

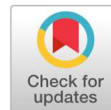


ISSN : 1859-1779

Nghiên cứu Dược học

Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh - Dược học;27(2):35-48

<https://doi.org/10.32895/hcjm.p.2024.02.05>



Tiêu chuẩn hóa viên nén bao phim metformin hydroclorid 1000 mg và vildagliptin 50 mg

Phạm Lê Ngọc Yến¹, Nguyễn Đức Tuấn^{1,*}

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Vildagliptin phối hợp metformin hydroclorid được sử dụng để điều trị đái tháo đường type 2. Dược điển Việt Nam và các dược điển tham chiếu hiện hành chưa có chuyên luận kiểm tra chất lượng cho phối hợp này.

Mục tiêu nghiên cứu: Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng viên nén bao phim chứa metformin hydroclorid và vildagliptin.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và thẩm định quy trình phân tích định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong môi trường hòa tan và trong chế phẩm; quy trình phân tích định lượng tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid trong viên nén bao phim chứa metformin hydroclorid và vildagliptin bằng phương pháp HPLC-PDA.

Kết quả: Quy trình phân tích định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong môi trường hòa tan và trong chế phẩm sử dụng cột sắc ký InertSustain® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 210 nm (vildagliptin) và 232 nm (metformin hydroclorid). Quy trình định lượng tạp 1-cyanoguanidin và vildagliptin amid trong chế phẩm sử dụng cột sắc ký Alantis® dC18 (150 x 4,6 mm; 3 µm), pha động bao gồm acetonitril và dung dịch acid phosphoric pH 3,0 chứa tác nhân tạo cặp ion natri hexasulfonat và natri clorid, chương trình rửa giải gradient. Các quy trình đã được thẩm định đạt độ đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác, khoảng tuyến tính rộng, giới hạn định lượng phù hợp với mức giới hạn tạp chất theo quy định của ICH Q2(R1). Tiêu chuẩn chất lượng chế phẩm đã được đề xuất dựa vào kết quả phân tích trên 3 lô thành phẩm nghiên cứu, sử dụng các quy trình phân tích đã xây dựng và các quy định chung về tiêu chuẩn chất lượng dạng bào chế viên nén bao phim của ĐCVN V, hướng dẫn ICH Q6A và ICH Q3B.

Kết luận: Quy trình phân tích định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong môi trường hòa tan và trong chế phẩm; quy trình phân tích định lượng tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid trong viên nén bao phim chứa metformin hydroclorid và vildagliptin đã được xây dựng và thẩm định. Các quy trình trên được áp dụng để phân tích mẫu thành phẩm nghiên cứu và đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho chế phẩm viên nén bao phim chứa metformin hydroclorid 1000 mg và vildagliptin 50 mg.

Từ khóa: vildagliptin amid; vildagliptin; metformin hydroclorid

Ngày nhận bài: 18-07-2024 / Ngày chấp nhận đăng bài: 14-08-2024 / Ngày đăng bài: 28-08-2024

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Tuấn. Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

E-mail: ductuan@ump.edu.vn

© 2024 Bản quyền thuộc về Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh.

Abstract

STANDARDIZATION OF FILM-COATED TABLET CONTAINING 1000 MG METFORMIN HYDROCHLORIDE AND 50 MG VILDAGLIPTIN

Pham Le Ngoc Yen, Nguyen Duc Tuan

Background: Vildagliptin in combination with metformin hydrochloride is used for treatment of type 2 diabetes. The applicable Vietnamese and reference pharmacopoeias do not have a specified monograph for this combination.

Objectives: Development of specifications of film-coated tablets containing metformin hydrochloride and vildagliptin.

Materials and methods: Development of specifications and validation of analytical procedure for qualitative and quantitative determination of metformin hydrochloride and vildagliptin in dissolution medium and in drug products; and of analytical procedure for quantitative determination of 1-cyanoguanidine and vildagliptin amide related impurities in film-coated tablets containing metformin hydrochloride and vildagliptin by HPLC-PDA.

Results: The analytical procedure for qualitative and quantitative determination of metformin hydrochloride and vildagliptin in dissolution medium and in drug products was performed on reverse phase column InertSustain® C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm), detection wavelength at 210 nm (vildagliptin) and 232 nm (metformin hydrochloride). The analytical procedure for quantification of 1-cyanoguanidine and vildagliptin amide was performed on reverse phase column Alantis® dC18 (150 x 4.6 mm; 3 µm), mixture of acetonitrile and orthophosphoric acid solution pH 3.0 containing sodium hexasulfonate as an ion-pair agent and sodium chloride as mobile phase in gradient modes. The validation results satisfied specificity, accuracy, precision, wide linearity, and limit of qualification that was in accordance with the acceptance criteria of related substances in drug products by ICH Q2(R1). Specifications of film-coated tablets containing metformin hydrochloride and vildagliptin were proposed based on analytical results of 3 batches of finished products, using developed procedures and general guidelines on quality standards for film-coated tablet dosage forms of Vietnamese pharmacopoeia, ICH Q6A and ICH Q3B.

Conclusion: The HPLC-PDA methods for qualitative and quantitative determination of metformin hydrochloride and vildagliptin in dissolution medium and in drug products, and quantitative determination of 1-cyanoguanidine and vildagliptin amide related impurities in film-coated tablets containing metformin hydrochloride and vildagliptin, were successfully developed and validated. These analytical procedures were applied for analyzing finished products and proposing specifications for film-coated tablets containing 1000 mg metformin hydrochloride and 50 mg vildagliptin.

Keywords: vildagliptin amide; vildagliptin; metformin hydrochloride

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phối hợp metformin hydroclorid với một thuốc thuộc nhóm chất ức chế DPP-4 đã và đang được sử dụng nhiều trong điều trị đái tháo đường type 2 [1]. Trong đó, viên nén phối hợp metformin hydroclorid và vildagliptin được sử dụng rộng rãi với hàm lượng 1000 mg metformin hydroclorid và 50 mg vildagliptin [2]. Do thuốc được sử dụng thường xuyên trong một thời gian dài nên vấn đề chất

lượng thuốc luôn được các chuyên gia và các đối tượng sử dụng thuốc quan tâm. Dược điển Việt Nam và các dược điển tham chiếu hiện hành vẫn chưa có chuyên luận quy định tiêu chuẩn chất lượng cho thuốc phối hợp hai thành phần này. Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tiêu chuẩn hóa thành phẩm phối hợp metformin hydroclorid và vildagliptin với các chỉ tiêu và mức chất lượng tương ứng tuân theo hướng dẫn chung của ICH và Dược điển Việt Nam hiện hành.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Chuẩn metformin hydroclorid; chuẩn 1-cyanoguanidin; chuẩn vildagliptin amid do Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh cung cấp. Chuẩn vildagliptin do Công ty Glenmark Life Sciences Ltd., Ấn Độ cung cấp. Viên nén bao phim chứa 1000 mg metformin hydroclorid và 50 mg vildagliptin và mẫu giả được của viên nén bao phim (thành phần tá dược: hydroxypropyl cellulose, hypromellose, iron oxyd yellow, iron oxyd red, macrogol, magnesi stearat, talc và titan dioxyd) đang trong giai đoạn nghiên cứu do Công ty X cung cấp.

2.2. Hóa chất, dung môi

Nước cất, amoni dihydrophosphat, natri hexansulfonat, natri clorid, acid hydrocloric, acid phosphoric, hydrogen peroxyd và acetonitril.

