

Định lượng indapamid 1.5 mg trong viên nén phóng thích kéo dài và môi trường pH 6.8 bằng phương pháp HPLC-DAD

Nguyễn Hoàng Quyên, Đào Nguyễn Thành Tài,
Nguyễn Đoàn Quỳnh An, Lê Thị Minh Ngọc và Huỳnh Thị Mỹ Duyên*
Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tăng huyết áp là một bệnh mạn tính nguy hiểm, yêu cầu phải dùng thuốc đều đặn. Trong việc tối ưu hóa phác đồ và giúp người bệnh dễ dàng tuân thủ điều trị, việc tạo ra dạng thuốc phóng thích kéo dài đang được quan tâm, phát triển. Trong đó, indapamid phóng thích kéo dài được lựa chọn nhưng quy trình định lượng và thử độ hòa tan chưa thực sự đa dạng. **Mục tiêu nghiên cứu:** Khảo sát điều kiện pha động, xây dựng và thẩm định quy trình định lượng và quy trình thử độ hòa tan trong môi trường pH 6.8. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng indapamid trong chế phẩm và trong môi trường thử độ hòa tan pH 6.8 bằng phương pháp HPLC-DAD. **Kết quả:** Xây dựng và thẩm định thành công quy trình định lượng indapamid bằng phương pháp HPLC-DAD với điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Luna C-18 Column (250 x 4 mm, 5 μ m), bước sóng 242 nm, tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 50 μ L, hệ pha động bao gồm acetonitril - methanol - dung dịch triethylamin 0.8% (pH 3.0) (42:3:55). **Kết luận:** Đã khảo sát và thẩm định thành công hệ pha động đạt yêu cầu được sử dụng để định lượng indapamid trong viên nén phóng thích kéo dài indapamid 1.5 mg và trong môi trường thử độ hòa tan pH 6.8.

Từ khóa: indapamid, phóng thích kéo dài, sắc ký lỏng hiệu năng cao, HPLC-DAD

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tăng huyết áp (THA) là một căn bệnh mạn tính đang có xu hướng ngày càng trở nên phổ biến. Theo số liệu thống kê của tổ chức y tế thế giới (WHO) vào năm 2021, số lượng người trong độ tuổi từ 30 - 79 bị tăng huyết áp đã tăng từ 650 triệu lên 1.28 tỷ trong ba mươi năm qua [1]. Đây được xem là một căn bệnh nguy hiểm, được ghi nhận là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới, đòi hỏi bệnh nhân phải sử dụng thuốc đúng và đủ liều hàng ngày. Trong việc tối ưu hóa phác đồ điều trị cũng như giúp người bệnh dễ dàng tuân thủ điều trị thì dạng thuốc phóng thích kéo dài đang ngày càng được quan tâm và phát triển. Trong đó, indapamid phóng thích kéo dài được lựa chọn nhờ tạo nhiều thuận lợi cho bệnh nhân, cải thiện hiệu quả lâm sàng, ổn định huyết áp suốt 24 giờ [2], đồng thời giảm số lần dùng thuốc, giúp bệnh nhân dễ dàng tuân thủ điều trị. Ngày nay, tỷ lệ sử dụng hoạt chất này ngày càng gia tăng, số liệu thống kê vào tháng 1/ 2025 cho thấy trong

số 1,904,289 bệnh nhân tăng huyết áp, có 138,414 bệnh nhân sử dụng indapamid. Trong đó, tỷ lệ sử dụng indapamid phóng thích kéo dài tăng từ 0.71% vào năm 2005 lên 0.79% năm 2020 [3]. Việc lựa chọn pH 6.8 nhằm mô phỏng môi trường phóng thích chủ yếu của dạng bào chế này giúp đánh giá chính xác hơn về khả năng phóng thích của thuốc trong thời gian dài ở điều kiện sinh lý, từ đó phản ánh được quá trình dược động của thuốc trong cơ thể. Ở khía cạnh khác, việc sử dụng phương pháp HPLC kết hợp đầu dò DAD ngày nay đang được ứng dụng mạnh mẽ nhờ mang lại các lợi ích khác biệt so với phương pháp UV-Vis hoặc HPLC đầu dò UV đơn kênh như giúp phân tích những thành phần phức tạp tốt hơn, thu phổ ở nhiều bước sóng, giúp phân biệt các hợp chất có phổ gần nhau, từ đó cung cấp một phương pháp có độ nhạy và độ chính xác cao hơn [4]. Tuy nhiên, chưa có công trình nghiên cứu trong nước đến thời điểm hiện tại tập trung định lượng indapamid trong viên nén phóng thích kéo

