Xây dựng phương pháp định lượng các đồng phân đối quang của Salbutamol trong viên nén bằng điện di mao quản

Nguyễn Thị Bảo Ngọc, Lê Thị Loan Chi*
Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Mẫu salbutamol dạng racemic trong viên nén trên thị trường chứa hỗn hợp 2 đồng phân đối quang gồm *R*-Salbutamol (Levosalbutamol) và *S*-Salbutamol (Dextrosalbutamol). Khi dùng điều kiện điện di bình thường thì hỗn hợp này chỉ tạo thành 01 pic trên điện di đồ. Việc tìm kiếm nhiều điều kiện khác nhau, đặc biệt, sử dụng thêm các tác nhân chọn lọc bất đối để có thể tách riêng các đồng phân đối ảnh của salbutamol là điều cần thiết. Công trình này được tiến hành với hai mục tiêu: 1) Xây dựng phương pháp tách các đồng phân đối quang Sabutamol bằng phương pháp điện di mao quản. 2) Thẩm định phương pháp xây dựng được. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** *Đối tượng*: Mẫu Salbutamol dạng viên nén. *Phương pháp nghiên cứu*: Tối ưu hóa quy trình điện di phân tách được các đồng phân đối quang của Salbutamol, thẩm định phương pháp theo ICH, AOAC. **Kết quả:** Điều kiện điện di: Cột mao quản silica nung chảy, chiều dài tổng cộng 52,5 cm, chiều dài hiệu dụng 44 cm, ID 50 µm, điện thế 20 kV; nhiệt độ cột 25°C; bước sóng phát hiện 225 nm; áp suất tiêm mẫu 50 mbar; thời gian tiêm mẫu 5s, dung dịch điện ly nền: Tris 60 mM pH1; Tác nhân đối quang methyl-b-cyclodextrin 250mg/ml. Phương pháp được thẩm định đạt các yêu cầu theo ICH, AOAC. **Kết luận:** Phương pháp có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính phù hợp, độ chọn lọc cao, giới hạn phát hiện tốt được dùng để phân tách các đồng phân đối ảnh của Salbutamol trong chế phẩm viên nén.

Từ khóa: *Salbutamol, điện di mao quản, methyl-b-cyclodextrin, Levosalbutamol, Dextrosalbutamol*

Separation of Salbutamol enantiomers in tablets by capillary electrophoresis

*Nguyen Thi Bao Ngoc, Le Thi Loan Chi**
Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Background: The Salbutamol sample in tablets which contains a mixture of 2 enantiomers including *R*-salbutamol (Levosalbutamol) and *S*-Salbutamol (Dextrosalbutamol), as usal it forms racemate on the market. When using normal electrophoretic conditions, this racemic mixture only forms 01 peak on the electrophoretic chart. It is necessary to find conditions, in especially, using chiral selective agents, to separate the enantiomers of Salbutamol. This work was conducted with two objectives: 1) To develop a method to separate the enantiomers of salbutamol by capillary electrophoresis. 2) To validate the researched method. **Materials and methods:** *Materials:* Salbutamol in tablets. *Methods*: After optimizing the process to separate the enantiomers of salbutamol by capillary electrophoresis, the method was validated according to ICH and AOAC guidelines and applying the method to analyze samples. **Results**: Electrophoresis conditions: Fused-silica capillary column (effective column length: 44 cm, total column length 52,5 cm, internal diameter: 50 µm), background electrolyte (BGE): Tris 60 mM at pH 1, voltage: +20 kV, column temperature: 25 °C, chiral selective agent: methyl-b-cyclodextrin 250mg/ml. The method was validated and met ICH and AOAC requirements. **Conclusion**: The method with high precision and selectivity, excellent detection limit was used to separate the enantiomers of salbutamol in tablets.

Key words: *salbutamol, capillary electrophoresis, methyl-b-cyclodextrin, Levosalbutamol, Dextrosalbutamol.*

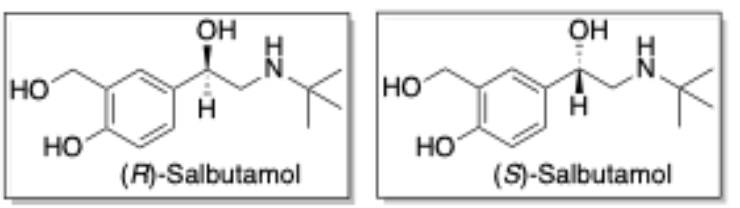
1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong ngành công nghiệp dược phẩm ngày nay, 56% thuốc hiện đang được sử dụng là sản phẩm thuốc có chọn lọc đồng phân đối quang và 88% thuốc được bán trên thị trường dưới dạng racemic bao gồm hỗn hợp bằng nhau của hai chất đồng phân đối quang [1]. Mặc dù các đồng phân đối quang này thường có cấu trúc hóa học giống nhau nhưng hầu

** Tác giả liên hệ: Lê Thị Loan Chi. Email: ltlchi@huemed-univ.edu.vn*
Ngày nhận bài: 5/12/2024; