

# Phân tích đồng phân quang học amlodipin bằng HPLC sử dụng cột sắc kí lux cellulose

Nguyễn Thảo Hạnh Ngân<sup>1\*</sup>, Lê Thị Thu Cúc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>2</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh

nthngan@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Amlodipin (AM) gồm hai đồng phân (S)-AM (S) và (R)-AM (R), tuy nhiên, chỉ có (S) được sử dụng. Hiện nay, chưa có chuyên luận riêng cho (S) trong dược điển và phương pháp định lượng, tách (S), (R) tối ưu. Nghiên cứu sử dụng HPLC với các đối tượng nghiên cứu gồm viên nén AM 5 mg; (S)-AM 2,5 mg và 5 mg; chất đối chiếu AM besilat; (S)-AM besilat; các hóa chất, dung môi đạt chuẩn phân tích; các cột tách gồm lux cellulose-(1,2,3,4). Trình tự tiến hành: trước tiên, khảo sát cột, đánh giá khả năng tách. Tiếp theo khảo sát pha động, chọn hệ pha động phù hợp nhất. Cuối cùng, thẩm định phương pháp (theo ICH). Kết quả cho thấy cột lux cellulose-4 tách được hoàn toàn hỗn hợp tại bước sóng 237 nm với hệ acetonitril-ethanol-diethylamin tỉ lệ 90:10:0,1 (v:v:v). Khi thẩm định, phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng với độ phân giải > 2,5, phạm vi định lượng từ (0,1-1) µg/mL, độ lệch chuẩn tương đối < 2 % (n = 6), độ phục hồi (98-102) %. Như vậy, HPLC dùng cột lux cellulose-4 với hệ acetonitril-ethanol-diethylamin (90:10:0,1) phù hợp tách (S) và (R), là một phương pháp mới để định lượng riêng (S), kiểm nghiệm các chế phẩm chứa AM hoặc (S) trên thị trường.

Nhận 03/03/2023

Được duyệt 10/05/2023

Công bố 25/06/2023

Từ khóa

amlodipin, định lượng, HPLC, lux cellulose, S-amlodipin

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Đặt vấn đề

Amlodipin (AM) là thuốc chẹn kênh calci, có khả năng chẹn kênh calci được sử dụng trong điều trị bệnh cao huyết áp và chứng đau thắt ngực. AM được sử dụng trong điều trị chứng đau thắt ngực ổn định mạn tính và trong điều trị tăng huyết áp từ nhẹ đến trung bình [1]. Giống như các thuốc nhóm chẹn kênh calci khác, AM thường được sử dụng dưới dạng racemic. Tuy nhiên, đối quang (R) và (S) của AM không có cùng hoạt tính sinh học. Chỉ (S)-AM có thuộc tính giãn mạch, trong khi (R)-AM có các tác dụng phụ như phù, đau đầu, chóng mặt, ... Khả năng chẹn kênh calci của đồng phân (S) mạnh hơn đồng phân (R) khoảng 1.000 lần trên chuột [2]. Do sự khác biệt đáng kể về dược động học

giữa hai dạng đồng phân quang học này và để cải thiện tính an toàn và hiệu quả, AM đã được sản xuất dưới dạng đồng phân (S) được đưa ra thị trường vài năm trước [3]. Vì vậy, đồng phân (R) coi như là tạp chất nên hạn chế sử dụng và cần được thực hiện bởi các phương pháp phân tích nhanh và hiệu quả [4].

Phân tích, phân tách đồng phân quang học là một công việc rất khó khăn, do chúng có bản chất hoàn toàn giống nhau về công thức phân tử giữa các đồng phân đối quang. Các đồng phân này chỉ khác nhau về cấu trúc không gian [5]. Do đó, chỉ có một số ít các phương pháp được sử dụng như điện di mao quản, sắc kí lỏng ghép khối phổ (GC-MS), sắc kí lỏng siêu tới hạn, sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC), ... Hiện nay, bên cạnh các phương pháp tách đồng phân cổ điển (tạo mầm,



sinh hóa, cơ học, hóa học), đã có những nghiên cứu quan trọng trong kỹ thuật tách đồng phân hiện đại gồm kỹ thuật sắc kí và kỹ thuật điện di. Phương pháp điện di ít phổ biến hơn vì quy trình phân tích kém ổn định. Trong khi đó, phương pháp sắc kí có vai trò quan trọng trong điều chế cũng như phân tích đồng phân quang học, bao gồm sắc kí lớp mỏng, sắc kí khí, HPLC; cho kết quả phân tích tin cậy, ổn định, chính xác [6-9]. Tác giả Ratih Ratih và cộng sự (2022) nghiên cứu tối ưu hóa phương pháp sắc kí điện động mao dẫn đối quang để tách các chất đồng phân AM sử dụng maltodextrin làm chất chọn lọc đối quang. Kết quả tối ưu hóa cho thấy nồng độ maltodextrin (7,5-10) % (w/v) thể hiện tác động mạnh nhất đến độ phân giải, Sự gia tăng nồng độ maltodextrin dẫn đến tính chọn lọc lập thể lớn hơn, được thể hiện bằng các giá trị độ phân giải cao hơn ( $R_s \geq 1,5$ ). Các điều kiện tách trong nghiên cứu đề xuất là khả thi trong phạm vi áp dụng với độ phân giải chấp nhận được [10-13]. Tác giả Valliappan Kannappan và cộng sự (2016) nghiên cứu tách đối quang đồng thời và xác định độ tinh khiết đối quang của AM và atenolol bằng phương pháp sắc kí lỏng sử dụng pha động chứa ACN, ethanol và DEA (92:8:0,2) % (v/v/v) trên cột Lux cellulose-4. Các đồng phân đối quang được theo dõi ở bước sóng 240 nm và quá trình phân tách đạt được trong vòng 8 phút. Phương pháp được thẩm định về độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chụm, giới hạn phát hiện (LOD) và định lượng. Phương pháp được cho là tuyến tính ( $R^2 \geq 0,991$ ), chính xác (99,8-101,4) % và đúng (%RSD  $\leq 3$ ). Phương pháp có thể dùng cho kiểm định độ tinh khiết thường quy của AM và atenolol trong các công thức dược phẩm [14]. Tại Việt Nam, các tác giả Lê Đình Chi và Thái Nguyễn Hùng Thu (2013) đã nghiên cứu phân tích đồng phân đối quang của AM bằng phương pháp điện di mao quản. Trong đó, quy trình phân tích các đồng phân đối quang của AM bằng điện di mao quản trên mao quản silica nung chảy sử dụng carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin (CMCD) làm chất chọn lọc hoạt quang đã được xây dựng, thẩm định và

kiểm tra AM racemic, S-AM và R-AM. Kết quả thực nghiệm cho thấy quy trình thiết lập được phù hợp cho ứng dụng định tính, định lượng S-AM, AM racemic trong các chế phẩm thuốc chứa hai dạng hoạt chất kể trên và kiểm tra tạp đối quang R-AM trong chế phẩm chứa S-AM [15]. Nhìn chung, các nghiên cứu về phân tách đồng phân quang học AM đều được thực hiện trong khoảng gần 10 năm trở lại đây, chứng tỏ sự cần thiết trong phân tích các đồng phân này, đặc biệt trong lĩnh vực dược phẩm. Các nghiên cứu đa phần sử dụng phương pháp điện di mao quản, tuy nhiên, phương pháp này tương đối khó thực hiện do có nhiều yếu tố gây nhiễu và không phổ biến trong các phòng kiểm nghiệm tại các nhà máy dược phẩm Việt Nam. Một số nghiên cứu sử dụng HPLC nhưng chưa hoàn thiện, hoặc cột và các chất đánh dấu rất đắt tiền, không phù hợp điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này sử dụng HPLC (hệ thống Shimadzu, đầu đo khối phổ PDA phổ biến tại Việt Nam) với các hệ dung môi phổ biến (như acetonitril, ethanol, methanol, nước cất, một số hệ đệm) và các loại cột tách đặc trưng (lux cellulose) để phân tách đồng phân quang học của AM, cụ thể là:

- Khảo sát loại cột sắc kí phù hợp để tách hoàn toàn 2 đồng phân AM theo các tiêu chí đề ra, mục tiêu định lượng S-AM là chủ yếu
- Khảo sát hệ pha động và điều kiện sắc kí phù hợp cho tách và định lượng riêng (S)-AM
- Thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của ICH, đề xuất quy trình định lượng và tách (S)-AM.

## 2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu, chất đối chiếu, trang thiết bị, dung môi và hóa chất

Đối tượng nghiên cứu bao gồm:

- Viên nén amlodipin 5 mg
- Viên nén (S)-amlodipin 2,5 mg
- Viên nén (S)-amlodipin 5 mg

Các chất đối chiếu sử dụng trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 1:

**Bảng 1** Các chất đối chiếu được sử dụng trong nghiên cứu

Chất đối chiếu	Hàm lượng tính trên chế phẩm nguyên trạng (%)	Số lô	Xuất xứ
Amlodipin besilat	100,00	QT145100	Viện Kiểm nghiệm
(S)-amlodipin besilat	92,78	QT248010	thuốc TP. HCM

Thiết bị và phụ kiện sử dụng:

- Máy HPLC SHIMADZU UFLC 20A, đầu dò PDA.
- Cột lux cellulose-1 (cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamat) (250 × 4,6 mm; 5 μm).
- Cột lux cellulose-2 (cellulose tris(3-cloro-4-methylphenyl carbamat) (250 × 4,6 mm; 5 μm)
- Cột lux cellulose-3 (cellulose tris(5-cloro-2-methylphenyl carbamat) (250 × 4,6 mm; 5 μm).
- Cột lux cellulose-4 (cellulose tris(4-chloro-3-methylphenyl carbamat) (250 × 4,6 mm; 5 μm).
- Cân phân tích điện tử Mettler Toledo AT200, bể siêu âm Hwashin, bình định mức, pipet chính xác, ống đong, cốc có mỏ và một số dụng cụ khác. Các thiết bị phân tích và dụng cụ phân tích đã được hiệu chuẩn đạt quy định theo GLP và ISO/IEC 17025. Các dung môi và hóa chất sử dụng bao gồm: methanol, acetonitril, isopropanol dùng cho HPLC (J.T. Baker); acid trichloroacetic, ethanol, diethylamin (Merck). Các dung môi và hóa chất khác đạt chuẩn phân tích.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các tác nhân đối quang và pha động được thay đổi nhằm chọn điều kiện phân tích đáp ứng các yêu cầu với các thông số: hai peak đồng phân phải tách nhau hoàn toàn với độ phân giải  $R_s > 1,5$ ; đáp ứng đầu dò cao, hệ số bất đối  $A_s$  của peak nằm trong khoảng (0,8-1,5) [11,16].

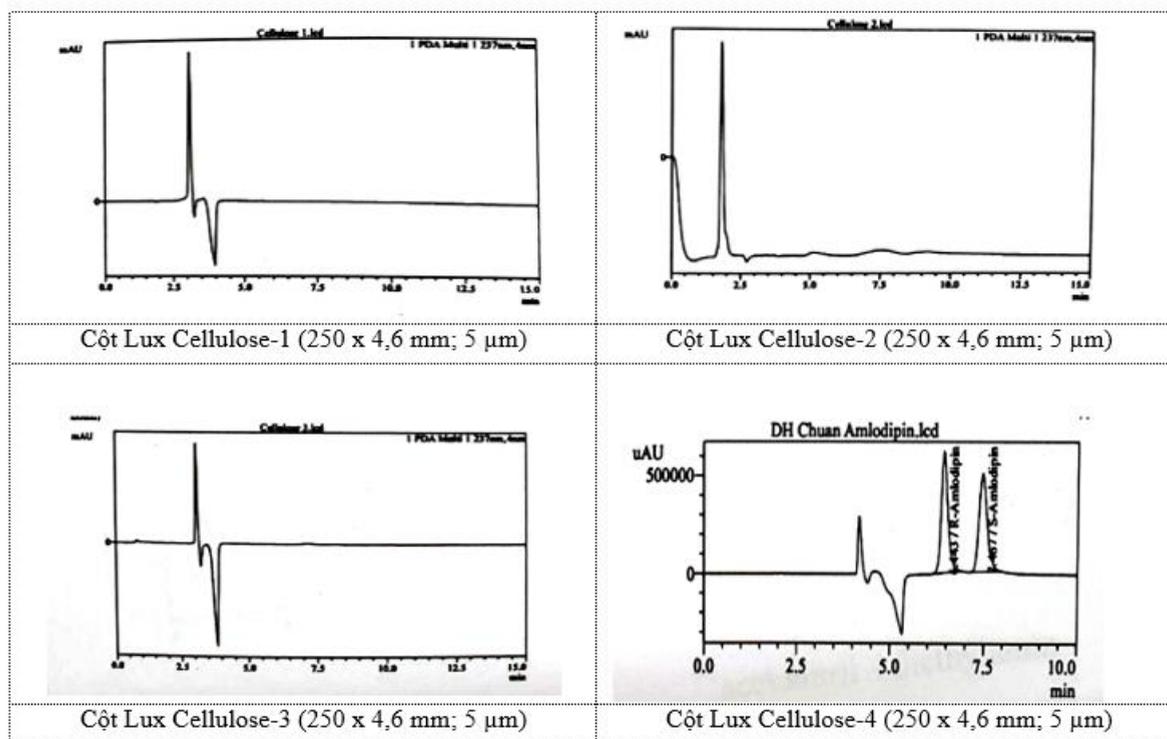
## Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Dung dịch mẫu chuẩn AM (500 μg/mL) và dung dịch mẫu chuẩn (S)-AM (250 μg/mL): cân chính xác 25 mg AM chuẩn hoặc 12,5 mg (S)-AM chuẩn, cho vào bình định mức 50 mL, thêm 35 mL methanol, siêu âm 10 phút, lắc đều, thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μm.
- Dung dịch mẫu thử AM và mẫu thử (S)-amlodipin: cân 20 viên nén AM hoặc (S)-amlodipin, xác định khối lượng trung bình thuốc trong nang. Cân lượng thuốc đã nghiền mịn tương ứng với 30 mg (S)-AM, cho vào bình định mức 50 mL, thêm 35 mL methanol, siêu âm 10 phút, lắc đều, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μm.
- Dung dịch mẫu trắng: dung môi hòa tan mẫu là methanol.

## 3 Kết quả và bàn luận

### 3.1 Kết quả khảo sát cột sắc kí

Nghiên cứu ấn định các thông số sau: hệ pha động, tốc độ dòng, nhiệt độ cột và bước sóng 237 nm, tiến hành khảo sát khả năng tách với 4 loại cột nêu trong phương pháp nghiên cứu. Kết quả khảo sát khả năng tách AM chuẩn được trình bày trong Hình 1 (gồm 4 sắc kí đồ tương ứng 4 loại cột chiral):



**Hình 1** Sắc kí đồ khảo sát khi thay đổi các loại cột cellulose khác nhau

Theo Hình 1, với cùng điều kiện sắc kí, các cột lux cellulose-1, 2 và 3 chỉ cho 1 peak duy nhất, chứng tỏ chưa tách được hỗn hợp đồng phân. Đối với cột lux cellulose-4, xuất hiện 2 peak tại các thời điểm 6,443 phút và 7,467 phút. Peak tại thời điểm 6,443 phút tương ứng với thời gian lưu của peak mẫu chuẩn (S)-AM. Hai peak có diện tích, chiều cao tương đối giống nhau và tách nhau hoàn toàn. Các cột còn lại chỉ cho thấy tín hiệu nhiễu tại thời gian khoảng (2-5) phút, không cho thấy tín hiệu của AM cũng như không phân tách được. Ngoài ra, thời gian lưu nằm trong khoảng (5-10) phút, tương đối phù hợp để tiến hành thực nghiệm, tiết kiệm được thời gian nghiên cứu, dung môi. So với nghiên cứu của Valliappan Kannappan và cộng sự, hệ pha động trong nghiên cứu này không cần bổ sung chất hoạt hóa tetraetylenamin mà vẫn đảm bảo tách được 2 đồng phân dưới 10 phút, cho kết quả tách khá tốt [14]. Rõ ràng, cột lux cellulose-4 thể hiện rõ vai trò tách hỗn hợp racemic của AM. Điều này có thể giải thích được thông qua sự phù hợp về cấu trúc không gian và ái lực khác nhau của nhóm bất đối (chiral) clo-benzen trong (S)-AM và (R)-AM với cellulose tris(4-chloro-3-methylphenyl carbamat) trong lux cellulose-4. Đối với (S)-AM, nhóm bất đối có ái lực thấp hơn, do đó, cho thời gian lưu thấp (khoảng 6 phút), trong khi đó ở (R)-AM, nhóm bất đối có ái lực lớn hơn, khiến thời gian lưu lớn hơn (khoảng 7 phút). Các cột cellulose khác với các chất nhồi cột cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamat), cellulose tris(3-cloro-4-methylphenyl carbamat) và cellulose tris(5-cloro-2-methylphenyl carbamat) cho ái lực giống nhau giữa

(S)-AM và (R)-AM, do đó, không thể tách được hai đồng phân này. Khả năng tách của lux cellulose-4 phụ thuộc hoàn toàn vào pha tĩnh, không phụ thuộc vào chất đối quang bổ sung vào hệ dung môi. Do đó, so với nghiên cứu [17] sử dụng tác nhân đối quang là SBE- $\beta$ -CD và 0,3 mM PEG (trong hệ đệm  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM, pH = 2,5), nghiên cứu này dùng đặc tính riêng biệt của cột lux cellulose với các chất nhồi pha tĩnh đã có sẵn tác nhân chọn lọc đối quang, không làm cho việc pha chế phức tạp. Ngoài ra, việc sử dụng hệ đệm trong pha động về lâu dài làm ảnh hưởng tuổi thọ cột sắc kí, khó khăn cho việc rửa và ổn định cột, cũng như PEG là polymer có tính bám dính rất cao, làm giảm tuổi thọ cột [17]. Chính vì vậy, việc sử dụng cột lux cellulose-4 mà không sử dụng tác nhân đối quang, hệ đệm, polymer cho rất nhiều ưu điểm, đặc biệt là tính tiện lợi, nhanh chóng, sử dụng cột được lâu dài và ổn định. Do đó, cột lux cellulose-4 (250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) được lựa chọn để tiếp tục khảo sát trong các giai đoạn tiếp theo.

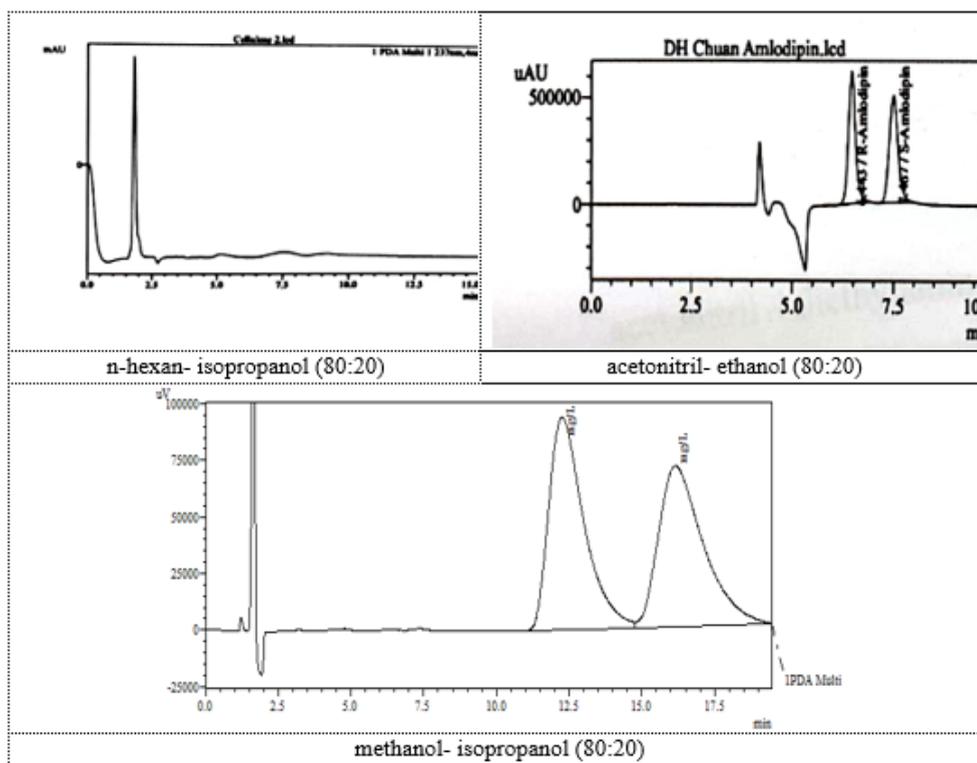
**Bảng 2** Các hệ pha động khảo sát

Điều kiện	Pha động
1	n-hexan- isopropanol (80:20) (v:v)
2	acetonitril- ethanol (80:20) (v:v)
3	methanol- isopropanol (80:20) (v:v)

### 3.2 Kết quả khảo sát pha động

#### 3.2.1 Khảo sát hệ pha động

Các hệ pha động khảo sát được thể hiện trong Bảng 2. Các điều kiện khảo sát này được dựa trên kinh nghiệm nghiên cứu cũng như tham khảo các chuyên gia về sắc kí lỏng. Sắc kí đồ các hệ pha động khảo sát được trình bày trong Hình 2:



**Hình 2** Sắc kí đồ các hệ pha động khảo sát

Theo Hình 2, mặc dù cùng sử dụng cột lux cellulose-4 cho vai trò tách tốt đối với hỗn hợp racemic của AM, tuy nhiên, khi thay đổi hệ pha động với các điều kiện khác nhau, kết quả tách trở nên rất khác biệt. Trong HPLC, pha động đóng vai trò quan trọng không kém pha tĩnh, đặc biệt trong ái lực với hoạt chất, thể hiện thông qua nhiều thông số, trong đó có độ phân cực, độ nhớt, pH, ... Trong ba hệ pha động, hệ n-hexan-isopropanol (80:20) không thấy sự phân tách các peak đồng phân. Hai hệ acetonitril-ethanol và methanol-isopropanol cho sự tách 2 peak đồng phân, trong đó hệ acetonitril-ethanol cho thời gian lưu ngắn hơn và hệ số phân giải giữa 2 peak cao hơn so với hệ methanol-isopropanol ở cùng tỉ lệ pha động. Điều này có thể giải thích được do độ phân cực của hệ có sự thay đổi đáng kể. Trong ba hệ khảo sát, hệ n-hexan và isopropanol có độ phân cực thấp nhất (trung bình khoảng 6,1), hệ acetonitril và methanol có độ phân cực cao nhất (khoảng 15,0) và hệ methanol-isopropanol cho độ phân cực trung bình (khoảng 9,0). Như vậy, khi tăng độ phân cực trong dung môi, hỗn hợp racemic có thể tách ra dễ dàng do ái lực khác nhau với dung môi phân cực. Đặc biệt, hệ acetonitril-ethanol có độ phân cực cao nhất nhưng thời gian lưu ở mức thấp hơn so với hệ

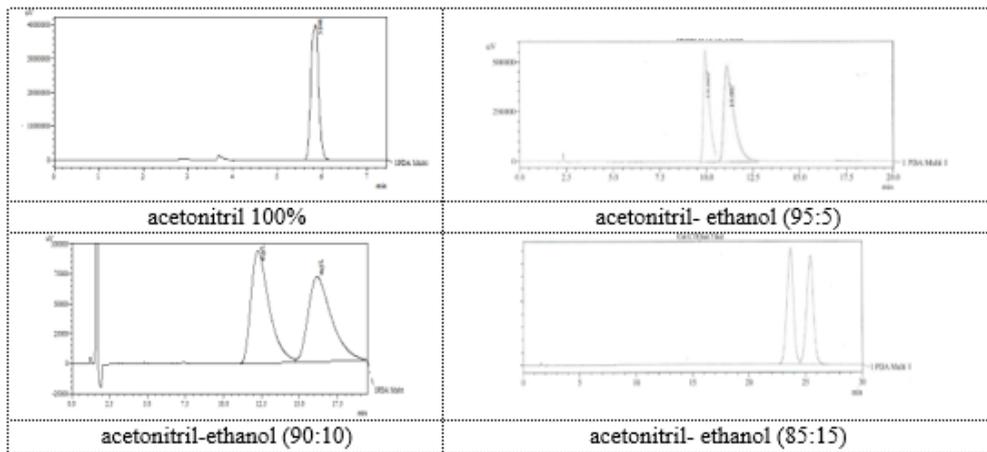
methanol-isopropanol, điều này có thể giải thích được do các nhóm chức hydroxyl ( $-OH$ ) trong hỗn hợp methanol-isopropanol có ái lực mạnh với các nhóm  $=NH$ ,  $-NH_2$  trong amlodipin. Với mục tiêu vừa tách được hỗn hợp đồng phân, đặc biệt chú trọng đến định lượng (S)-AM thì việc phân tách ở thời gian nhỏ hơn 10 phút cho khả năng tiết kiệm cao hơn. So với các hệ pha động khác, hệ pha động này cũng tương đối rẻ tiền và tiết kiệm (so với các hệ pha động sử dụng thêm tetraetylenamoni, n-hexan, ..., trong các nghiên cứu trước). Do đó, nghiên cứu chọn hệ pha động là hệ acetonitril-ethanol (80:20) để đánh giá trong các giai đoạn tiếp theo.

### 3.2.2. Khảo sát tỉ lệ pha động

Các tỉ lệ pha động của hỗn hợp acetonitril và ethanol được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 3** Các tỉ lệ pha động khảo sát

Điều kiện	Tỉ lệ pha động
1	acetonitril 100 %
2	acetonitril-ethanol (95:5)
3	acetonitril-ethanol (90:10)
4	acetonitril-ethanol (85:15)



**Hình 3** Sắc kí đồ khảo sát khi thay đổi các tỉ lệ pha động khác nhau

Sắc kí đồ các hệ pha động khảo sát theo các tỉ lệ khác nhau được trình bày trong Hình 3; khi thay đổi tỉ lệ pha động của hệ acetonitril-ethanol ảnh hưởng đến khả năng phân tách 2 peak đồng phân và thời gian lưu của 2 peak. Giống như biện luận trên, khi tăng tỉ lệ ethanol trong pha động dẫn tới tăng thời gian lưu và đồng thời cải thiện độ phân giải giữa 2 peak. Điều này có thể giải thích được do thành phần các nhóm -OH trong pha động tăng lên, dẫn đến ái lực cao với các nhóm =NH và -NH<sub>2</sub> trong AM. Do đó, nếu tỉ lệ ethanol tăng cao đến 15 % thì thời gian phân tích sẽ kéo dài trên 25 phút mà độ phân giải lại không được cải thiện đáng kể. Để tách tốt hỗn hợp, ngoài thời gian lưu thấp, độ phân giải cao

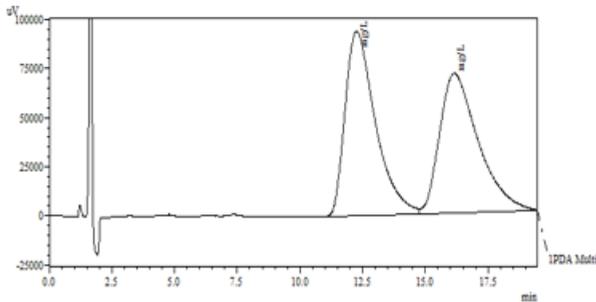
là mục tiêu tiếp theo. Vì vậy, nghiên cứu chọn tỉ lệ pha động acetonitril-ethanol 90:10 cho giai đoạn sau.

**Bảng 4** Các điều kiện tiến hành khi bổ sung chất tối ưu hóa

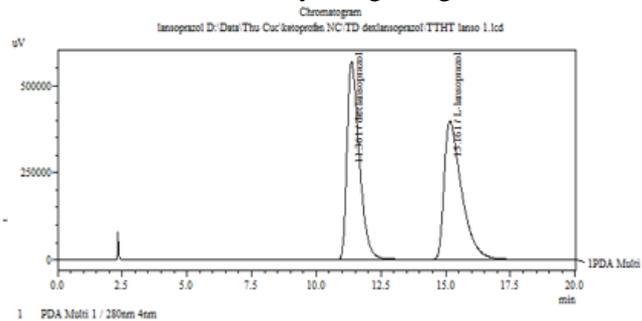
Điều kiện	Pha động
1	acetonitril-ethanol (90:10)
2	acetonitril-ethanol-diethylamin (90:10:0,1)
3	acetonitril-ethanol-acid trichloroacetic (90:10:0,1)

3.2.3 Khảo sát chất tối ưu hóa

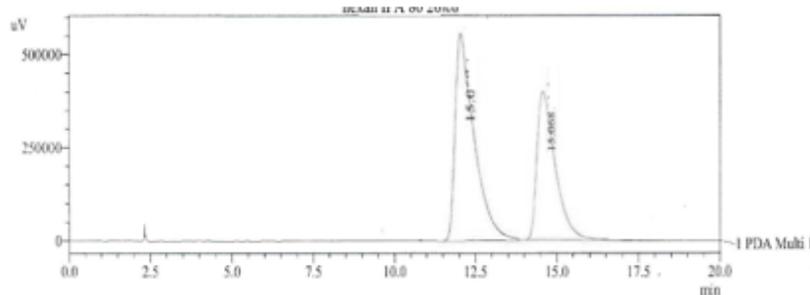
Nghiên cứu tiến hành bổ sung diethylamin hoặc trichloroacetic acid vào hệ pha động để khảo sát khả năng phân tách và tối ưu hóa quy trình. Các điều kiện khảo sát được trình bày trong Bảng 4.



Acetonitril-ethanol (90:10)



Acetonitril-ethanol-diethylamin (90:10:0,1)



Acetonitril-ethanol-acid trichloroacetic (90:10:0,1)

**Hình 4** Sắc kí đồ các hệ pha động khi thêm chất tối ưu hóa

Sắc kí đồ tương ứng với từng điều kiện được thể hiện trong Hình 4; để cải thiện độ phân giải của các peak, nghiên cứu đã khảo sát 2 chất thêm vào pha động là diethylamin và acid trichloroacetic với tỉ lệ 0,1 %. Trong đó, nhận thấy khi thêm diethylamin vào thì giảm hiện tượng dẫn peak phân tích, đồng thời cũng cải thiện độ phân giải  $R_s$  lên 2,46. Còn acid trichloroacetic khi thêm vào làm tăng thời gian lưu. Điều này có thể giải thích do sự thay đổi đặc tính dung môi khi bổ sung diethylamin và acid trichloroacetic. Khi sử dụng diethylamin, các nhóm  $-NH$  (đã bão hòa electron) góp phần đẩy nhanh hơn các nhóm  $=NH$  và  $-NH_2$  trong AM, đồng thời nhóm  $-CH_3$  có tính ưa dầu, giúp đẩy nhanh các nhóm kỵ nước trong AM ra khỏi cột sắc kí, khiến thời gian lưu giảm xuống và độ phân giải cải thiện. Đối với acid trichloroacetic, các nhóm carboxyl ( $-COOH$ ) trong acid này làm tăng ái lực với các nhóm

ưa nước trong AM, khiến thời gian lưu chậm hơn. Ngoài ra, môi trường acid cũng khiến hoạt chất AM không bền [18]. Như vậy, nghiên cứu lựa chọn hệ pha động: acetonitril-ethanol-diethylamin (90:10:0,1) để tiến hành thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH. Đối với riêng đồng phân (S)-AM, việc tách được đồng phân này trong hỗn hợp racemic của AM bằng việc sử dụng cột lux cellulose-4 và hệ dung môi có bổ sung diethylamin cho thấy khả năng định lượng riêng (S)-AM trong các mẫu nguyên liệu hoặc mẫu thuốc trên thị trường hiện nay, có riêng hoặc không có riêng (S)-AM. Việc thẩm định theo ICH nhằm chứng minh tính tin cậy của phương pháp, đặc biệt trong hướng mục tiêu định lượng riêng (S)-AM trong hỗn hợp.

3.4. Kết quả thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH

3.4.1. Tính phù hợp hệ thống

**Bảng 5** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của mẫu chuẩn AM (n = 6)

STT	S (Diện tích peak) (mAU) (%RSD $\leq 2$ )		$T_R$ (Thời gian lưu - phút) (%RSD $\leq 2$ )		$A_S$ (Hệ số bất đối) $0,8 \leq A_S \leq 1,5$		$R_S$ (Độ phân giải) $R_S \geq 1,5$
	AM	(S)-AM	AM	(S)-AM	AM	(S)-AM	
1	7.250.969	7.280.953	6,443	7,467	1,285	1,175	2,828
2	7.266.092	7.281.697	6,405	7,468	1,450	1,316	2,735
3	7.241.500	7.269.303	6,398	7,458	1,449	1,317	2,732
4	7.205.966	7.262.434	6,392	7,449	1,429	1,285	2,703
5	7.183.247	7.224.391	6,390	7,445	1,396	1,289	2,677
6	7.230.960	7.295.211	6,391	7,443	1,382	1,312	2,640
<b>TB</b>	7.229.771	7.268.998	6,403	7,457	1,399	1,282	2,715
<b>SD</b>	30.456	24.596	0,045	0,091			
<b>%RSD</b>	0,42	0,34	0,24	0,12			

**Bảng 6** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của mẫu chuẩn (S)-amlodipin (n = 6)

STT	S (Diện tích peak) (mAU) (%RSD $\leq 2$ )	$T_R$ (Thời gian lưu - phút) (%RSD $\leq 2$ )	$A_S$ (Hệ số bất đối) ( $0,8 \leq A_S \leq 1,5$ )	N (Hệ số số đĩa lí thuyết) ( $N \geq 10.000$ )
1	7.453.159	7,361	1,169	30.697
2	7.479.210	7,352	1,154	30.569
3	7.456.665	7,250	1,168	30.417
4	7.471.585	7,347	1,175	30.368
5	7.487.395	7,449	1,188	31.191
6	7.497.984	7,347	1,189	30.622
<b>TB</b>	7.474.333	7,368	0,973	30.644
<b>SD</b>	17.446	0,040		
<b>%RSD</b>	0,23	0,55		

Theo các kết quả trong Bảng 5 và Bảng 6, giá trị RSD của diện tích peak và thời gian lưu của mẫu chuẩn AM

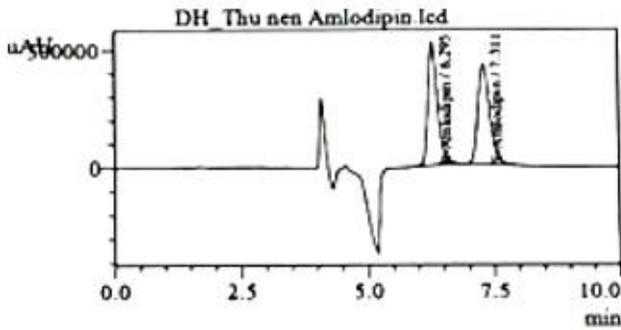
và mẫu chuẩn (S)-AM đều nhỏ hơn 2 %, độ phân giải lớn hơn 1,5 và hệ số bất đối của 2 peak đồng phân đều

nằm trong khoảng (0,8-1,5) nên quy trình đạt tính phù hợp hệ thống.

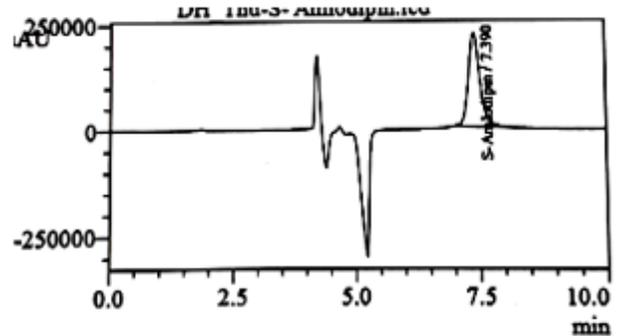
3.4.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc kí mẫu dung môi, mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử đã chuẩn bị

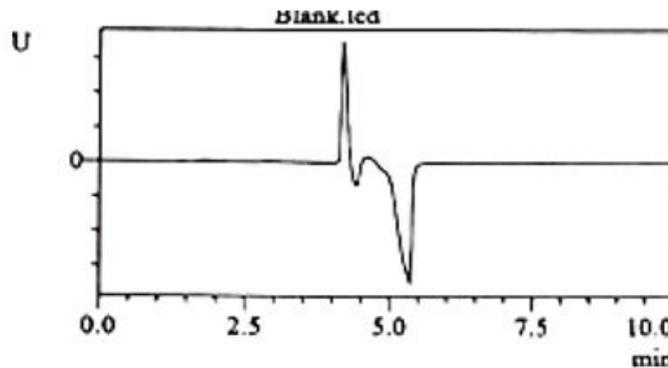
Sắc kí đồ các mẫu được trình bày trong Hình 5, Hình 6 và Hình 7, tương ứng:



Hình 5 Sắc kí đồ mẫu chuẩn AM

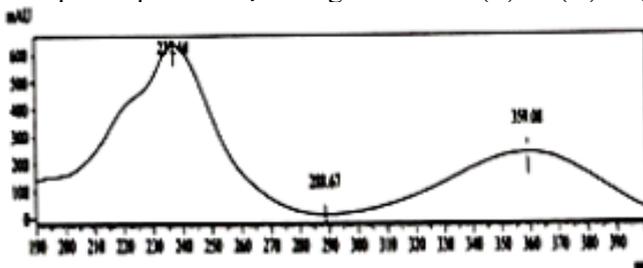


Hình 6 Sắc kí đồ mẫu chuẩn (S)-AM

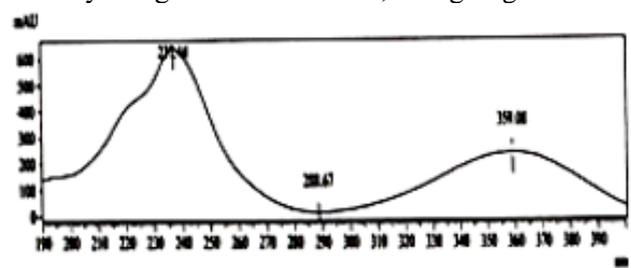


Hình 7 Sắc kí đồ mẫu dung môi

Kết quả đo phổ UV tại thời gian lưu của (S) và (R) được trình bày trong Hình 8 và Hình 9, tương ứng.



Hình 8 Phổ UV tại thời gian lưu của peak (S)-AM trong mẫu chuẩn



Hình 9 Phổ UV tại thời gian lưu của peak (R)-AM trong mẫu chuẩn

Từ kết quả sắc kí đồ trong các hình từ Hình 5 đến Hình 9, nhận định:

- Mẫu trắng, mẫu dung môi không có peak trùng với peak chất phân tích.
- Mẫu chuẩn AM xuất hiện hai peak đồng phân có độ phân giải > 1,5. Trong hai peak đồng phân, peak của đồng phân (S)-MA có thời gian lưu chậm hơn và trùng với thời gian lưu của peak chính trong mẫu chuẩn (S)-AM.

- Thời gian lưu của peak chính trong mẫu thử (S)-AM tương ứng với thời gian lưu của peak chính trong mẫu chuẩn (S)-AM.
- Phổ tử ngoại của các peak tại thời gian lưu của các peak trong mẫu thử giống phổ tử ngoại của các peak trong mẫu chuẩn. Độ tinh khiết của các peak lớn hơn 99 %.

Hai peak của hai dạng đồng phân có phổ UV giống nhau. Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu.

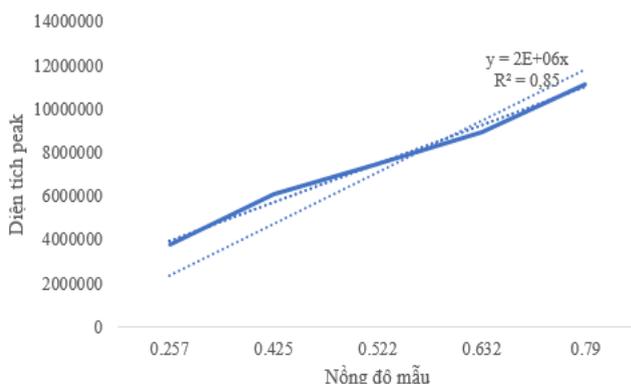
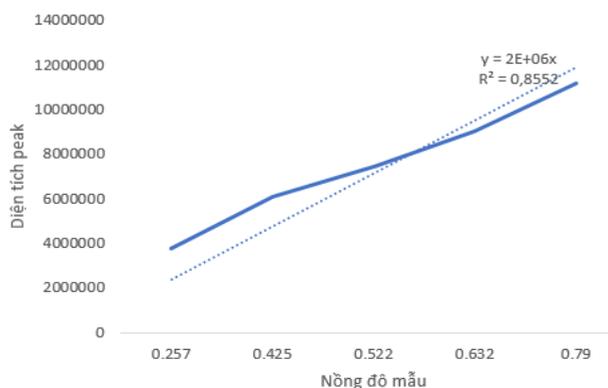
3.4.3 Tính tuyến tính

Kết quả khảo sát tính tuyến tính của mẫu chuẩn AM được trình bày trong Bảng 7.