Tác giả liên hệ: Huỳnh Thị Mỹ Duyên

Email: htmduyen@ctump.edu.vn

dài và môi trường pH 6.8 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [5 - 7]. Hầu hết các nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào định lượng indapamid phóng thích tức thời hoặc định lượng đồng thời nhiều hoạt chất. Trong khi đó, theo Dược điển Việt Nam V, dược điển của một số nước tiên tiến trên thế giới (USP, BP hoặc EP) và các nghiên cứu ngoài nước lại hướng đến định lượng indapamid trong nguyên liệu và viên nén phóng thích tức thời [7 - 9]. Do đó, việc thực hiện nghiên cứu này góp phần bổ sung dữ liệu khoa học quan trọng, làm tiền đề cho các nghiên cứu phát triển và thẩm định quy trình kiểm nghiệm đối với các dạng bào chế chứa indapamid phóng thích kéo dài, đồng thời tạo nguồn tài liệu tham khảo hữu ích khi nghiên cứu về đặc tính hòa tan và đánh giá chất lượng thuốc trong môi trường pH 6.8. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng indapamid trong viên nén phóng thích kéo dài và thẩm định quy trình thử độ hòa tan trong môi trường pH 6.8 bằng phương pháp HPLC-DAD.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng: Thành phẩm viên nén Natrilix SR 1.5 mg chứa hoạt chất indapamid 1.5 mg (của nhà sản xuất LES - Pháp), số lô 021545239, còn hạn sử dụng được mua tại các nhà thuốc uy tín ở Thành phố Cần Thơ, có chứng minh nguồn gốc xuất xứ.
- Chất chuẩn: Chất chuẩn indapamid (hàm lượng 97.7% tính trên nguyên trạng) do Viện Kiểm

nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

- Hóa chất: Indapamid (Trung Quốc), acetonitril (Mỹ), methanol (Mỹ), triethylamin (Mỹ), acid phosphoric (Trung Quốc), KH_2PO_4 (Trung Quốc), NaOH (Trung Quốc), nước cất (Việt Nam).
- Trang thiết bị: Cân điện tử (Kern ABS 220-4 - Đức), máy siêu âm (Elmasonic S70H - Đức), máy đo pH (Hanna HI 2550 - Rumania), máy thử độ hòa tan (Pharma-test - Đức), máy HPLC (Agilent - Mỹ), cột sắc ký pha đảo C-18 (Agilent - Mỹ), tủ sấy (Mettler - Đức) và các dụng cụ phòng thí nghiệm,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký: Luna C-18 Column (250 mm x 4 mm, 5 μm), bước sóng phát hiện 242 nm, tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 50 μL , tiến hành ở nhiệt độ phòng.

Tiến hành sắc ký trên mẫu thử (chuẩn bị ở mục 2.2.2.1) để khảo sát thành phần pha động bằng hỗn hợp các dung dịch methanol (MeOH), triethylamin (TEA) 0.8 % và acetonitril (ACN) như Bảng 1. Mỗi điều kiện thực hiện lặp lại $n = 3$ lấy giá trị trung bình.

Thu thập các thông số sắc ký bao gồm: thời gian lưu (t_R), hệ số bất đối (A_s), hệ số phân giải (S), số đĩa lý thuyết (N), hệ số dung lượng (k'). Yêu cầu: Đạt các thông số sắc ký $\text{RSD} \leq 2.00\%$; số đĩa lý thuyết $N > 2000$; hệ số bất đối $0.8 < A_s < 1.2$; hệ số phân giải $R_s > 1.5$; $1 < k' < 8$.

Bảng 1. Khảo sát thành phần pha động ($n = 3$)

Điều kiện	Thành phần pha động	Tỉ lệ pha động
1	MeOH - TEA 0.8 %	75 - 25
2	MeOH - TEA 0.8 %	65 - 35
3	ACN - TEA 0.8 %	75 - 25
4	ACN - TEA 0.8 %	65 - 35
5	ACN - MeOH - TEA 0.8 %	40 - 15 - 55
6	ACN - MeOH - TEA 0.8 %	42 - 3 - 55

2.2.2. Thẩm định quy trình định lượng indapamid trong viên nén phóng thích kéo dài

2.2.2.1. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc indapamid: Cân chính xác một lượng tương ứng khoảng 10 mg indapamid chuẩn, cho vào bình định mức 100 mL, thêm lượng tối

thiểu methanol, lắc kỹ và siêu âm 30 phút, bổ sung methanol vừa đủ 100 mL, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ khoảng 100 $\mu\text{g/mL}$ indapamid.

Dung dịch chuẩn indapamid: Hút chính xác 150 μL dung dịch chuẩn gốc indapamid (100 $\mu\text{g/mL}$), cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung bằng môi

trường pha động vừa đủ 10 mL, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 1.5 µg/mL indapamid, lọc qua màng lọc 0.45 µm.

Dung dịch mẫu thử: Cân 20 viên thuốc Natrilix SR 1.5 mg, xác định khối lượng trung bình của 01 viên, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khối lượng trung bình 01 viên, cho vào bình định mức 50 mL, thêm lượng tối thiểu methanol, lắc kỹ cho tan và siêu âm 30 phút, thêm dung môi pha động vừa đủ 50 mL, lắc đều, lọc qua giấy lọc, bỏ khoảng 10 mL dịch đầu, thu được dung dịch (1). Hút chính xác 500 µL dung dịch (1), cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung bằng dung môi pha động vừa đủ 10 mL, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1.5 µg/mL indapamid, lọc qua màng lọc 0.45 µm.

Dung dịch mẫu trắng: Dung môi pha mẫu methanol và dung môi pha động.