2.3. Trang thiết bị

Hệ thống HPLC-PDA Waters Alliance 2695XE. Cột Atlantis dC18 100 Å (150 x 4,6 mm; 3 µm), cột InertSustain C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), cột Agela C18-SCX (250 x 4,6 mm; 5 µm), cột InertSustain C8 (250 x 4,6 mm; 5 µm), cột Gemini SCX (250 x 4,6 mm; 5 µm). Máy khuấy từ gia nhiệt IKA. Máy thử độ hòa tan Shimadzu. Tủ sấy chân không Memmert, máy đo pH Metler Toledo S20 và các thiết bị phân tích khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong chế phẩm và trong môi trường hòa tan bằng HPLC-PDA

2.4.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm. Thực hiện khảo sát trên dung dịch chuẩn, các dung dịch thử với điều kiện sắc ký ban đầu như sau: cột InertSustain C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 10 µl, nhiệt độ cột 30°C, pha động bao gồm acetonitril và nước (50:50). Dung môi pha mẫu: dung dịch acid phosphoric 0,05%.

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn metformin hydroclorid nồng độ 20.000 µg/ml. Dung dịch chuẩn vildagliptin nồng độ 1.000 µg/ml. Dung dịch chuẩn hỗn hợp: 100 µg/ml metformin hydroclorid và 50 µg/ml vildagliptin. Dung dịch thử gốc: cân 20 viên, xác định khối lượng trung bình của 1 viên. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương đương với 5 lần khối lượng trung bình viên, cho vào bình định mức 500 ml, thêm khoảng 200 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, để nguội, thêm tiếp dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy lọc, bỏ một vài mililit dịch lọc đầu. Dung dịch thử metformin: Pha loãng dung dịch thử gốc 100 lần. Dung dịch thử vildagliptin: Pha loãng dung dịch thử gốc 10 lần. Dung dịch giả dược gốc: Cân chính xác một lượng giả dược tương đương với 5 lần khối lượng giả dược trong 1 viên, cho vào bình định mức 500 ml, thêm khoảng 200 ml dung môi pha mẫu, xử lý tương tự mẫu thử. Dung dịch giả dược metformin: Pha loãng dung dịch giả dược gốc 100 lần. Dung dịch giả dược vildagliptin: Pha loãng dung dịch giả dược gốc 10 lần. Tất cả các dung dịch được lọc qua màng lọc RC 0,45 µm trước khi tiến hành sắc ký.

Đối với định lượng 2 dược chất trong môi trường hòa tan: dung dịch thử vildagliptin là dịch lọc sau hòa tan 1 viên nén bao phim thành phẩm trong môi trường hòa tan (900 ml dung dịch acid hydrocloric 0,01 N) và dung dịch thử metformin là dung dịch pha loãng 10 lần của dung dịch thử vildagliptin bằng môi trường hòa tan (dung môi pha mẫu). Mức chất lượng dự kiến là không dưới 75% (Q) hoạt chất được hòa tan sau 30 phút.

2.4.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát bước sóng phát hiện: Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp với dãy bước sóng phát hiện từ 210 - 400 nm. Khảo sát pha động: Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử với các hệ pha động khác nhau. Xem sắc ký đồ tại bước sóng phát hiện đã chọn. Khảo sát cột sắc ký: Với pha động và bước sóng phát hiện đã chọn, tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử với các cột sắc ký khác nhau về pha tĩnh (cột C8, C18), chiều dài cột (150 hoặc 250 mm). Chọn bước sóng, pha động và pha tĩnh phù hợp để định lượng đồng thời metformin và vildagliptin với điều kiện tín hiệu ổn định, độ nhạy cao, pic đạt độ tinh khiết, độ phân giải và hệ số bất đối đạt yêu cầu sắc ký.

2.4.3. Thẩm định quy trình

Theo hướng dẫn của ICH [3] với các chỉ tiêu tính phù hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và khoảng xác định.

2.5. Xây dựng quy trình định lượng tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid trong chế phẩm bằng HPLC-PDA

2.5.1. Thiết kế nghiên cứu

Thực hiện khảo sát trên dung dịch chuẩn, các dung dịch thử và các dung dịch thử để ở điều kiện khắc nghiệt tương tự như xây dựng quy trình định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong chế phẩm bằng HPLC-PDA với điều kiện sắc ký ban đầu như sau: cột Alantis® dC18 100 Å (150 x 4,6 mm; 3 µm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm 20 µl, nhiệt độ cột 30°C, pha động bao gồm acetonitril và dung dịch acid phosphoric 0,05% (A), chương trình rửa giải gradient (0-2 phút: 97% A; 2-30 phút: 97% đến 55% A; 30,1-35 phút: 97% A). Mức chất lượng dự kiến tương ứng cho 1-cyanoguanidin và vildagliptin amid lần lượt là không quá 0,02% và 0,2%.

2.5.2. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn 1-cyanoguanidin: 0,2 µg/ml 1-cyanoguanidin. Dung dịch chuẩn vildagliptin amid: 1 µg/ml vildagliptin amid. Dung dịch thử gốc: Cân chính xác một lượng bột thuốc tương đương với 5 lần khối lượng trung bình viên, cho vào bình định mức 500 ml, thêm khoảng 200 ml dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, để nguội, thêm tiếp dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy lọc, bỏ vài mililít dịch lọc đầu. Dung dịch thử 1 (Dung dịch thử 1-cyanoguanidin): pha loãng dung dịch thử gốc 10 lần. Dung dịch thử 2 (Dung dịch thử vildagliptin amid): sử dụng dung dịch thử gốc. Các dung dịch thử khác nghiệt: Mỗi viên nén bao phim (nguyên viên), mỗi 1000 mg metformin hydroclorid và mỗi 50 mg vildagliptin được để trong một số điều kiện khắc nghiệt sau đây (mẫu phân hủy): mẫu oxy hóa (oxy hóa bằng 10 ml dung dịch hydrogen peroxyl 3% trong 24 giờ), mẫu nhiệt độ (đặt mẫu trong tủ sấy ở 80°C trong 24 giờ), mẫu ánh sáng mặt trời (đặt mẫu dưới ánh sáng mặt trời trong 24 giờ), mẫu ẩm/độ ổn định (làm ẩm mẫu với 2 ml nước trong 24 giờ). Các mẫu sau khi được để ở điều kiện khắc nghiệt được cho vào bình định mức phù hợp, xử lý tương tự mẫu thử. Tương

ứng với từng điều kiện phân hủy, chuẩn bị 2 dung dịch thử 1, 2.

2.5.3. Thẩm định quy trình

Theo hướng dẫn của ICH với các chỉ tiêu tính phù hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chính xác, độ đúng và khoảng xác định.

2.6. Tiêu chuẩn hóa viên nén bao phim hai thành phần metformin hydroclorid và vildagliptin

Phân tích trên 03 lô thuốc nghiên cứu, mỗi lô chọn 6 mẫu, từ đó đề xuất mức chất lượng của từng chỉ tiêu. Các chỉ tiêu cụ thể như sau: hình thức cảm quan, độ đồng đều khối lượng, định tính, độ hòa tan, tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid, định lượng.

3. KẾT QUẢ

3.1. Xây dựng quy trình định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong chế phẩm bằng HPLC-PDA

3.1.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát bước sóng phát hiện

Dựa vào kết quả khảo sát, chọn bước sóng phát hiện để định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin lần lượt là 232 nm và 210 nm.