**Bảng 7** Kết quả khảo sát tính tuyến tính của mẫu chuẩn amlodipin

STT	Khối lượng (mg)	Thể tích (mL)	Nồng độ (mg/mL)	Diện tích (S)-AM (mAU)	Diện tích (R)-AM (mAU)
(1) TT-50	17,80	50	0,257	3.762.899	3.792.790
(2) TT-80	29,50	50	0,425	6.077.247	6.097.971
(3) TT-100	36,20	50	0,522	7.453.530	7.490.981
(4) TT-120	43,80	50	0,632	8.936.448	9.024.629
(5) TT-150	54,80	50	0,790	11.117.059	11.220.863

Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak (S)-AM trong mẫu chuẩn AM được trình bày trong Hình 10.

**Hình 10** Mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak (S)-AM trong mẫu chuẩn AM**Hình 11** Mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak (R)-AM trong mẫu chuẩn AM

Đồ thị tương quan giữa nồng độ và diện tích peak (R)-AM trong mẫu chuẩn AM được trình bày trong Hình 11. Hệ số  $R^2$  của cả hai đồ thị đều  $> 0,98$ , chứng tỏ có sự tương quan thuận và chặt chẽ giữa nồng độ và

diện tích peak của cả hai mẫu; sự phụ thuộc gần tuyến tính.

3.4.4 Độ đúng: kết quả khảo sát độ đúng sử dụng mẫu viên nén (S)-AM được trình bày trong Bảng 8.

**Bảng 8** Kết quả khảo sát độ đúng của viên nén (S)-AM (n = 9)

Chất chuẩn thêm vào (%)	(S)-AM thêm vào ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích peak (mAU)	Lượng tìm lại ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tỉ lệ phục hồi (%)
80	199,00	6.668.173	197,65	99,32
	199,72	6.689.422	198,90	99,59
	201,16	6.690.586	199,97	99,41
100	248,02	7.391.604	246,15	99,24
	248,74	7.399.374	246,30	99,02
	247,30	7.371.478	245,20	99,15
120	296,33	8.030.355	290,74	98,11
	295,41	8.023.491	290,38	98,23
	295,31	8.022.832	290,31	98,21
<b>Trung bình</b>				98,92
<b>%RSD</b>				0,58

**Bảng 9** Kết quả khảo sát độ lặp lại của viên nén (S)-amlodipin

Số lần	Diện tích (S)-AM	Hàm lượng (%)
1	6.912.266	96,47
2	6.807.736	96,19
3	6.846.640	96,95
4	6.850.336	96,89
5	6.864.240	95,63
6	6.909.177	96,89
<b>Trung bình</b>	<b>6.839.840</b>	<b>96,34</b>
<b>%RSD (n = 6)</b>		<b>0,43</b>

Phương pháp phân tích đạt độ đúng với tỉ lệ phục hồi nằm trong khoảng cho phép (98-102) %. Từ định lượng

mẫu viên nén chứa riêng (S)-AM cho thấy có thể ứng dụng phương pháp này trong thực tiễn.

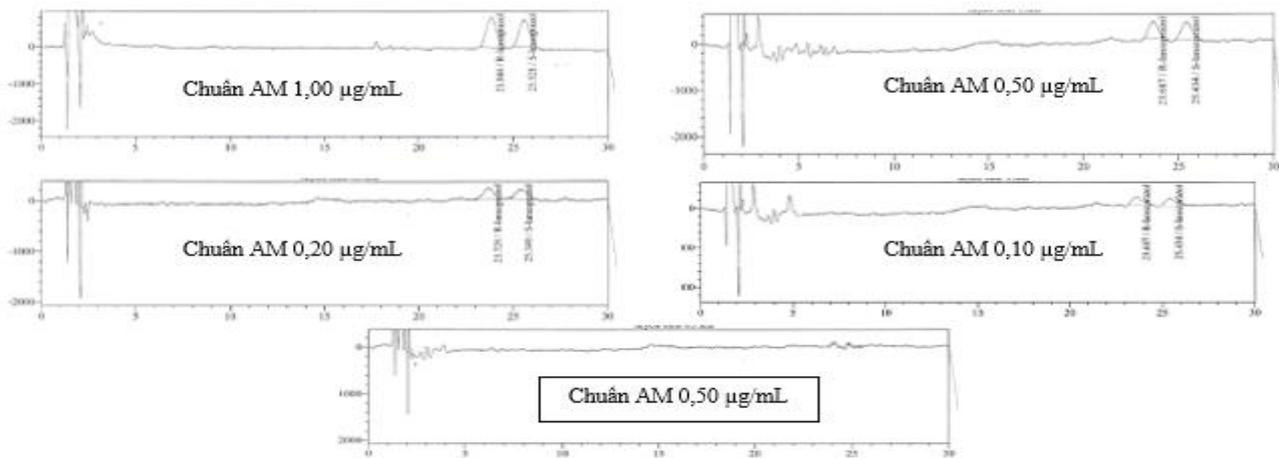
**3.4.5 Độ chính xác**

Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp với mẫu viên nén (S)-AM được trình bày trong Bảng 9.

Nhận xét: phương pháp phân tích độ lặp lại cho RSD của các mẫu phân tích đạt độ chính xác (đều không quá 2 %).

**3.4.6 Giới hạn phân tích tối thiểu (LOD)**

LOD được xác định dựa vào phương pháp pha loãng nồng độ amlodipin lần lượt là: (1,00; 0,50; 0,20; 0,10 và 0,05) µg/mL. Sắc kí đồ mẫu chuẩn theo từng nồng độ được trình bày trong Hình 12.



**Hình 12** Sắc kí đồ các mẫu chuẩn AM theo nồng độ

Dựa trên các sắc kí đồ, nồng độ thấp nhất của 2 peak đồng phân mà phương pháp có thể phát hiện được là 0,10 µg/mL, nồng độ cao nhất là 1,0 µg/mL.

Nhận định chung: thông qua hướng dẫn của ICH, sử dụng mẫu chuẩn hoạt chất AM (chứa hỗn hợp racemic) và mẫu chuẩn (S)-AM cũng như mẫu viên nén (S)-AM trên thị trường, cho thấy các mẫu thử chứa (S)-AM đều có peak trùng lặp với các peak trong mẫu chuẩn, độ chính xác và độ đúng, độ lặp lại đều đạt yêu cầu, chứng tỏ HPLC dùng cột lux cellulose-4 với hệ dung môi đã tối ưu hóa phù hợp để định lượng riêng (S)-AM. Nghiên cứu này cho LOD nằm trong khoảng (0,10-1,0) µg/mL, so với nghiên cứu của Valliappan Kannappan và cộng sự cho LOD của (S)-AM nằm trong khoảng (0,03-0,1) µg/mL [14], kết quả nghiên cứu này cho LOD cao hơn, do đó, khi pha chế sẽ dễ dàng hơn, đặc biệt với các mẫu (S)-AM trên thị trường có hàm lượng khoảng (2,5-5,0) mg/viên. Trong nghiên

cứ [15] – sử dụng phương pháp điện di mao quản, chưa đưa ra được LOD của nồng độ (R)-AM cũng như (S)-AM khi pha chế và định lượng. Vì vậy, việc đưa ra LOD của (S)-AM trong nghiên cứu này phù hợp với quá trình pha chế và định lượng thực tế cũng như HPLC dùng dung môi đơn giản rẻ tiền, là một thành công và điểm mới của nghiên cứu, hứa hẹn ứng dụng trong kiểm nghiệm.

