hai hoạt chất bằng detector DAD. Do HCTZ trong chế phẩm có hàm lượng bằng 5/16 so với TLM nên ưu tiên chọn bước sóng cho đáp ứng cao của HCTZ

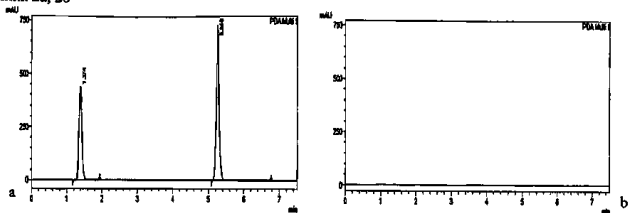
là 271nm làm bước sóng định lượng trong nghiên cứu này.

Qua tham khảo tài liệu, nhóm nghiên cứu lựa chọn tốc độ dòng là 1 ml/phút và thể tích tiêm là 10 $\mu\text{l}$ . [3, 4]

### 3.2.2. Thẩm định phương pháp HPLC

#### Tinh chọn lọc

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch mẫu trắng. Sắc ký đồ được trình bày ở hình 2a, 2b

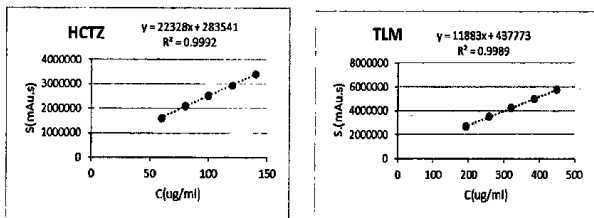


Hình 2. Sắc ký đồ các mẫu: a. hỗn hợp chuẩn; b. mẫu trắng;

Kết quả ở hình 2 cho thấy trên sắc ký đồ mẫu trắng tại vị trí tương ứng thời gian lưu của HCTZ và TLM không có pic. Kiểm tra phổ UV bằng detector PDA mẫu thêm chuẩn và đánh giá độ tinh khiết pic (purity index) cho thấy pic có độ tinh khiết cao. Do vậy, phương pháp có tính chọn lọc.

#### Tính tuyến tính

Tính tuyến tính được khảo sát trong khoảng 60 – 140  $\mu\text{g/ml}$  đối với HCTZ và 192 – 448  $\mu\text{g/ml}$  đối với TLM. Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của HCTZ và TLM

Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ với diện tích pic đáp ứng.

#### Độ chính xác

Đánh giá độ chính xác của phương pháp trên chế phẩm viên nén Mibetel. Chuẩn bị dung dịch mẫu đánh giá độ chính xác như đối với chuẩn bị dung dịch thử nhưng tiến hành trên 6 mẫu cân riêng biệt. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ chính xác của phương pháp

STT	Độ chính xác cùng ngày				Độ chính xác khác ngày			
	HCTZ		TLM		HCTZ		TLM	
	S (mAu.s)	HL %	S (mAu.s)	HL %	S (mAu.s)	HL %	S (mAu.s)	HL %
1	2291100	100,38	3638561	100,02	2320703	101,86	3713781	102,38

9. JN, M. and M. JC, Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 2000, Harlow (England): Pearson education limited.
10. MCF, F., C. PM, and K. TS, A spectrophotometric-partial least squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations. . J. Pharm. Biomed. Anal 2001. 26: p. 443-451.
11. Renman, L., Multivariate Data Analysis and Calibration. 2012, Sweden: Karlstad University.
12. Telmisartan and Hydrochlorothiazide Tablets, in The United States Pharmacopeial Convention. 2015. p. 4777-4779.