Khảo sát pha động

Lần lượt khảo sát các hệ dung môi pha động trên cột sắc ký C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) với tỷ lệ tương ứng như sau: Pha động 1: Nước - ACN (50:50); Pha động 2: Dung dịch H3PO4 0,01% - ACN (50:50); Pha động 3: Dung dịch H3PO4 0,01% - ACN (90:10); Pha động 4 đến 8 như Bảng 1.

Kết quả khảo sát các hệ pha động được thể hiện trong Bảng 2. Pha động 8 với thời gian phân tích ngắn hơn được lựa chọn để tiến hành các khảo sát tiếp theo. Kết quả khảo sát cột sắc ký thể hiện ở Bảng 3. Như vậy điều kiện sắc ký thích hợp là: cột sắc ký InertSustain® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), bước sóng phát hiện 210 nm (vildagliptin) và 232 nm (metformin), thể tích tiêm 10 µl, nhiệt độ cột 30°C, tốc độ dòng 1,0 ml/phút và pha động 8.

Bảng 1. Chi tiết chương trình rửa giải pha động 4 đến 8

Pha động 4			Pha động 5			Pha động 6		
Thời gian (phút)	H ₃ PO ₄ 0,01% (%)	ACN (%)	Thời gian (phút)	H ₃ PO ₄ 0,01% (%)	ACN (%)	Thời gian (phút)	Acid formic 0,01% (%)	ACN (%)
0	90	10	0	90	10	0	90	10
15	50	50	15	75	25	15	75	25
30	50	50	15,1	90	10	15,1	90	10
30,1	90	10	20	90	10	20	90	10
35	90	10						
Pha động 7			Pha động 8			*Dung dịch đệm pH 3,0: Hòa tan 0,5 gam natri hexansulfonat trong 900 ml nước tinh khiết, điều chỉnh pH đến 3,0 bằng dung dịch H ₃ PO ₄ đậm đặc, thêm nước tinh khiết vừa đủ 1000 ml. **Dung dịch đệm pH 3,0: Hòa tan 0,5 gam natri hexansulfonat, 0,5 gam natri clorid trong 900 ml nước tinh khiết, điều chỉnh pH đến 3,0 bằng dung dịch H ₃ PO ₄ đậm đặc, thêm nước tinh khiết vừa đủ 1000 ml.		
Thời gian (phút)	Đệm pH 3,0 0,01% (%)*	ACN (%)	Thời gian (phút)	Đệm pH 3,0 0,01% (%)**	ACN (%)			
0	90	10	0	90	10			
15	75	25	7	75	25			
15,1	90	10	7,1	90	10			
20	90	10	10	90	10			

Bảng 2. Kết quả khảo sát pha động

Pha động	Độ phân giải	Hệ số bất đối	Độ nhạy	Độ tinh khiết pic	Tín hiệu đầu dò	Thời gian lưu vildagliptin (phút)	Thời gian lưu metformin (phút)
1	-	-	-	Không đạt	-	-	-
2	-	-	-	Không đạt	-	-	-
3	Đạt	Không đạt	-	Không đạt	-	-	-
4	Đạt	Không đạt	Cao	Không đạt	-	-	-
5	Đạt	Không đạt	Cao	Không đạt	-	-	-
6	Đạt	Không đạt	Thấp	Không đạt	-	-	-
7	Đạt	Đạt	Cao	Đạt	Ổn định	13,8	8,3
8	Đạt	Đạt	Cao	Đạt	Ổn định	8,6	7,5

Chú thích: "-" Không đánh giá

Bảng 3. Kết quả khảo sát cột sắc ký

Cột sắc ký	Kích thước cột	Độ tinh khiết pic	Độ phân giải	Hệ số bất đối
C8	250 x 4,6 mm; 5 µm	Không đạt	Đạt	Không đạt
SCX	250 x 4,6 mm; 5 µm	-	-	-
C18-SCX	250 x 4,6 mm; 5 µm	-	-	-
C18	250 x 4,6 mm; 5 µm	Đạt	Đạt	Đạt
dC18	150 x 4,6 mm; 3 µm	Đạt	Đạt	Đạt

Chú thích: "-" Không đánh giá

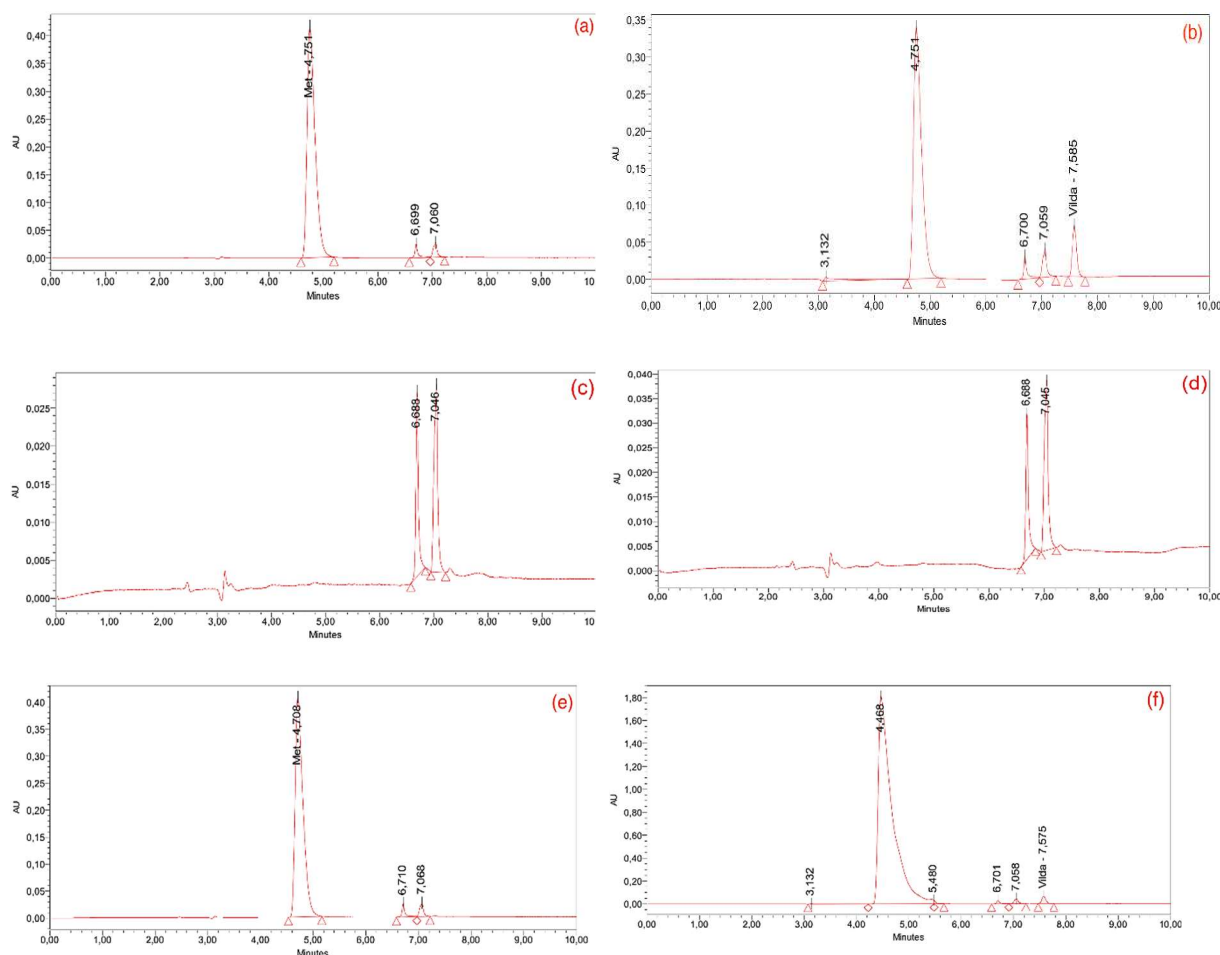
3.1.2. Thẩm định quy trình phân tích

Độ đặc hiệu: Kết quả sắc ký đồ mẫu trắng (dung môi pha mẫu), mẫu giả dược không xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của metformin và vildagliptin. Sắc ký đồ mẫu thử và các mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của metformin và vildagliptin trong sắc ký đồ các mẫu chuẩn và chuẩn hỗn hợp. Pic metformin và vildagliptin trong sắc ký đồ tinh khiết theo phổ UV-Vis (pic metformin: Giá trị Purity Angle (PA) 0,063 nhỏ hơn Purity Threshold (PT) 0,261; pic vildagliptin: Giá trị Purity Angle 0,635 nhỏ hơn Purity

Threshold 0,843). Kết quả khảo sát độ đặc hiệu được minh họa ở Hình 1.