Dung dịch mẫu giả dược: Cân chính xác khoảng hỗn hợp bột giả dược tương ứng 01 viên (thành phần nguyên liệu giả dược dựa theo thành phần giả dược trong patent của viên Natrilix SR 1.5 mg đã được công bố), cho vào bình định mức 50 mL, thêm lượng tối thiểu methanol, lắc kỹ cho tan và siêu âm 30 phút, bổ sung bằng dung môi pha động vừa đủ 50 mL, lắc đều, lọc qua giấy lọc, bỏ khoảng 10 mL dịch đầu, thu được dung dịch (2). Hút chính xác 500 µL dung dịch (2), cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung bằng dung môi pha động vừa đủ 10 mL, lắc đều, lọc qua màng lọc 0.45 µm.

Dung dịch mẫu thử thêm chuẩn: Tiến hành tương tự như chuẩn bị dung dịch mẫu thử. Hút chính xác 500 µL dung dịch thu được, cho vào bình định mức 10 mL, tiếp tục hút 30 µL dung dịch chuẩn

gốc indapamid cho vào bình định mức trên, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ khoảng 3 µg/mL indapamid.

Dung dịch mẫu giả dược thêm chuẩn: Cân chính xác một lượng bột giả dược tương ứng 01 viên cho vào bình định mức 50 mL, thêm một lượng tối thiểu methanol, hút 0.75 mL dung dịch chuẩn gốc indapamid cho vào bình định mức trên, lắc kỹ và siêu âm 30 phút, bổ sung bằng dung môi pha động vừa đủ 50 mL, lắc đều, lọc qua giấy lọc, bỏ khoảng 10 mL dịch lọc đầu. Thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1.5 µg/mL indapamid.

Các mẫu sau khi hoàn tất, được tiến hành thẩm định ngay, không bảo quản mẫu.

2.2.2.2. Thẩm định quy trình

Tính tương thích hệ thống: Được thực hiện bằng cách tiến hành sắc ký 06 lần dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử. Yêu cầu: Đạt các thông số sắc ký $RSD \leq 2\%$; số đĩa lý thuyết $N > 2000$; hệ số bất đối $0.8 < A_s < 1.2$; hệ số phân giải $R_s > 1.5$; $1 < k' < 8$.

Tính đặc hiệu: Được thực hiện bằng cách tiến hành sắc ký các mẫu pha động, mẫu môi trường hòa tan, mẫu giả dược, mẫu thử, mẫu chuẩn, mẫu thử thêm chuẩn. Yêu cầu: Các mẫu pha động, mẫu môi trường hòa tan, mẫu giả dược đều không xuất hiện các pic có thời gian lưu tương ứng với các pic của mẫu chuẩn; sắc ký đồ mẫu thử phải có các pic với thời gian lưu tương ứng với các pic của mẫu chuẩn; sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn với các pic có sự tăng thêm về chiều cao và diện tích, đồng thời, thời gian lưu phải tương đương với sắc ký đồ của mẫu chuẩn.

Tính tuyến tính: Tiến hành tiêm giai mẫu hỗn hợp chuẩn được pha theo Bảng 2.

Bảng 2. Pha dung dịch xây dựng đường chuẩn

Bình số	1	2	3	4	5	6	7
Dung dịch chuẩn gốc indapamid 100 µg/mL (µL)	200	180	165	150	135	120	100
Pha động vừa đủ	10 mL						
Nồng độ indapamid (µg/ mL)	2.0	1.8	1.65	1.5	1.35	1.2	1.0

Vẽ đường biểu diễn tương quan giữa diện tích đỉnh theo nồng độ chất phân tích. Dùng phần mềm Microsoft Excel, xử lý thống kê số liệu thu được, xác định hệ số a (độ dốc), b (tung độ gốc), R^2 (hệ số tương quan bình phương) của phương trình hồi quy ($y = ax + b$). Sử dụng trắc nghiệm F và t để kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy và ý

nghĩa của các hệ số trong phương trình. Yêu cầu: Hệ số tương quan $0.995 \leq R^2 \leq 1$.

Độ chính xác: Bao gồm độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Độ lặp lại: chuẩn bị 06 dung dịch mẫu thử. Độ chính xác trung gian: tiến hành như độ lặp lại nhưng trong 03 ngày khác nhau. Yêu cầu: Giá trị RSD của hàm lượng hoạt chất trong 01 ngày và giữa

03 ngày phải $\leq 2\%$.

Độ đúng: Được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vào mẫu giả dược ở ba mức nồng độ 80%, 100% và 120% so với nồng độ đo của hoạt chất. Mỗi mức nồng độ, chuẩn bị 03 mẫu và tiến hành sắc ký mỗi mẫu 01 lần. Yêu cầu: Tỷ lệ thu hồi dựa trên lượng chuẩn thêm vào và lượng tìm được với tiêu chuẩn chấp nhận từ 98 - 102% và $RSD \leq 2.00\%$.

2.2.3. Thẩm định quy trình định lượng indapamid trong môi trường thử độ hòa tan pH 6.8

2.2.3.1. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc và chuẩn indapamid: Được chuẩn bị tương tự như mục 2.2.1.1, thay methanol bằng dung dịch đệm phosphat pH 6.8.

Dung dịch mẫu thử và dung dịch mẫu thử sau 16 giờ trong môi trường pH 6.8: Tiến hành tương tự như chuẩn bị mẫu thử, thay môi trường pha động bằng môi trường hòa tan pH 6.8. Riêng mẫu thử sau 16 giờ trong môi trường pH 6.8 thì tiến hành sắc ký sau 16 giờ, kể từ lúc pha mẫu xong.