**4 Kết luận**

Hai đồng phân quang học của AM là đồng phân (S) và (R) đã tách nhau hoàn toàn bằng việc sử dụng HPLC, đầu dò PDA, cột lux cellulose-4 (thông số: cellulose tris(4-chloro-3-methylphenyl carbamat) (250 × 4,6 mm; 5 µm); pha động sử dụng là acetonitril-ethanol-diethylamin (90:10:0,1) (v/v/v), phát hiện bằng đầu dò UV tại bước sóng 237 nm. Phương pháp định lượng cho thấy khả năng tách đồng phân tốt thông qua việc

đạt các yêu cầu thẩm định theo ICH (đạt tất cả các chỉ tiêu). Phương pháp còn thể hiện tính tối ưu trong việc xác định hệ dung môi, tỉ lệ pha động, thời gian tách phù hợp, tiết kiệm. Phạm vi định lượng cho hai đồng phân quang học là từ (0,1-1,0)  $\mu\text{g/mL}$ , phù hợp cho việc pha chế. Độ lệch chuẩn tương đối của phương pháp là dưới 2 % (n = 6), phạm vi phục hồi nằm trong khoảng (98 đến 102) %. Kết quả tách hai đồng phân bằng HPLC tạo tiền đề cho việc định lượng độc lập hai đồng phân (S) và (R) của AM, qua đó làm cơ sở cho việc kiểm

NGHIỆM các sản phẩm AM hỗn hợp racemic hoặc AM chỉ chứa (S) trên thị trường và làm cơ sở cho xây dựng chuyên luận riêng của đồng phân (S)-AM trong các dược điển.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2022.01.116/HĐ-KHCN.

#### Tài liệu tham khảo

1. Fang Liu, Meng Qiu and Suo-Di Zhai (2010), Tolerability and Effectiveness of (S)-Amlodipine Compared With Racemic Amlodipine in Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Therapeutic Research*, Vol. 71, No. 1.
2. Jamshed Dalal (et al) (2018), S-Amlodipine: An Isomer with Difference - Time to Shift from Racemic Amlodipine. *International Journal of Hypertension*, 2018: 8681792
3. Chiral Drugs – S-Amlodipine, Calcium channel Blocker (2022); Asomex, [http://www.chiralemcure.com/pop/S-amlodipine\\_globalpresence.html](http://www.chiralemcure.com/pop/S-amlodipine_globalpresence.html).
4. Arnold C. IGBOASOIYI (et al) (2020), Quality evaluation and UV spectrophotometric assay of ten brands of amlodipine tablets marketed in Uyo, Nigeria. *Journal of Pharmacy and Bioresources*, Vol. 17, No. 1, pp. 60-65.
5. Challener CA, (2001), Overview of chirality in Chiral drugs, Aldershot, England: Ashgate Publisher, pp. 3-14.
6. Hua He, Chuong Pham Huy Lien Ai Nguyen (2006), Chiral Drugs: An Overview. *International Journal of Biomedical Science*, Vol. 2, pp. 85-100.
7. Rumiko Shimazawa et al (2007), Recent state of new chiral drugs development and review. *Journal of Health Science*, Vol. 54, pp. 23-29.
8. Liu RH Liu JT et al (2002), Enantiomeric composition of abused amine drugs: chromatographic methods of analysis and data interpretation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Vol. 54, pp. 115-146.
9. Food and Drug Administration (1992), FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *US Food and Drug Administration Regulatory Guidance*.
10. A.B. M. Helal Uddina et al (2017), Current Analytical Methods For Amlodipine And Its Formulations: A Review. *Journal CleanWAS* 1(1) (2017) 17-22
11. Alberto Cavazzini et al (2011), Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review, *Analytica Chimica Acta*, 706, pp.205-222.
12. Dongmei Wang et al (2014), Chiral Recognition Mechanisms of four  $\beta$ -Blockers by HPLC with Amylose Chiral Stationary Phase. *Iran J Pharm Res*, 13(2), pp.449-45.
13. Ratih Ratih et al (2022), Quality by Design Assisted Optimization of a Chiral Capillary Electrokinetic Chromatographic Method for the Separation of Amlodipine Enantiomers Using Maltodextrin as Chiral Selector. *Pharmaceuticals* 2022, 15(3), 319; <https://doi.org/10.3390/ph15030319>.
14. Valliappan Kannappan et al (2016), Simultaneous enantioseparation and purity determination of chiral switches of amlodipine and atenolol by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 120, 20 February 2016, Pages 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.12.048>



15. Lê Đình Chi, Thái Nguyễn Hùng Thu (2013), Phân tích đồng phân đối quang của amlodipin bằng phương pháp điện di mao quản. *Tạp chí Dược học*, Bộ Y tế, Tập 53, Số 3.
16. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, pp.1-13.
17. Trần Mỹ Thiên Thanh và cộng sự, Xây dựng quy trình định lượng (S)-amlodipin bằng HPLC sử dụng pha động có chứa tác nhân đối quang. *Tạp chí Dược học*, Bộ Y tế, Tập 58, Số 9 (2018).
18. Wajjha Gul et al (2015), Effect of Acid, Base, Temperature and U.V Light on Amlodipine Besylate. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)*, Vol. 2, No. 9, pp. 21-24.

### **Amlodipin optical analysis via HPLC using lux cellulose column**

Nguyen Thao Hanh Ngan<sup>1</sup>, Le Thi Thu Cuc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

<sup>2</sup>Institute of Drug Quality Control of Ho Chi Minh City

nthngan@ntt.edu.vn

**Abstract** Amlodipine (AM) consists of two isomers (S)-AM (S) and (R)-AM (R); however, only (S) is active. Currently, there is no separate monograph for (S) in the pharmacopoeia and the optimal method of quantification, separation for (S) and (R). Research was carried out using HPLC on research subjects including 5mg AM tablets; 2.5mg and 5mg (S)-AM tablets; reference agents AM besilate and (S)-AM besilate; chemicals and solvents up to analytical standards and separation columns include lux cellulose-(1, 2, 3 and 4). Procedure: First, survey the column, evaluate the possibility of separation. Next, investigate the mobile phase, select the most suitable mobile phase system. Finally, validate the method (according to ICH). The results show that the lux cellulose-4 column can completely separate the mixture at 237 nm with the acetonitrile-ethanol-diethylamine system at the ratio of 90:10:0.1 (v:v:v). On validation (according to ICH), the method met requirements for specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification with resolution > 2.5, range of determination 0.1 to 1.0 µg/mL, relative standard deviation < 2 % (n = 6), recovery (98-102) %. Thus, HPLC using lux cellulose-4 column with acetonitrile-ethanol- diethylamine system (90:10:0,1) proves suitable for separating (S) and (R), thus can be a new method for quantification (S) and testing preparations containing AM or (S) on the market

**Keywords** amlodipine, quantitative, HPLC, lux cellulose, S-amlodipine