

Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời piracetam và cinnarizin trong chế phẩm thuốc bằng điện di mao quản

Nguyễn Thị Như Ngọc*, Huỳnh Trọng Văn, Trần Thị Thọ
Lê Thị Bảo Trâm, Phan Phước Thắng, Trần Hữu Dũng
Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Summary

A capillary electrophoresis method for simultaneous determination of piracetam and cinnarizine in pharmaceutical formulations was established: Fused-silica capillary column (effective column length: 31.5 cm, total column length 40.0 cm; internal diameter: 100 μ m); background electrolyte: 200 mM acetate buffer at pH 5 in water : methanol (2:1, v/v); voltage: 20 kV; current: 300 μ A; column temperature: 25 $^{\circ}$ C; sample injection: 35 mBar - 4s; detection at 214 nm. The method was validated for the system compatibility, specificity, linearity range, precision and accuracy; the recovery greater than 98%. The method can be applied to assess the content of piracetam and cinnarizine in preparations.

Keywords: Piracetam, cinnarizine, capillary electrophoresis.

Đặt vấn đề

Trên thị trường hiện có nhiều chế phẩm thuốc phối hợp cinnarizin và piracetam. Cinnarizin thường được biết đến là thuốc kháng histamin H1 dùng để phòng say tàu xe, rối loạn tiền đình như chóng mặt, ù tai, buồn nôn, nôn trong bệnh Ménière, rối loạn mạch não và mạch ngoại vi khác. Piracetam tác động đến não và hệ thần kinh trung ương, có tác dụng bảo vệ hệ não bộ khỏi tình trạng thiếu hụt oxy. Hai hoạt chất này thúc đẩy lẫn nhau chống giảm oxy, tăng lưu lượng máu não; thường dùng điều trị rối loạn tiền đình, phòng ngừa say tàu xe, say sóng và chứng đau nửa đầu, thiếu máu cục bộ...^[1].

Hiện nay, ở Việt Nam và trên thế giới chỉ có các quy trình định lượng riêng từng thành phần hoặc định lượng đồng thời cinnarizin và piracetam bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, quang phổ **UV-Vis**, sắc ký lớp mỏng, chuẩn độ acid - base... nhưng chưa có quy trình định lượng đồng thời cinnarizin và piracetam trong chế phẩm bằng điện di mao quản. Xuất phát từ những lí do trên, đề tài "Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời piracetam và cinnarizin

trong chế phẩm thuốc bằng điện di mao quản" được thực hiện với hai mục tiêu: Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời piracetam và cinnarizin trong chế phẩm thuốc bằng điện di mao quản; Ứng dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng một số chế phẩm chứa piracetam và cinnarizin lưu hành trên thị trường.

Nguyên liệu và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Một số chế phẩm chứa đồng thời piracetam và cinnarizin, các mẫu được mã hóa từ CP01 đến CP05.

Trang thiết bị, dung môi, hóa chất

Chất đối chiếu: Cinnarizin - Số kiểm soát 0103171, hàm lượng 100,08 %, độ ẩm 0,04 % (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương). Piracetam - Số kiểm soát 0217291.02 - hàm lượng 100,15 % (nguyên trạng) (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

Trang thiết bị: Máy điện di mao quản Agilent 7100 đầu dò PDA (Mỹ); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức); cân phân tích A&D (Hàn Quốc); máy đo pH Sension⁺ pH3 Hach (Mỹ); micropipet Labnet (Mỹ) và các dụng cụ thủy tinh chính xác.

Dung môi - hóa chất: Methanol (MeOH), CH₃COOH, CH₃COONa, NaH₂PO₄, natri tetraborat decahydrat, acid boric, acid phosphoric đều có nguồn gốc từ Hãng Merck (Đức); NaOH, nước deion có nguồn gốc từ Công ty Agilent (Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Như Ngọc

Email: ntnngoc@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận: 22/5/2021

Ngày phản biện: 13/7/2021

Ngày duyệt bài: 24/8/2021

Chuẩn bị mẫu

Mẫu chuẩn: Pha dung dịch chuẩn gốc cinnarizin 1000 ppm và piracetam 2000 ppm trong MeOH, lắc đều, siêu âm, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Phối hợp và pha loãng dung dịch chuẩn gốc với MeOH để được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ phù hợp.

Mẫu trắng: MeOH.

Mẫu thử: Cân một lượng bột thuốc tương đương 40 mg piracetam (hoặc tương đương 2,5 mg cinnarizin) cho vào bình định mức 100 ml, thêm MeOH đến vạch, lắc đều, siêu âm 15 phút ở nhiệt độ 25 $^{\circ}\text{C}$, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Tiêm vào hệ thống điện di.

Khảo sát điều kiện điện di

Cố định các thông số: Cột mao quản silica (Chiều dài hiệu dụng: 31,5 cm - chiều dài tổng: 40 cm - đường kính ngoài: 360 μm , đường kính trong: 100 μm), nhiệt độ cassette: 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$, điện thế nguồn: 20 kV, cường độ dòng: 300 μA , bước sóng phát hiện: 214 nm, tiêm mẫu: 35 mBar - 4 giây. Khảo sát lựa chọn dung dịch điện ly nền (BGE): đệm borat 25 mM pH 9, đệm phosphat 25 mM pH 7, đệm acetat 200 mM pH 5, đệm acetat 200 mM pH 5 - MeOH = 2 - 1.

Xử lý cột: Hoạt hóa cột mao quản lần đầu: Nước 5 phút - NaOH 1 M 30 phút - NaOH 0,1 M 30 phút - nước 5 phút - BGE 5 phút. Giữa các lần tiêm: NaOH 0,1 M 2 phút - nước 2 phút - BGE 2 phút.

Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp được thẩm định theo yêu cầu của ICH (International Conference on

Harmonisation) về thẩm định qui trình phân tích gồm các tiêu chí: Tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác [3].