Dung dịch mẫu trắng: Môi trường hòa tan pH 6.8

và pha động.

Dung dịch mẫu giả dược: Cân chính xác khoảng hỗn hợp bột giả dược tương ứng 01 viên, cho vào môi trường hòa tan, tiến hành song song và giống như mẫu thử.

Mẫu thử thêm chuẩn: Cân chính xác khoảng hỗn hợp bột giả dược tương ứng 01 viên, cho vào môi trường hòa tan, tiến hành song song và giống như mẫu thử. Hút chính xác 5 mL dịch lọc, cho vào bình định mức 10 mL, thêm 400 μ L dung dịch chuẩn (indapamid 1.5 μ g/mL), bổ sung pha động vừa đủ 10 mL.

Các mẫu sau khi hoàn tất, được tiến hành thẩm định ngay, không bảo quản mẫu.

2.2.3.2. Thẩm định quy trình

Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng tiến hành tương tự như mục 2.2.2.2.

Tính tuyến tính: Tiến hành tiêm giai mẫu hỗn hợp chuẩn được pha theo bảng 3, sau đó tiến hành thẩm định tính tuyến tính tương tự như mục 2.2.2.2.

Bảng 3. Pha dung dịch xây dựng đường chuẩn

Bình số	1	2	3	4	5	6
Dung dịch chuẩn gốc indapamid 100 μ g/mL (μ L)	200	180	150	120	60	30
Pha động vừa đủ	10 mL					
Nồng độ indapamid (μ g/ mL)	2.0	1.8	1.5	1.2	0.6	0.3

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Bảng 4. Kết quả khảo sát thành phần pha động (n = 3)

STT	Hệ pha động	Tỉ lệ	Độ tinh khiết pic	Độ phân giải	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết
1	MeOH - TEA 0.8 %	75 - 25	Không đạt	-	-	2,247
2	MeOH - TEA 0.8 %	65 - 35	Không đạt	-	-	2,011
3	ACN - TEA 0.8 %	75 - 25	Đạt	2.54	2.07	2,047
4	ACN - TEA 0.8 %	65 - 35	Đạt	2.17	0.61	2,085
5	ACN - MeOH - TEA 0.8 %	40 - 15 - 55	Đạt	2.56	0.71	2,247
6	ACN - MeOH - TEA 0.8 %	42 - 3 - 55	Đạt	5.89	0.92	3,154

(-) Không có dữ liệu

Nhận xét: Hệ pha động (1) và (2) thu được kết quả về độ tinh khiết pic, độ phân giải và hệ số bất đối của indapamid đều không đạt yêu cầu. Đối với hệ (3) và (4), các thông số sắc ký đã có phần cải thiện, nhưng kết quả vẫn chưa đạt yêu cầu. Đối với hệ (5) và (6),

các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu khi sử dụng hệ pha động acetonitril - methanol - triethylamin 0.8% (pH 3.0), nhưng độ phân giải ở hệ pha động (6) cao hơn, do đó, tỷ lệ dung môi pha động (42:3:55) được chọn để thực hiện nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Thẩm định quy trình định lượng indapamid trong viên nén phóng thích kéo dài

3.2.1. Tính tương thích hệ thống

Nhận xét: Giá trị RSD của thời gian lưu, diện tích đỉnh đều nhỏ hơn 2.00%. Hệ số bất đối, độ phân giải và số đĩa lý thuyết biểu kiến đều nằm trong khoảng cho

phép ($1 < k' < 8$; $R_s > 1.5$; $0.8 < A_s < 1.5$; $N \geq 2000$). Từ kết quả cho thấy các thông số sắc ký bao gồm diện tích đỉnh, thời gian lưu, hệ số bất đối, độ phân giải và số đĩa lý thuyết đều đạt yêu cầu. Như vậy, quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống, có thể sử dụng để thẩm định và ứng dụng quy trình phân tích.

Bảng 5. Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống (n = 6)

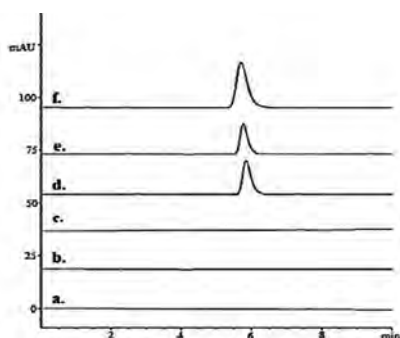
STT	Indapamid					
	S (mAU/s)	t _R (phút)	k'	R _s	A _s	N
1	243.00	5.983	5.08	5.03	0.83	3,197
2	241.70	5.977	5.08	5.03	0.82	3,027
3	243.30	5.959	5.06	5.20	0.82	3,628
4	243.40	5.924	5.12	5.06	0.81	3,022
5	242.50	5.915	5.12	5.15	0.81	3,002
6	239.70	5.919	5.12	5.00	0.82	3,046
TB	242.27	5.95	5.10	5.08	0.82	3,154
RSD (%)	0.58	0.51	-	-	-	-

(-): Không đánh giá

3.2.2. Tính đặc hiệu

Nhận xét: sắc ký đồ của mẫu trắng và mẫu giả dược không xuất hiện các pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của các pic trong mẫu chuẩn; sắc ký đồ của mẫu thử có pic với thời gian

lưu tương đương với pic indapamid trong sắc ký đồ của mẫu indapamid chuẩn; sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn có pic với chiều cao và diện tích tăng so với pic tương ứng trên sắc ký đồ của mẫu thử. Như vậy, quy trình đạt tính đặc hiệu.