3.1.3. Độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng đạt độ tuyến tính với giá trị $r > 0,999$ và khoảng nồng độ của metformin hydroclorid và vildagliptin lần lượt là 39,77 - 159,07 $\mu\text{g/ml}$ và 19,97 - 79,88 $\mu\text{g/ml}$. Giá trị RSD hàm lượng phần trăm so với nhãn của hai hoạt chất không quá 2,0%. Tỷ lệ thu hồi của hai hoạt chất đều nằm trong khoảng 98 - 102% với RSD không quá 2%.



Hình 1. Sắc ký đồ các mẫu khảo sát độ đặc hiệu

Hỗn hợp chuẩn - 232 nm (a); Hỗn hợp chuẩn - 210 nm (b); Giả dược - 232 nm (c); Giả dược - 210 nm (d); Dung dịch thử - 232 nm (e); Dung dịch thử - 210 nm (f)

3.2. Xây dựng quy trình định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong môi trường hòa tan bằng HPLC-PDA

3.2.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Giống điều kiện sắc ký để định lượng trong chế phẩm.

3.2.2. Thẩm định quy trình phân tích

Độ đặc hiệu

Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu trắng (dung môi pha mẫu), mẫu giả dược không xuất hiện pic có thời gian lưu tương

đương với thời gian lưu của metformin và vildagliptin. Sắc ký đồ mẫu thử và các mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của metformin và vildagliptin trong sắc ký đồ các mẫu chuẩn và chuẩn hỗn hợp. Pic chính trong sắc ký đồ của các mẫu chuẩn và các mẫu thử đều tinh khiết theo phổ UV-Vis (pic metformin: PA 0,074 nhỏ hơn PT 0,353; pic vildagliptin: PA 0,850 nhỏ hơn PT 1,983).

3.2.3. Độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác

Phương pháp định lượng đạt độ tuyến tính với giá trị $r > 0,999$ và khoảng nồng độ của metformin hydroclorid và vildagliptin lần lượt là 39,77 - 159,07 $\mu\text{g/ml}$ và 19,97 - 79,88 $\mu\text{g/ml}$. Giá trị RSD độ hòa tan của hai hoạt chất không quá 2,0%. Tỷ lệ thu hồi của hai hoạt chất đều nằm trong khoảng 98 - 102% với RSD không quá 2%.

Xây dựng quy trình định lượng tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid trong chế phẩm bằng HPLC-PDA

3.3. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát bước sóng phát hiện: Dựa vào kết quả khảo sát, chọn bước sóng phát hiện để định lượng 1-cyanoguanidin và vildagliptin amid lần lượt là 218 nm và 210 nm.

3.3.1. Khảo sát cột sắc ký

Dựa vào kết quả khảo sát cột sắc ký khi xây dựng quy trình định tính và định lượng hai dược chất, cột sắc ký phù hợp nhất trong trường hợp này là cột dC18.

3.3.2. Khảo sát pha động

Tiến hành thay đổi dung dịch acid, dung dịch base và dung dịch đệm (gọi tắt là dung môi phân cực khảo sát (B)) với chương trình gradient có độ phân cực giảm dần (0-2 phút: 97% B; 2-30 phút: 97% đến 55% B; 30,1-35 phút: 97% B), sử dụng cột sắc ký dC18 100 Å (150 x 4,6 mm; 3 μm). Pha động 1: Dung dịch H_3PO_4 0,01% - ACN; Pha động 2: Dung dịch H_3PO_4 0,05% - ACN; Pha động 3: Dung dịch TEA 0,1% (điều chỉnh đến pH 3,0 bằng H_3PO_4) - ACN; Pha động 4: Dung dịch đệm phosphat 20 mM (điều chỉnh đến pH 3,0 bằng H_3PO_4) - ACN; Pha động 5: Dung dịch natri hexansulfonat 0,05% (kl/tt) (điều chỉnh đến pH 3,0 bằng H_3PO_4) - ACN; Pha động 6: Dung dịch natri hexansulfonat 0,05% (kl/tt), natri clorid 0,05% (kl/tt) (điều chỉnh đến pH 3,0 bằng H_3PO_4) - ACN.

Bảng 4. Kết quả khảo sát pha động

Pha động	Độ tinh khiết pic	Độ phân giải	Hệ số bất đối	Độ ổn định	Độ nhạy
1	-	Không đạt	-	-	-
2	-	Không đạt	-	-	-
3	Không đạt	Đạt	Không đạt	-	-
4	Không đạt	Không đạt	-	-	-
5	-	Không đạt	-		
6	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Chú thích: "-" Không đánh giá

Pha động 6 được lựa chọn để tiếp tục điều chỉnh pha động sao cho thời gian lưu và độ phân giải của 2 tạp và 2 dược chất phù hợp.