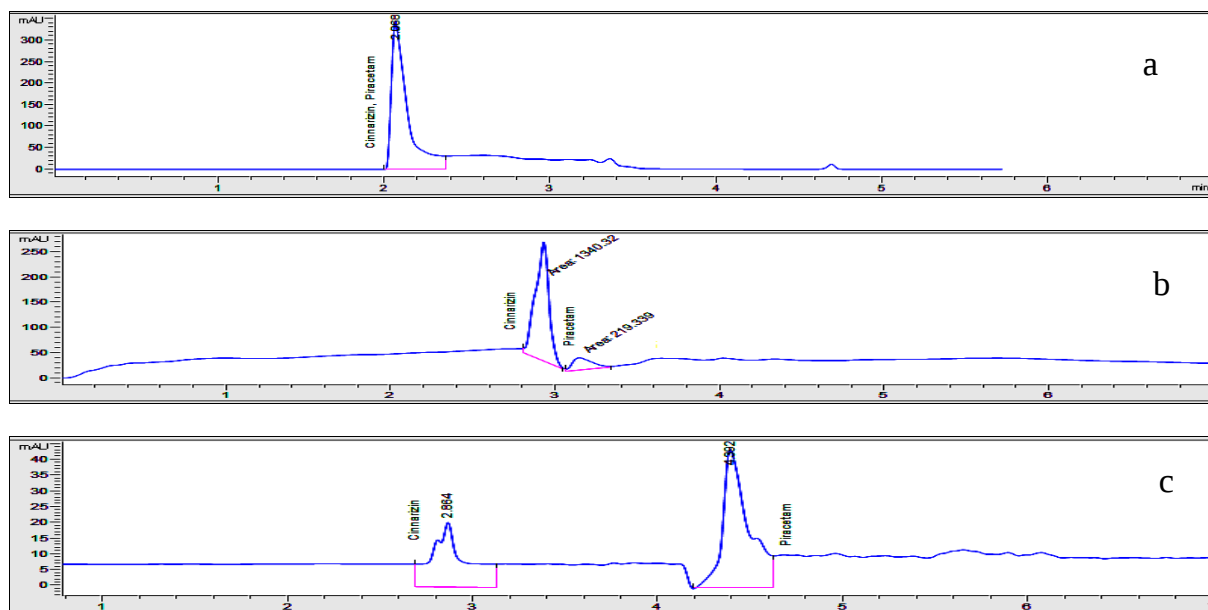
Xử lý số liệu

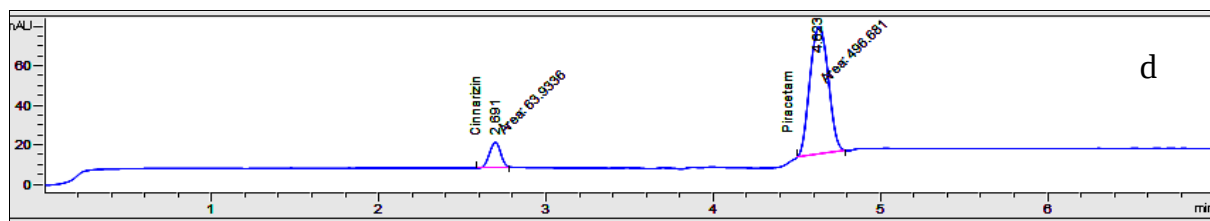
Các số liệu được xử lý thống kê và tính toán dựa vào phần mềm Microsoft Excel 2013.

Kết quả và bàn luận

Kết quả khảo sát điều kiện điện di

Mẫu thử được xử lý theo quy trình được sử dụng để khảo sát điều kiện điện di với các dung dịch BGE khác nhau. Kết quả trên điện di đồ thu được cho thấy: Khi sử dụng dung dịch đệm acetat 200 mM pH 5 (hình 1c) cho các pic tách nhau hoàn toàn so với dung dịch đệm borat 25 mM pH 9 (hình 1a) và đệm phosphat 25 mM pH 7 (hình 1b) nhưng pic piracetam và cinnarizin bị che và xấu chân. Tiếp tục phối dung dịch đệm acetat 200 mM pH 5 với MeOH theo tỷ lệ 2:1 thì hình dạng các pic tốt hơn (hình 1d). Phương pháp sử dụng kỹ thuật điện di mao quản vùng, pH là yếu tố quyết định khả năng tách các chất. Tại pH 5 cho kết quả tách tốt nhưng hình dạng pic chưa tốt. Việc thêm dung môi hữu cơ vào hệ đệm làm thay đổi hằng số điện môi của dung dịch điện ly nền dẫn đến thay đổi tốc độ dòng điện thẩm, ngoài ra còn cải thiện độ tan của các chất phân tích nên góp phần cải thiện hình dạng pic. Thời gian các pic ra hết trong vòng 5 phút, nhanh hơn so với phương pháp **HPLC** đã công bố là 7 phút [4].





Hình 1. Điện di đồ khảo sát các dung dịch điện ly nền
a) Đệm borat 25 mM pH 9, b) Đệm phosphat 25 mM pH 7,
c) Đệm acetat 200 mM pH 5, d) Đệm acetat 200 mM pH 5 - MeOH = 2 - 1

Từ kết quả này, lựa chọn điều kiện điện di là: Cột mao quản silica (Chiều dài hiệu dụng: 31,5 cm - chiều dài tổng: 40 cm - đường kính ngoài: 360 μ m, đường kính trong: 100 μ m), nhiệt độ cassette: 25 ± 1 $^{\circ}$ C, điện thế nguồn: 20 kV, cường độ dòng: 300 μ A, bước sóng phát hiện: 214 nm, tiêm mẫu: 35 mBar - 4 giây, dung dịch điện ly nền: Đệm acetat 200 mM pH 5 - MeOH = 2 - 1.

Kết quả thẩm định phương pháp

Tính phù hợp hệ thống: Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch hỗn hợp chuẩn gồm cinnarizin 25 ppm và piracetam 400 ppm trong MeOH. Kết quả khảo sát: RSD của thời gian lưu và diện tích pic < 3% [2], hệ số đối xứng: $0,8 \leq A_s \leq 1,5$; độ phân giải giữa các pic $R_s \geq 1,5$; số đĩa lý thuyết $N > 2000$ cho thấy hệ thống điện di mao quản tương thích để phân tích định lượng đồng thời cinnarizin và piracetam.