Hình 1. Sắc ký đồ minh họa tính đặc hiệu

(a. mẫu trắng, b. dung môi pha mẫu, c. mẫu giả dược, d. mẫu thử, e. mẫu chuẩn, f. mẫu thử thêm chuẩn)

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

Bảng 6. Kết quả thẩm định tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng của quy trình định lượng

Phương trình hồi quy		$\hat{y} = 167.43x$			
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/mL}$)		1 - 2			
Hệ số tương quan (R^2)		0.9991			
Độ chính xác		Độ lặp lại (n = 6)		Độ chính xác trung gian (n = 18)	
		% so với nhãn	RSD (%)	% so với nhãn	RSD (%)
		100.04	0.72	100.42	0.71
Độ đúng (n = 9)	Mức nồng độ	Tỉ lệ thu hồi trung bình (%)		RSD (%)	
	80 %	99.00		0.99	
	100 %	99.52		1.13	
	120 %	99.42		1.49	

Nhận xét: Quy trình đạt độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian với $RSD \leq 2\%$. Đối với tính tuyến tính, xét tính tương thích bằng trắc nghiệm F (phân phối Fisher), F thực nghiệm lớn hơn $F_{(0.05)}$ nên phương trình hồi quy có tính tương thích. Xét ý nghĩa của hệ số a và b trong phương trình hồi quy bằng trắc nghiệm t (phân phối Student) cho thấy hệ số a có ý nghĩa và hệ số b không có ý nghĩa. Vậy phương trình hồi quy của indapamid là $\hat{y} = 167.43x$ với $R^2 = 0.9991$. Miền giá trị của indapamid được xây dựng trong khoảng nồng độ 1-2 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. Thẩm định quy trình định lượng indapamid trong môi trường thử độ hòa tan pH 6.8

3.3.1. Tính tương thích hệ thống

Nhận xét: Giá trị RSD (%) của thời gian lưu, diện tích đỉnh đều nhỏ hơn 2.00%. Hệ số bất đối, độ phân giải và số đĩa lý thuyết biểu kiến đều nằm trong khoảng cho phép ($1 < k' < 8$; $R_s > 1.5$; $0.8 < A_s < 1.5$; $N \geq 2000$). Từ kết quả cho thấy các thông số sắc ký bao gồm diện tích đỉnh, thời gian lưu, hệ số bất đối, độ phân giải và số đĩa lý thuyết đều đạt yêu cầu. Như vậy, quy trình thử độ hòa tan ở pH 6.8 đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 7. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống ($n = 6$)

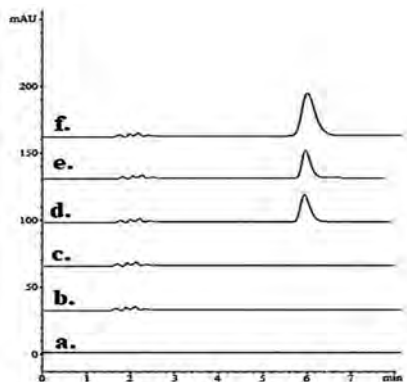
STT	S (mAU/s)	t_R (phút)	k'	R_s	A_s	N
1	255.10	6.19	5.10	4.36	0.80	3,564
2	249.60	6.17	5.09	4.13	0.90	3,711
3	250.30	6.18	5.09	4.56	0.90	3,654
4	248.90	6.18	5.08	4.21	1.00	3,612
5	251.31	6.22	5.08	4.21	0.80	3,655
6	248.25	6.22	5.09	4.09	0.80	3,541
TB	250.58	6.19	5.09	4.26	0.87	3,622.83
RSD (%)	0.98	0.35	-	-	-	-

(-): Không đánh giá

3.3.2. Tính đặc hiệu

Nhận xét: Sắc ký đồ của mẫu dung môi pha động, mẫu dung môi pha mẫu, mẫu giả được 16 giờ trong môi trường pH 6.8 đều không xuất hiện thêm các pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của các pic có trong mẫu chuẩn; sắc ký đồ của mẫu

thử hòa tan 16 giờ trong pH 6.8 có pic tương đương với thời gian lưu của pic có trong mẫu chuẩn; sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn có pic với chiều cao và diện tích tăng so với pic tương ứng trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Như vậy, quy trình đạt tính đặc hiệu.