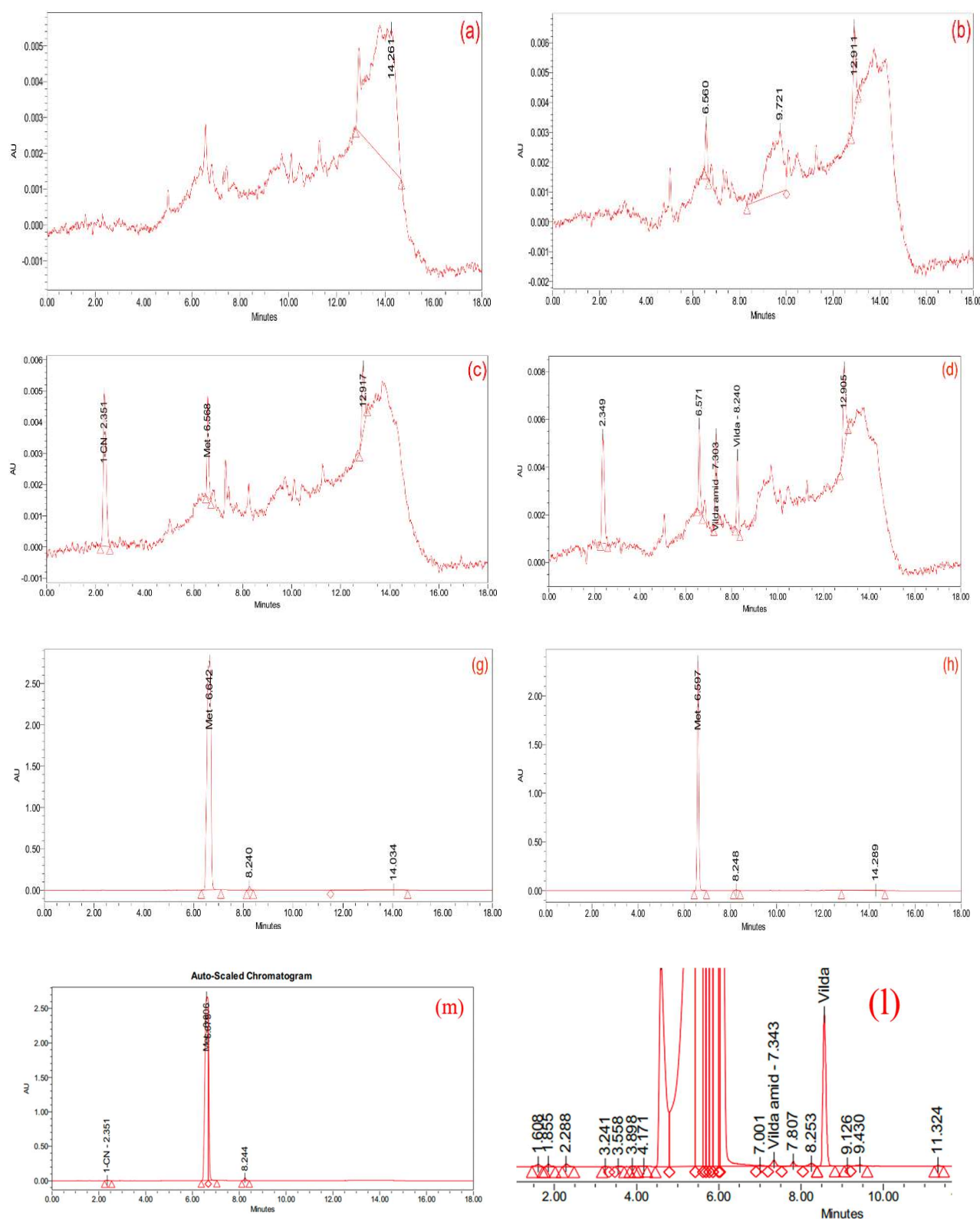
Dựa vào kết quả khảo sát, lựa chọn pha động 10 với thời gian phân tích ngắn, đạt độ phân giải, độ tinh khiết pic, hệ số bất đối và thời gian lưu phù hợp (1-cyanoguanidin 2,344 phút, metformin 5,801 phút, vildagliptin amid 7,197 phút và vildagliptin 8,555 phút) (Bảng 5).

Như vậy điều kiện sắc ký thích hợp là: cột sắc ký Atlantis® dC18, 100 Å (150 x 4,6 mm; 3 μm), bước sóng phát hiện 210 nm (vildagliptin amid) và 218 nm (1-cyanoguanidin), thể tích tiêm 20 μl , nhiệt độ cột 35°C và tốc độ dòng 1,0 ml/phút và pha động 10.

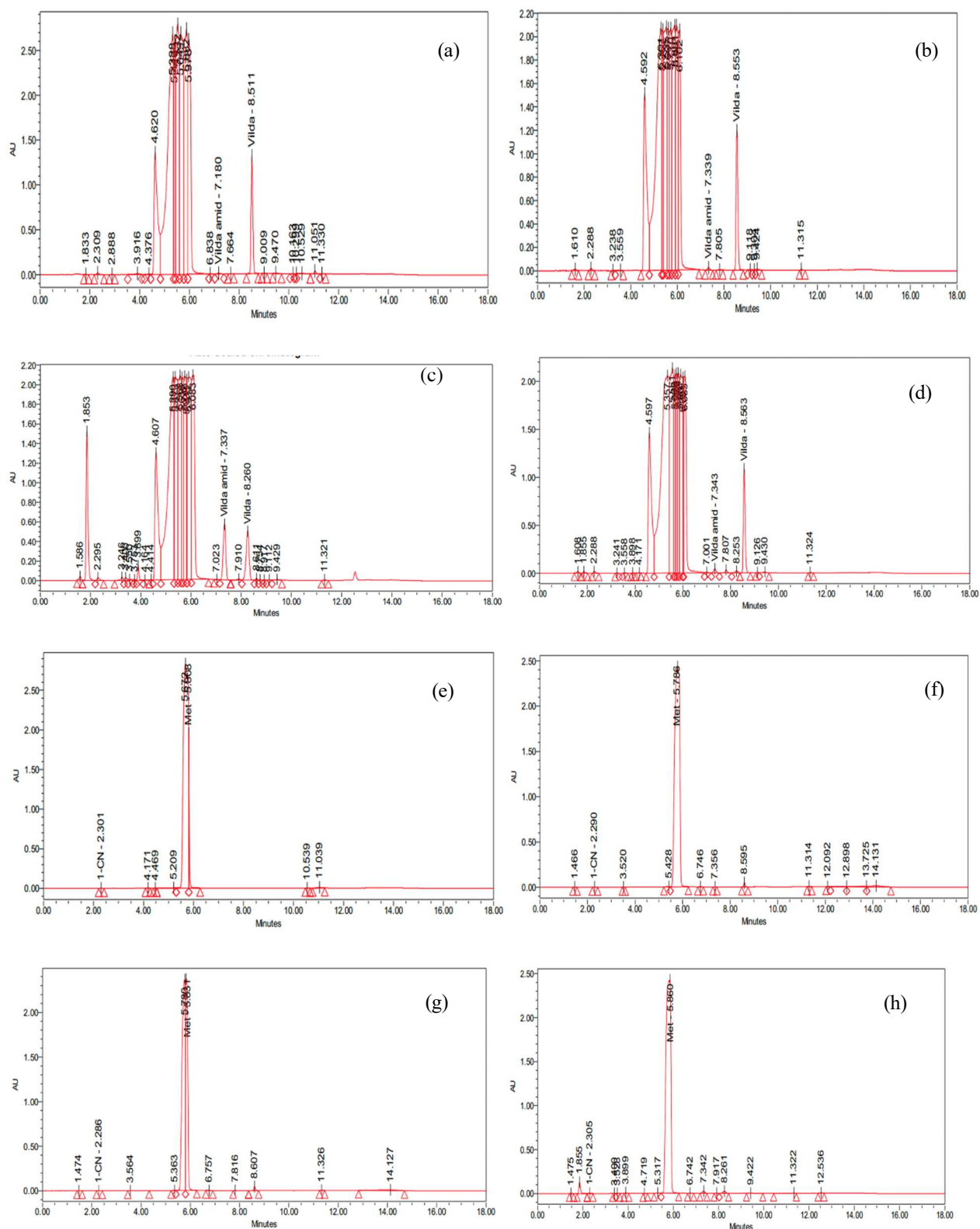
3.4. Thẩm định quy trình phân tích

3.4.1. Độ đặc hiệu

Kết quả cho thấy: Tại bước sóng 218 nm (định lượng tạp 1-cyanoguanidin), sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu giả dược không xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic 1-cyanoguanidin và metformin. Sắc ký đồ mẫu thử, các mẫu thử thêm chuẩn 1-cyanoguanidin và các mẫu thử khác nghiệm xuất hiện pic tạp có độ phân giải tốt (trên 1,5) và đạt độ tinh khiết pic theo phổ UV. Tại bước sóng 210 nm (định lượng tạp vildagliptin amid), sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu giả dược không xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic vildagliptin amid và vildagliptin. Sắc ký đồ mẫu thử, các mẫu thử thêm chuẩn vildagliptin amid và các mẫu thử khác nghiệm xuất hiện pic tạp có độ phân giải tốt (trên 1,5) và đạt độ tinh khiết pic theo phổ UV. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu được minh họa ở Hình 2, Hình 3.