Bảng 1. Khảo sát tính phù hợp hệ thống ($n = 6$)

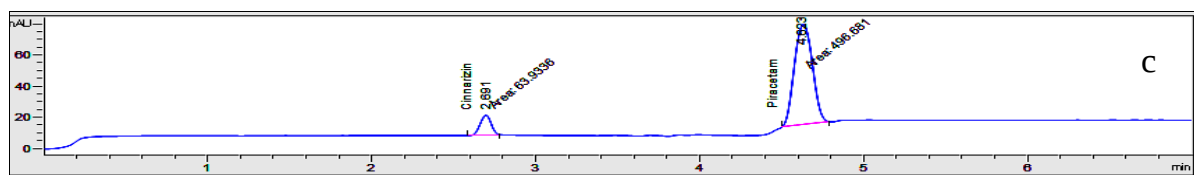
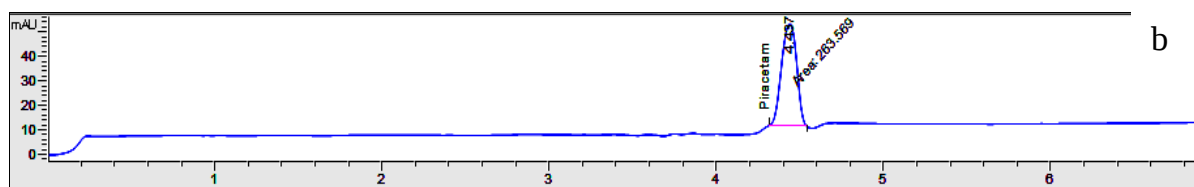
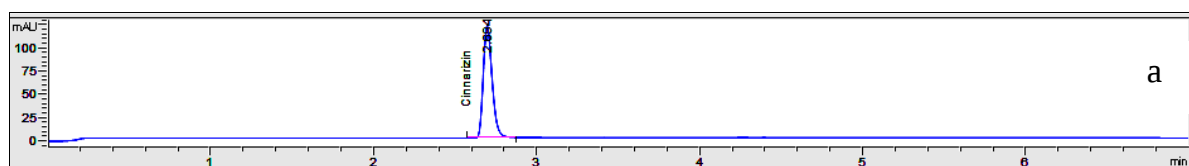
		t_R (phút)	S (mAU.s)	A_s	N	R_s
Cinnarizin	TB	2,878	59,4	0,9	6560	-
	RSD (%)	1,6%	0,4%			
Piracetam	TB	4,647	385,3	0,8	8136	10,1
	RSD (%)	1,6%	0,1%			

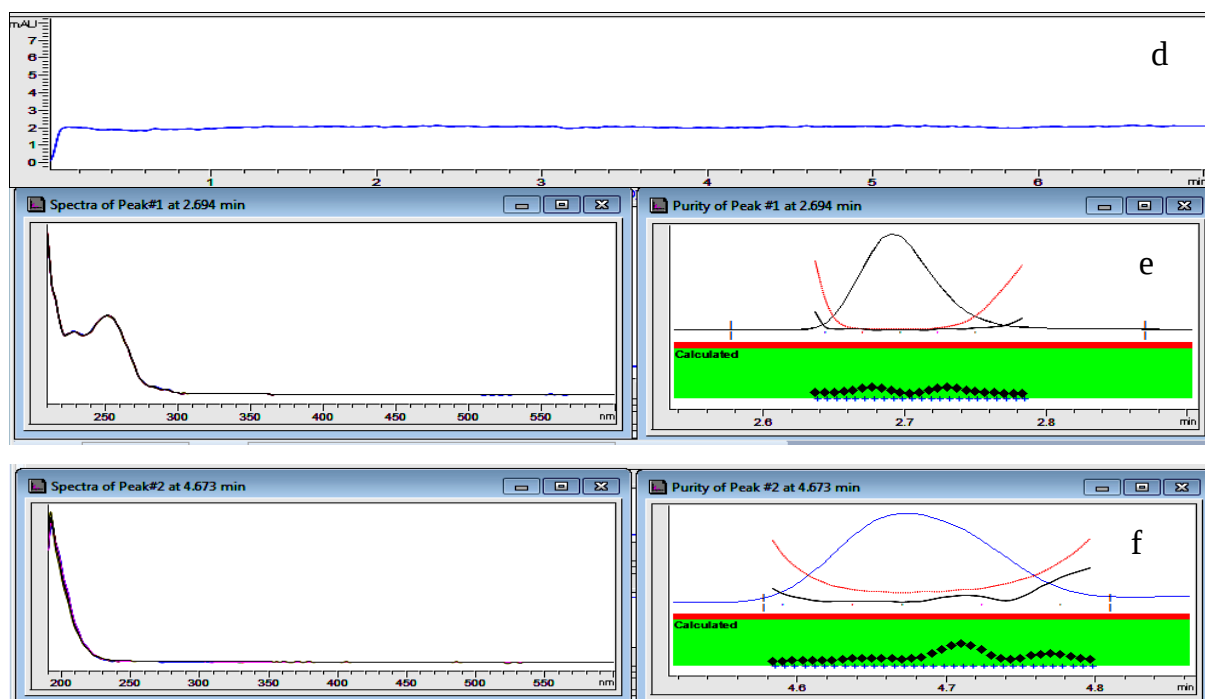
(t_R : thời gian lưu; S : diện tích pic; N : Số đĩa ký thuyết; A_s : Hệ đối xứng; R_s : Độ phân giải)