Hình 2. Sắc ký đồ minh họa độ đặc hiệu

(a. dung môi pha động; b. dung môi pha mẫu; c. mẫu giả được 16 giờ trong môi trường pH 6.8; d. mẫu thử 16 giờ trong môi trường pH 6.8; e. mẫu chuẩn; f. mẫu thử thêm chuẩn)

3.3.3. Tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng

Bảng 8. Kết quả thẩm định tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng của quy trình thử độ hòa tan trong môi trường pH 6.8

Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 161.80x$	
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/mL}$)	0.3 - 2	
Hệ số tương quan (R^2)	0.9990	
Độ chính xác	Độ lặp lại ($n = 6$)	Độ chính xác trung gian ($n = 18$)

Độ chính xác		% so với nhãn	RSD (%)	% so với nhãn	RSD (%)
		100.17	0.88	100.58	0.85
Độ đúng (n = 9)	Mức nồng độ	Tỉ lệ thu hồi trung bình (%)		RSD (%)	
	80 %	99.87		0.63	
	100 %	98.60		0.41	
	120 %	99.21		0.90	

Nhận xét: Quy trình đạt độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian với $RSD \leq 2.00\%$. Đối với tính tuyến tính, xét tính tương thích bằng trắc nghiệm F (phân phối Fisher), F thực nghiệm lớn hơn $F_{(0.05)}$ do đó phương trình hồi quy có tính tương thích, xét ý nghĩa của hệ số a và b trong phương trình hồi quy bằng trắc nghiệm t (phân phối Student) cho thấy hệ số a có ý nghĩa và hệ số b không có ý nghĩa). Vậy phương trình hồi quy của indapamid là $\hat{y} = 161.80x$ với $R^2 = 0.9990$. Miền giá trị của indapamid được xây dựng trong khoảng nồng độ 0.3 - 2 $\mu\text{g/mL}$.

4. BÀN LUẬN

Indapamid là hoạt chất trong nhóm sulfonamid, có cấu trúc phân tử chứa gốc sulfamoyl chlorobenzamid, điều này tạo nên đặc tính phân cực mạnh với giá trị $\log P = 2.2$ [10], giúp hòa tan trong dung môi phân cực như methanol và nước, nhưng đồng thời vẫn có khả năng phân tách trong các cột sắc ký pha đảo. Trong sắc ký lỏng hiệu năng cao, để tối ưu quy trình phân tích chất có độ phân cực cao, thì pha đảo kém phân cực là lựa chọn tốt nhất. Các loại pha đảo kém phân cực phổ biến ví dụ như Luna C-18 hay Luna C-8. Trong đó, Luna C-18 có chuỗi alkyl dài hơn C-8, nên tính kỵ nước của cột Luna C-18 cao hơn, do đó, cung cấp độ lưu giữ cao hơn, cải thiện độ phân giải và phù hợp hơn với các hợp chất có độ phân cực cao như Indapamid. Vì vậy, cột sắc ký pha đảo Luna C-18 được lựa chọn nhằm cung cấp một pha tĩnh không phân cực thích hợp để tách các hợp chất có đặc tính phân cực như indapamid. Ngoài ra, indapamid có pKa khoảng 8.8, nên ở $\text{pH} < 8$, hợp chất này chủ yếu tồn tại ở dạng không ion hóa, ít tương tác với nhóm silanol trên pha tĩnh, hạn chế hiện tượng kéo đuôi pic và cải thiện khả năng rửa giải. Cột C-18 có vai trò quan trọng trong xác định pH cho pha động nhờ khả năng hoạt động ổn định trong khoảng pH 1.5 - 9.0 và tương thích tốt với hệ dung môi ACN - MeOH, cho phép khảo sát pha động trong khoảng pH 1.5 - 8.0. Từ đó, xác định được pH thích hợp là ACN -

MeOH - triethylamin 0.8% ($\text{pH} = 3$) dựa trên các thông số sắc ký ghi nhận được [11, 12].

Trong quá trình khảo sát thành phần pha động, việc tiến hành khảo sát hệ pha động chỉ gồm hai thành phần gồm methanol: đệm triethylamin 0.8% với hai tỷ lệ lần lượt lần lượt là 75:25 và 65:35, kết quả cho thấy các thông số sắc ký như độ tinh khiết pic, độ phân giải và hệ số bất đối của indapamid đều không đạt yêu cầu. Do đó, tiến hành khảo sát hệ pha động tiếp theo chỉ chứa acetonitril và đệm triethylamin 0.8% với hai tỷ lệ lần lượt là 75:25 và 65:45 nhằm đánh giá các thông số sắc ký. Kết quả cho thấy, các thông số sắc ký đã có phần cải thiện so với hệ pha động chứa methanol và đệm triethylamin 0.8%, nhưng kết quả vẫn chưa đạt yêu cầu. Sau khi tiến hành thử nghiệm với các hệ pha động trên, nhận thấy pha động chỉ sử dụng methanol giúp rút ngắn thời gian lưu so với hệ pha động chỉ sử dụng acetonitril. Trong khi đó, pha động chỉ sử dụng acetonitril đã cải thiện hệ số bất đối cũng như độ tinh khiết, độ phân giải của pic indapamid. Dựa trên cơ sở đó, tiến hành thử nghiệm với hệ pha động sử dụng đồng thời methanol, acetonitril và triethylamin 0.8% để khảo sát sự thay đổi của các thông số sắc ký. Sau cùng, các thông số sắc ký đều đạt yêu cầu khi sử dụng hệ pha động acetonitril - methanol - triethylamin 0.8% ($\text{pH} 3.0$) với tỉ lệ lần lượt là 42:3:55. Kết quả cho thấy các thông số sắc ký đã cải thiện rõ rệt, thời gian lưu được rút ngắn. Như vậy, trong quá trình khảo sát tỉ lệ pha động, hệ pha động 42:3:55 không chỉ dựa vào hệ số phân giải, mà còn dựa vào độ tinh khiết pic, và hệ số bất đối. Mặc dù hệ pha động 40:5:55 cũng cho kết quả thỏa mãn với điều kiện đưa ra, nhưng khi sử dụng hệ 40:5:55 để tiến hành thẩm định quy trình định lượng thì kết quả cho ra không đảm bảo tính lặp lại của phương pháp, mà hệ 42:3:55 thì đảm bảo được tính lặp lại đó. Do đó, nhóm sử dụng hệ 42:3:55. Bên cạnh đó, hệ pha động acetonitril - methanol - triethylamin ($\text{pH} 3.0$, 42:3:55) đạt hiệu