Hình 2. Sắc ký đồ các mẫu khảo sát độ đặc hiệu [Già được - 218 nm (a), Già được - 210 nm (b); Hỗn hợp chuẩn - 218 nm (c); Hỗn hợp chuẩn - 210 nm (d); Dung dịch thử (1) - 218 nm (g); Dung dịch thử (2) - 218 nm (h); Dung dịch thử (3) - 210 nm – phóng to (l); Dung dịch thử (2) thêm chuẩn 1-cyanoguanidin (m)]



Hình 3. Sắc ký đồ của tất cả các mẫu khảo sát độ đặc hiệu – điều kiện khắc nghiệt

Ánh sáng mặt trời - Dung dịch thử vildagliptin 500 µg/ml (a); Ấm/Độ ổn định - Dung dịch thử vildagliptin 500 µg/ml (b), Oxy hóa - Dung dịch thử vildagliptin 500 µg/ml (c), Nhiệt - Dung dịch thử vildagliptin 500 µg/ml (d), Ánh sáng mặt trời - Dung dịch thử metformin hydroclorid 1000 µg/ml (e), Ấm/Độ ổn định - Dung dịch thử metformin hydroclorid 1000 µg/ml (f), Nhiệt - Dung dịch thử metformin hydroclorid 1000 µg/ml (g), Oxy hóa - Dung dịch thử metformin hydroclorid 1000 µg/ml (h)

3.5. Tiêu chuẩn hóa viên nén bao phim hai thành phần metformin hydroclorid và vildagliptin

3.5.1. Độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp định lượng đạt độ tuyến tính với giá trị $r > 0,998$ và khoảng nồng độ của 1-cyanoguanidin và vildagliptin amid lần lượt là 0,052 - 0,261 $\mu\text{g/ml}$ và 0,249 - 1,253 $\mu\text{g/ml}$. Giá trị RSD của nồng độ mẫu thử tìm lại trong mẫu thử giả lập tương ứng độ lặp lại và độ chính xác trung gian không quá 11,0% [4]. Tỷ lệ thu hồi của hai tạp chất chất ở 3 mức nồng độ 50; 100; 125% so với nồng độ tại giới hạn tạp theo ICH(3) đều nằm trong khoảng 80 - 110% với RSD không quá 11,0% [4].

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

Ngoại suy từ phân tích hồi quy tuyến tính của 1-cyanoguanidin và vildagliptin amid: 1-cyanoguanidin (LOD = 0,015 $\mu\text{g/ml}$, LOQ = 0,044 $\mu\text{g/ml}$), vildagliptin amid (LOD = 0,104 $\mu\text{g/ml}$, LOQ = 0,315 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả phân tích cho thấy tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N) tại LOD lớn hơn 3 và tại LOQ lớn hơn 10. Ngoài ra, kết quả phân tích 6 mẫu tại LOQ của 1-cyanoguanidin (dung dịch thử có nồng độ 1-cyanoguanidin khoảng 0,045 $\mu\text{g/ml}$) và vildagliptin

amid (dung dịch thử có nồng độ vildagliptin amid khoảng 0,320 $\mu\text{g/ml}$) ghi nhận giá trị RSD của diện tích pic nhỏ hơn 11,0% [4].

Bảng 5. Pha động khảo sát

Thời gian (phút)	Dung dịch hexansulfonat 0,05% và natri clorid 0,05% pH 3,0 (%)	ACN (%)	Thời gian (phút)	Dung dịch hexansulfonat 0,05% và natri clorid 0,05% pH 3,0 (%)	ACN (%)
Pha động 7			Pha động 8		
0	97	3	0	97	3
2	97	3	1	97	3
5	85	15	5	85	15
25	55	45	12	55	45
25,1	97	3	12,1	97	3
30	97	3	18	97	3
Pha động 9			Pha động 10		
0	97	3	0	97	3
1	97	3	1	97	3
2	91	9	2	91	9
4	85	15	3	85	15
12	55	45	12	55	45
12,1	97	3	12,1	97	3
18	97	3	18	97	3

Bảng 6. Kết quả kiểm tra 3 lô thuốc nghiên cứu theo các chỉ tiêu và mức chất lượng đề xuất (n = 6)

Chỉ tiêu	Phương pháp phân tích		Kết quả phân tích		
			Lô 27RD	Lô 28RD	Lô 29RD
Hình thức cảm quan	Quan sát		Viên bao phim hình bầu dục, màu vàng nâu		
Độ đồng đều khối lượng	Thực hiện theo ĐBVN V, phụ lục 11.3		1162-1173 mg mTB = 1170,5	1158 – 1174 mg mTB = 1165,3	1162 – 1178 mg mTB = 1167,8
Định tính	So sánh thời gian lưu và phổ UV của các pic chính trong sắc ký đồ thử và chuẩn		Đúng	Đúng	Đúng
Độ hòa tan	Thực hiện theo phương pháp HPLC đã xây dựng	Metformin hydroclorid	102,1 - 104,1%	99,8 - 101,2%	99,7 - 102,3%
		Vildagliptin	97,2 - 99,6%	98,5,0 - 101,7%	95,2 - 99,8%
Tạp chất liên quan		1-cyanoguanidin	BQL	BQL	BQL
		Vildagliptin amid	0,12 - 0,14%	0,11 - 0,12%	0,09 - 0,10%
Định lượng		Metformin hydroclorid	103,5 - 104,1%	99,9 - 102,5%	100,1 - 103,4%
		Vildagliptin	99,8 - 101,3%	100,0 - 101,8%	99,6 - 100,2%

BQL: Dưới giới hạn định lượng; LOQ: Giới hạn định lượng (0,01%)

Bảng 7. Yêu cầu chất lượng viên nén bao phim metformin hydroclorid 1000 mg và vildagliptin 50 mg

Chỉ tiêu ICH Q6A [5]	Mức chất lượng đề xuất	Thuyết minh tiêu chuẩn
Hình thức cảm quan	Viên bao phim hình bầu dục, màu vàng nâu	Theo quan sát thực tế viên nén bao phim thành phẩm.
Độ đồng đều khối lượng	Đánh giá theo ĐĐVN V, phụ lục 11.3.	Theo quy định ĐĐVN V, phụ lục 11.3.
Định tính	Thời gian lưu và phổ UV của các pic chính trong sắc ký đồ mẫu thử tương ứng với thời gian lưu và phổ UV các pic metformin và vildagliptin trong sắc ký đồ mẫu chuẩn.	Phương pháp đã được thẩm định và đạt độ đặc hiệu, phù hợp định tính 2 dược chất trong thành phẩm.
Độ hòa tan	Không dưới 75% (Q) metformin hydroclorid và vildagliptin hòa tan sau 30 phút so với hàm lượng ghi trên nhãn. Đánh giá kết quả theo ĐĐVN V, phụ lục 11.4.	Mức chất lượng phù hợp với quy định của ĐĐVN V, phụ lục 11.4 và kết quả phân tích độ hòa tan thành phẩm.
Tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid	1-cyanoguanidin: Không quá 0,02% so với hàm lượng ghi trên nhãn của metformin hydroclorid. Vildagliptin amid: Không quá 0,2% so với hàm lượng ghi trên nhãn của vildagliptin.	Mức chất lượng được xây dựng dựa trên quy định của ICH Q3B(3), tham khảo mức chất lượng thành phẩm chứa metformin hydroclorid và giới hạn tạp tính trên liều dùng tối đa cho phép hằng ngày của 2 dược chất.
Định lượng	95%-105% metformin hydroclorid và vildagliptin so với hàm lượng ghi trên nhãn của metformin hydroclorid và vildagliptin.	Mức chất lượng được thiết lập theo kết quả phân tích trên 3 lô nghiên cứu.