Tính đặc hiệu

Tiến hành điện di mẫu trắng, mẫu chuẩn cinnarizin, mẫu chuẩn piracetam và mẫu thử với cùng điều kiện. Kết quả cho thấy: Trên mẫu thử xuất hiện pic cinnarizin và piracetam có thời gian lưu tương ứng trên điện di đồ mẫu chuẩn cinnarizin và piracetam, trên điện di đồ của

mẫu trắng không có pic tương ứng, các pic tách nhau hoàn toàn (độ phân giải $R_s \geq 1,5$); các pic đạt độ tinh khiết pic cao. Phổ **UV-Vis** tại thời gian lưu trên điện di đồ mẫu thử giống với mẫu chuẩn (hình 2). Các kết quả này cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu.





Hình 2. Điện di đồ tính đặc hiệu (a) mẫu chuẩn cinnarizin, b) mẫu chuẩn piracetam, c) mẫu thử và (d) mẫu trắng; phổ UV-Vis và độ tinh khiết (e) cinnarizin và (f) piracetam

Tính tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc, pha dãy dung dịch chuẩn cinnarizin 10 – 40 ppm và piracetam 160 – 640 ppm trong MeOH. Tiến hành điện di, ghi nhận diện tích pic cinnarizin và piracetam. Sử dụng chức năng phân tích hồi quy “Regression” trong Excel 2013, sử dụng trắc nghiệm F để kiểm tra tính tương thích của phương trình

hồi quy, trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số a, b. Kết quả cho thấy có mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ ($R \geq 0,99$) với phương trình hồi quy của cinnarizin và piracetam tương ứng là $\hat{y} = 2,41x$ và $\hat{y} = 0,75x + 120,71$.

Bảng 2. Kết quả tính tuyến tính

	Khoảng tuyến tính (ppm)	Hệ số tương quan R	Significance F	P-value _a	P-value _b	Phương trình hồi quy
Cinnarizin	10 – 40	0,99	$1,68 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$	0,49	$\hat{y} = 2,41x$
Piracetam	160 – 640	0,99	$4,81 \times 10^{-5}$	0,47	5×10^{-3}	$\hat{y} = 0,75x + 120,71$

Độ chính xác

Độ lặp lại: Tiến hành điện di 6 mẫu thử được xử lý mẫu theo quy trình đã chọn trong cùng ngày. Xác định % hàm lượng các chất trong các mẫu thử dựa vào mẫu chuẩn được chuẩn bị trong cùng ngày.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành tương tự độ lặp lại nhưng khác ngày. Tính RSD (%) của hàm lượng các chất trong ngày và khác ngày, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả độ chính xác