quả rửa giải tốt nhờ sự kết hợp giữa acetonitril và methanol, giúp cân bằng giữa khả năng rửa giải và độ phân giải của indapamid. Acetonitril có độ phân cực thấp hơn methanol, giúp giảm thời gian lưu và cải thiện độ sắc nét của pic, trong khi methanol tăng độ hòa tan của indapamid và kiểm soát sự rửa giải. Triethylamin trong hệ đệm pH 3.0 đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định pH pha động, hạn chế tương tác giữa indapamid và nhóm silanol trên bề mặt cột C-18 nhờ hạn chế dạng indapamid ion hoá, giúp giảm hiện tượng kéo đuôi pic và tăng độ lặp lại của phép đo. Ngoài ra, triethylamin còn đóng vai trò như chất hiệu chỉnh pic sắc ký, hoạt động như một chất chặn silanol, giảm hiện tượng kéo đuôi [13, 14].

Các yếu tố chính có thể ảnh hưởng đến độ chính xác của phép đo cần lưu ý bao gồm nhiệt độ cột và pH pha động. Việc kiểm soát nhiệt độ cột giúp duy trì độ nhớt ổn định của pha động, giảm sai số thời gian lưu của indapamid. Pha động chứa triethylamin 0.8% (pH = 3) quyết định mức độ ion hóa của indapamid, ảnh hưởng đến tương tác với pha tĩnh.

Quy trình định lượng indapamid trong viên nén phóng thích kéo dài và môi trường thử độ hòa tan pH 6.8 được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn ICH Q2(R1), đảm bảo đáp ứng các tiêu chí quan trọng như tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng.

So với các nghiên cứu trước đây chỉ tập trung vào định lượng indapamid trong nguyên liệu hoặc chế phẩm đa hoạt chất dạng bào chế truyền thống nhằm xác định hàm lượng, nghiên cứu này phát triển một quy trình định lượng chuyên biệt cho viên nén phóng thích kéo dài. Điều này không chỉ bổ sung dữ liệu khoa học cho quá trình bào chế công thức mà còn hỗ trợ công tác kiểm nghiệm, giúp kiểm soát chất lượng sản phẩm một cách chặt chẽ hơn. Đặc biệt, nghiên cứu còn triển khai thử nghiệm độ hòa tan *in vitro* trong môi trường pH 6.8, phản ánh môi trường ruột non - nơi chủ yếu

diễn ra quá trình hấp thu thuốc, giúp đánh giá mức độ giải phóng hoạt chất theo thời gian, đóng vai trò quan trọng trong việc thiết kế và cải thiện công thức bào chế, đảm bảo thuốc phóng thích hoạt chất ổn định và hiệu quả.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công quy trình định lượng indapamid 1.5 mg trong viên nén phóng thích kéo dài và môi trường pH 6.8 bằng phương pháp HPLC-DAD với điều kiện sắc ký: cột sắc ký Luna C-18 Column (250 x 4.0 mm; 5 μ m), bước sóng phát hiện 242 nm, tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 50 μ L, hệ pha động bao gồm acetonitril - methanol - dung dịch triethylamin 0.8% (pH 3.0) với tỉ lệ lần lượt là 42:3:55. Quy trình định lượng và quy trình thử độ hòa tan chế phẩm chứa indapamid phóng thích kéo dài bằng phương pháp HPLC với đầu dò DAD được thẩm định theo hướng dẫn ICH Q2(R1) và đạt các chỉ tiêu về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ đúng, tỷ lệ thu hồi (98 - 102%), độ chính xác (RSD < 2%) và tính tuyến tính đạt trong khoảng nồng độ 1 - 2 μ g/mL đối với quy trình định lượng indapamid trong chế phẩm và khoảng nồng độ 0.3 - 2 μ g/mL đối với phương pháp thử độ hòa tan ở pH 6.8, với hệ số tương quan $R^2 > 0.999$. Kết quả nghiên cứu có thể làm cơ sở cho các quy trình kiểm nghiệm chuyên biệt cho dạng bào chế phóng thích kéo dài chứa indapamid, ứng dụng để đánh giá tương đương sinh học *in vitro* và hỗ trợ phát triển các nghiên cứu bào chế viên nén phóng thích kéo dài chứa indapamid, góp phần nâng cao hiệu quả điều trị tăng huyết áp.