4. BÀN LUẬN

4.1. Quy trình định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong chế phẩm và trong môi trường hòa tan

Hầu hết các quy trình định lượng metformin hydroclorid đã công bố đều sử dụng pha tĩnh là cột trao đổi cation (Partisil SCX), pha động là hỗn hợp dung dịch đệm pH 3,0 và dung môi hữu cơ với tỷ lệ dung môi hữu cơ rất thấp (không quá 5%) [6-9]. Điều này là phù hợp bởi metformin là một base, trong pH acid sẽ tồn tại dạng cation, tương tác và bị phân tách bởi pha tĩnh có các nhóm acid benzensulfonic. Tuy nhiên, điều kiện này không phù hợp để phân tích vildagliptin vì vildagliptin kém phân cực hơn so với metformin, khi sử dụng pha động rất phân cực, khả năng vildagliptin được rửa giải là rất kém; và vildagliptin không tan tốt trong nước, do đó pha động với tỷ lệ dung môi hữu cơ thấp cũng làm giảm khả năng rửa giải hợp chất này; với pha động có pH 3,0, vildagliptin tồn tại dạng cation, do đó bị lưu giữ tốt bởi pha tĩnh có nhóm acid benzensulfonic. Do đó, với pha động và pha tĩnh như trên, phân tích đồng thời metformin và vildagliptin cần thời gian rửa giải rất lâu,

không phù hợp với phân tích định lượng. Nhận thấy dạng tồn tại của metformin và vildagliptin ở pha động pH 3,0 là dạng cation, điều này gợi ý việc sử dụng một tác nhân bắt cặp cation nhằm làm tăng khả năng lưu giữ metformin trên cột pha đảo và không tương tác quá mạnh với vildagliptin. Vì vậy, việc lựa chọn pha tĩnh là cột pha đảo và pha động là hỗn hợp dung môi hữu cơ kết hợp dung dịch đệm chứa natri hexansulfonat pH 3,0 là phù hợp. Tuy nhiên, từ kết quả khảo sát cho thấy khả năng lưu giữ của pha tĩnh C18 đối với cặp ion metformin-hexansulfonat rất tốt, dẫn đến thời gian lưu của metformin khá dài (khoảng 8 phút), giải pháp được đưa ra là sử dụng một tác nhân điện ly (muối natri clorid) giúp cân bằng lại nồng độ anion hexansulfonat trong pha động, từ đó tăng khả năng rửa giải cặp ion metformin-hexansulfonat, giúp tiết kiệm thời gian mà vẫn đạt được khả năng phân tách. Lý giải cho việc lựa chọn natri hexansulfonat làm tác nhân bắt cặp cation là do muối alkansulfonat được coi là tác nhân bắt cặp cation phổ biến và dễ bị rửa giải bằng dung môi hữu cơ để phục hồi pha tĩnh của cột pha đảo, mặt khác, natri hexansulfonat là muối ít độc tính nhất trong số các muối alkansulfonat, không có cảnh báo an toàn hóa học theo phân loại GHS [10]. Ngoài ra, vì độ tan của metformin và

vildagliptin trong nước là khác nhau, do đó lựa chọn chương trình rửa giải gradient tăng dần tỷ lệ dung môi hữu cơ nhằm tăng khả năng phân tách đồng thời cũng giúp rút ngắn thời gian phân tích (10 phút). Bên cạnh đó, một vấn đề quan trọng cần được quan tâm trong xây dựng quy trình phân tích đồng thời metformin và vildagliptin bằng phương pháp HPLC-PDA là hàm lượng của hai dược chất này trong thành phẩm có sự chênh lệch rất lớn (metformin gấp 20 lần vildagliptin), ngoài ra, vildagliptin không có cực đại hấp thụ tại khoảng bước sóng 210 - 400 nm và độ hấp thụ tại bước sóng 210 nm là lớn nhất, tuy nhiên, cường độ hấp thụ cũng rất thấp và ở bước sóng ngắn này hầu hết các chất đều có khả năng hấp thụ do đó khi ở nồng độ thấp, tín hiệu đáp ứng sẽ kém ổn định. Những điều này dẫn đến hệ quả là với cùng độ pha loãng, mẫu thử để định lượng vildagliptin cho tín hiệu đáp ứng ổn định đồng nghĩa với việc nồng độ của metformin rất cao, các thông số sắc ký như hệ số bắt đối hay độ chọn lọc không đạt và có khả năng vượt quá khoảng tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic. Để giải quyết vấn đề này, quy trình định lượng đề xuất thực hiện phân tích bằng hai mẫu thử độc lập với hai độ pha loãng khác nhau cho mỗi phân tích định lượng vildagliptin và metformin hydroclorid. Như vậy, quy trình định lượng đã xây dựng sử dụng cột sắc ký pha đảo thông dụng C18, thành phần pha động không sử dụng các muối đệm vô cơ, khắc phục được nhược điểm hao mòn thiết bị so với các quy trình phân tích đã được công bố.

4.2. Quy trình định lượng tạp 1-cyanoguanidin và vildagliptin amid trong chế phẩm

1-cyanoguanidin là một hợp chất rất phân cực, tương tự với metformin hydroclorid, hầu hết các chuyên luận quy định kiểm soát tạp chất này đều sử dụng cột trao đổi cation (Partisil SCX) với pha động là 100% dung dịch đệm phosphat pH 3,0 [6-9]. Với vildagliptin amid, đây là tạp chất phân hủy từ vildagliptin, và có độ phân cực cao hơn vildagliptin. Qua đó có thể đưa ra nhận định là hầu hết các tạp chất liên quan của thành phẩm chứa metformin hydroclorid và vildagliptin đều là những hợp chất phân cực. Từ nhận định trên, kết hợp với những bàn luận đối với quy trình phân tích định lượng dược chất, việc lựa chọn pha động là hỗn hợp dung môi hữu cơ và dung dịch acid pH 3,0 chứa tác nhân bắt cặp ion (natri hexansulfonat) kết hợp với tác nhân điện ly (natri clorid) là phù hợp đối với các đối tượng phân tích. Tuy nhiên, như đã trình bày ở trên,