		Lặp lại (n = 6)	Chính xác trung gian (n = 6)
Cinnarizin	Hàm lượng trung bình	99,64%	99,44%
	RSD	1,10%	0,99%
Piracetam	Hàm lượng trung bình	100,13%	100,18%
	RSD	0,77%	0,78%

Độ lặp lại và chính xác trung gian mỗi chất đều có RSD $\leq 2\%$, đạt yêu cầu cho một quy trình định lượng^[3]. Kết quả hàm lượng trung bình của mỗi chất giữa độ lặp lại và độ chính xác trung gian khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Độ đúng

Độ đúng được tiến hành bằng cách thêm một lượng chất chuẩn mỗi chất ở 3 mức tương ứng với 10%, 20%, 30% so với nồng độ định lượng vào mẫu thử, mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Tính tỷ lệ thu hồi (%), kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả độ đúng

Cinnarizin					Piracetam				
Chuẩn thêm vào (μg)	Lượng tìm thấy (μg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	TB (%)	RSD (%)	Chuẩn thêm vào (μg)	Lượng tìm thấy (μg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	TB (%)	RSD (%)
250	250,1	100,0	100,4	0,6	6000	6002,7	100,0	100,0	0,1
250	250,1	100,0			6000	6009,2	100,2		
250	252,5	101,0			6000	5995,9	99,9		
500	491,5	98,3	100,1	1,8	12000	12013,5	100,1	99,7	1,4
500	509,1	101,8			12000	11773,3	98,1		
500	501,3	100,3			12000	12095,2	100,8		
750	737,9	98,4	100,1	1,5	18000	17683,0	98,2	98,7	0,5
750	758,7	101,2			18000	17797,8	98,9		
750	755,4	100,7			18000	17837,2	99,1		

Nhận xét: Độ đúng đạt yêu cầu với tỷ lệ thu hồi mỗi chất nằm trong khoảng giới hạn cho phép là 98 – 102%^[3].

Ứng dụng phương pháp đã xây dựng trên một số chế phẩm lưu hành trên thị trường

Phương pháp đã thẩm định đủ độ tin cậy để đánh giá hàm lượng cinnarizin và piracetam trong một số chế phẩm trên thị trường (CP01 đến CP05) dưới dạng kết hợp 400 mg piracetam và 25 mg cinnarizin (bảng 5).

Bảng 5. Kết quả định lượng một số chế phẩm trên thị trường

STT	Mã hóa chế phẩm	Hàm lượng so nhãn trung bình	
		Cinnarizin	Piracetam
1	CP01	100,13%	99,84%
2	CP02	101,07%	100,28%
3	CP03	99,35%	100,27%
4	CP04	98,56%	98,87%
5	CP05	98,62%	101,18%

Nhận xét: Các chế phẩm trên thị trường có hàm lượng cinnarizin và piracetam có hàm lượng so với giá trị trên nhãn từ 98,56 - 101,18%, đều nằm trong giới hạn chấp nhận cho phép của cinnarizin là 90 - 110% và của piracetam là 93 - 107%^[2].

Kết luận

Phương pháp định lượng đồng thời cinnarizin và piracetam trong chế phẩm bằng điện di mao quản đã xây dựng được có tính chọn lọc, độ chính xác cao (RSD $< 2\%$), độ đúng tốt với độ thu hồi từ 98,2 - 101,8%, khoảng tuyến tính phù hợp và quy trình xử lý mẫu khá đơn giản. Phương pháp này có thể ứng dụng để kiểm soát chất lượng các sản phẩm chứa cinnarizin và piracetam trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội, tr. 107-384
2. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, Tập 1, NXB Y học, Hà Nội, tr. 266, tr. 270-271, PL. 157-162.
3. International Conference on Harmonisation (2005), "Validation of Analytical Procedures: Text and methodology", *ICH Secretariat*, pp. 1-17.
4. Lâm Hoàng Lệ Vân, Phan Thanh Dũng (2018), "Xây dựng quy trình định lượng đồng thời piracetam và cinnarizin trong chế phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao", *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, phụ bản tập 22, số 1, tr.182-188.