Định hướng nghiên cứu tiếp theo: Nghiên cứu bào chế viên nén phóng thích kéo dài indapamid 1.5 mg.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Trường Đại học Y Dược Cần Thơ đã hỗ trợ nhóm trong việc thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization, "More than 700 million people with untreated hypertension," 2021. [Online]. Available: <https://www.who.int/news/item/25-08-2021-more-than-700-million-people-with-untreated-hypertension>. [Accessed: Mar. 18, 2025].
- [2] A. Garg and A. Mishra, "Formulation and

Evaluation of Indapamide Hemihydrate Sustained Release Tablets", *Asian Pacific Journal of Health Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 30-36, 2022. DOI: 10.21276/apjhs.2022.9.1.08

- [3] V. McLernon, D. M. Williams, et al., "Comparative effectiveness and prescribing

trends of modified release and immediate release indapamide formulations: a cohort study in UK primary care," *BMJ Medicine*, vol. 4, no. 1, p. e000857, <https://doi.org/10.1136/bmjmed-2024-000857>.

[4] M. V. García-Rodríguez, H. López-Córcoles, G. L. Alonso, C. S. Pappas, M. G. Polissiou, and P. A. Tarantilis, "Comparative evaluation of an ISO 3632 method and an HPLC-DAD method for safranal quantity determination in saffron," *Food Chemistry*, vol. 221, pp. 838-843, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.089>

[5] Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam V*, tập 1, Hà Nội: Nhà xuất bản Y học, 2017.

[6] H. T. M. Duyên và cộng sự, "Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời amLodipin besilat và indapamid bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA", *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*, số 71, tr. 1-7, 2024. DOI: 10.58490/CTUMP.2024I71.2323.

[7] Đ. T. L. Linh và N. T. Nghĩa, "Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời indapamid và perindopril tert-butylamin trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Journal of Science and Technology*, tập 7, số 5, 2024. DOI: 10.55401/4TT4QP76.

[8] B. Das Mahant, V. Rajoriya, R. K. Jain, and V. Kashaw, "UV-Spectrophotometric and Stability Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of AmLodipine Besylate and Indapamide",

Analytical Chemistry Letters, vol. 6, no. 4, pp. 354-370, 2016. DOI: 10.1080/22297928.2016.1217787.

[9] K. P. Patel, U. K. Chhalotiya, H. M. Kachhiya, and J. K. Patel, "A new RP-HPLC method for simultaneous quantification of perindopril erbumine, indapamide, and amLodipine besylate in bulk and pharmaceutical dosage form", *Futur J Pharm Sci*, vol. 6, no. 1, 2020. DOI: 10.1186/S43094-020-00092-4.

[10] "Indapamide | C16H16ClN3O3S | CID 3702 - PubChem," Accessed: Mar. 18, 2025. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indapamide>.

[11] "Luna C18 HPLC Columns | Phenomenex," 2025. [Online]. Available: https://www.phenomenex.com/products/luna-hplc-column/luna-c18-2?srltid=AfmBOopL_zXnDTySEF-To1czAsFX3pCNjA4-Cs9w0Kc7XUnWhAhrUA8m. [Accessed: 18/03/2025].

[12] "Luna HPLC Columns | Phenomenex," 2025. [Online]. Available: <https://www.phenomenex.com/products/luna-hplc-column#overview>. [Accessed: 18/03/2025].

[13] "Why acetonitrile is used as solvent in HPLC System - uHPLCs," 2023. [Online]. Available: <https://uhplcs.com/acetonitrile-is-used-as-solvent-in-hplc/>. [Accessed: 18/03/2025].

[14] "Tip on Peak Tailing of Basic Analytes | Phenomenex," 2025. [Online]. Available: <https://discover.phenomenex.com/0924-lc-technical-tip-en>. [Accessed: 18/03/2025].

Quantification of indapamide 1.5 mg in extended-release tablets and pH 6.8 dissolution medium using HPLC-DAD method

Nguyen Hoang Quyen, Dao Nguyen Thanh Tai, Nguyen Doan Quynh An,
Le Thi Minh Ngoc and Huynh Thi My Duyen

ABSTRACT

Background: Hypertension is a serious chronic disease that requires consistent and regular medication. To enhance the effectiveness of treatment regimens and improve patient adherence, the development of extended-release formulations has garnered increasing attention. Among the antihypertensive agents studied, indapamide is a promising active, however, quantification of indapamide in tablet formulations and dissolution environments remains limited. Research objective: To develop mobile phase conditions, validate a quantitative process for indapamide in extended-release formulations, and establish an analysis method in a pH 6.8 dissolution medium. Research subjects and methods: A quantitative procedure for indapamide in extended-release formulations and in a pH 6.8 dissolution medium was developed and

validated using the HPLC-DAD method. Results: A quantitative procedure was developed and validated using HPLC-DAD under the following chromatographic conditions: Luna C-18 column (250 x 4.0 mm; 5 μ m), detection wavelength 242 nm, flow rate 1 mL/min, injection volume 50 μ L, and a mobile phase: acetonitrile-methanol-0.8 % triethylamine solution (pH 3.0) (42:3:55). Conclusion: The mobile phase system was successfully validated and met the requirements for the quantification of indapamide in 1.5 mg extended-release tablets and in the pH 6.8 dissolution medium.

Keywords: *indapamide, extended-release, high-performance liquid chromatography*

Received: 05/3/2025

Revised: 22/3/2025

Accepted for publication: 24/3/2025