1-cyanoguanidin có tính phân cực cao hơn metformin, do đó trong việc cải thiện khả năng phân tách hai hợp chất này trên cột sắc ký pha đảo, độ phân cực của pha động được xem là yếu tố quyết định. Và quy trình được lựa chọn đã áp dụng chương trình rửa giải gradient bắt đầu bằng hệ pha động có tỷ lệ dung môi pha nước cao trong giới hạn cho phép trên cột pha đảo dC18 là 97% trong khi tỷ lệ này trên cột pha đảo C18 thông thường là 90%. Điều này được giải thích là do ưu điểm của cột dC18 so với cột C18 thông thường là dC18 có khả năng lưu giữ các hợp chất phân cực tốt hơn và việc loại bỏ hoàn toàn dung môi hữu cơ trong pha động không làm ảnh hưởng đến tuổi thọ cột. Quy trình phân tích đã được xây dựng sử dụng cột pha đảo dC18, 100 Å giúp khắc phục được nhược điểm của cột pha đảo C18, đồng thời thời gian phân tích tương đối ngắn (18 phút) so với các quy trình phân tích đã công bố [11-13]. Ngoài ra, kết quả khảo sát bước sóng phát hiện cho thấy, vildagliptin amid không có cực đại hấp thụ trong khoảng bước sóng 210 - 400 nm, đồng thời độ hấp thụ giảm đáng kể khi tăng độ dài sóng từ 210 đến 220 nm và 1-cyanoguanidin có cực đại hấp thụ ở bước sóng 218 nm và độ hấp thụ giảm khi giảm độ dài sóng. Mặt khác, 1-cyanoguanidin rửa giải khá sớm, ngay sau thời gian chết của cột, do đó, việc lựa chọn bước sóng phát hiện ở khoảng bước sóng ngắn 210 - 215 nm sẽ làm cho tín hiệu của 1-cyanoguanidin bị ảnh hưởng bởi tín hiệu dung môi. Vì những lý do trên, phương pháp xây dựng lựa chọn 2 bước sóng riêng biệt để định lượng 1-cyanoguanidin (218 nm) và vildagliptin amid (210 nm) là phù hợp. Quy trình cũng đã được khảo sát độ đặc hiệu trên các mẫu phân hủy, kết quả cho thấy, quy trình phân tích phù hợp để phát hiện các tạp phân hủy khác nếu có trong nghiên cứu độ ổn định thành phẩm.

4.3. Tiêu chuẩn hóa viên nén bao phim hai thành phần metformin hydroclorid và vildagliptin

Căn cứ quy định của ĐĐVN hiện hành và các dược điển tham chiếu đối với thành phẩm chứa metformin hydroclorid và quy định của ICH hướng dẫn về tiêu chuẩn chất lượng của thành phẩm thuốc, các chỉ tiêu và mức chất lượng tương ứng đã được đề xuất cho thành phẩm viên nén bao phim chứa 1000 mg metformin hydroclorid và 50 mg vildagliptin. Ngoài ra, đối với một số chỉ tiêu như: hình thức cảm quan và định lượng, mức chất lượng được đề xuất dựa vào thống kê kết quả phân tích trên 3 lô thành phẩm nghiên cứu (n = 6). Bên cạnh đó, vì việc thiết lập các chỉ tiêu tạp phân hủy bất kỳ và tổng tạp cần dựa trên

kết quả phân tích của các mẫu lưu độ ổn định ở điều kiện cấp tốc và dài hạn, hiện tại, việc khảo sát độ ổn định vẫn đang được thực hiện, vì vậy, tiêu chuẩn chất lượng đề xuất không bao gồm mức chất lượng cho tạp phân hủy bất kỳ và tổng tạp.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng metformin hydroclorid và vildagliptin trong môi trường hòa tan và trong chế phẩm hai thành phần metformin hydroclorid và vildagliptin và quy trình định lượng tạp 1-cyanoguanidin và tạp vildagliptin amid trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC-PDA và đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho thành phẩm viên nén bao phim hai thành phần metformin hydroclorid 1000 mg và vildagliptin 50 mg. Tiêu chuẩn chất lượng đã được xây dựng là cơ sở để theo dõi độ ổn định của thành phẩm, đồng thời tiến hành ghi nhận kết quả phân tích tạp chất liên quan và đề xuất mức chất lượng cho chỉ tiêu tạp phân hủy bất kỳ và tổng tạp.

Nguồn tài trợ

Nghiên cứu này không nhận tài trợ.

Xung đột lợi ích

Không có xung đột lợi ích nào liên quan đến nghiên cứu này.

ORCID

Nguyễn Đức Tuấn

<https://orcid.org/0000-0001-9479-403X>

Đóng góp của các tác giả

Ý tưởng nghiên cứu: Nguyễn Đức Tuấn.

Đề cương và phương pháp nghiên cứu: Phạm Lê Ngọc Yến, Nguyễn Đức Tuấn.

Thu thập dữ liệu: Phạm Lê Ngọc Yến.

Giám sát nghiên cứu: Nguyễn Đức Tuấn.

Nhập dữ liệu: Phạm Lê Ngọc Yến.

Quản lý dữ liệu: Phạm Lê Ngọc Yến.

Phân tích dữ liệu: Phạm Lê Ngọc Yến.

Viết bản thảo đầu tiên: Phạm Lê Ngọc Yến, Nguyễn Đức Tuấn.

Góp ý bản thảo và đồng ý cho đăng bài: Nguyễn Đức Tuấn.

Cung cấp dữ liệu và thông tin nghiên cứu

Tác giả liên hệ sẽ cung cấp dữ liệu nếu có yêu cầu từ Ban biên tập.

Chấp thuận của Hội đồng Đạo đức

Nghiên cứu này miễn trừ Hội đồng Đạo đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. NPS MedicineWise. Sitagliptin, vildagliptin and saxagliptin - dipeptidyl peptidase-4 inhibitors ('gliptins') for add-on therapy in type 2 diabetes mellitus. Radar. 2021 [cited 2024 July 24]. <https://www.nps.org.au/radar/articles/sitagliptin-vildagliptin-and-saxagliptin-dipeptidyl-peptidase-4-inhibitors-gliptins-for-add-on-therapy-in-type-2-diabetes-mellitus#revision-history>.
2. NPS MedicineWise. Vildagliptin with metformin (Galvumet) fixed-dose combination tablets PBS listed for type 2 diabetes. Radar. 2021 [cited 2024 July 18]. <https://www.nps.org.au/radar/articles/vildagliptin-with-metformin-galvumet-fixed-dose-combination-tablets-pbs-listed-for-type-2-diabetes>.
3. ICH Harmonized Tripartite Guideline. impurities in new drug substances. Japan-USA: European Union;2020. p. 3-7.
4. AOAC International. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. 2019. p.9.
5. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. Japan-USA: European Union;2020. p9-10J.
6. Bộ Y Tế. Dược điển Việt Nam V, Nhà Xuất Bản Y học, Hà Nội;2017. p.74-76; 622-623.
7. Stationery Office (2022). Monograph: metformin hydrochloride, metformin tablets, metformin oral solution, metformin prolong-release tablets. In:

- British Pharmacopoeia, pp.II-249, II-251, III-968,III-971. Medicines and Healthcare, London.
8. European Pharmacopoeia 11.0. Monograph: Metformin hydrochloride, 11th ed. France: Council of Europe; 2023.3359-3360.
 9. US Pharmacopoeia Natural Formulary. Monograph: Metformin Hydrochloride, Metformin Hydrochloride Tablets. In: USP 45-NF 40, USA;2022. p.2821-2823.
 10. Compound summary for CID 23696962: sodium 1-hexanesulfonate monohydrate. PubChem Compound Database. [cited 2024 July 18]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-1-hexanesulfonate-monohydrate>.
 11. Kumar N, Devineni SR, Singh G, Kadirappa A, Dubey SK, Kumar P. Identification, isolation and characterization of potential process-related impurity and its degradation product in vildagliptin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015;119:114-121.
 12. Al-Qudah E, Arar S, Sweidan K. Forced degradation studies of vildagliptin raw material alone and in the presence of excipients using HPLC-UV analysis. Journal of Excipients and Food Chemicals. 2020;11:29-41.
 13. Shan H, Zhang M. determination of related substances in vildagliptin tablets by HPLC. China Pharmacy. 2017;28(15):2138-2141.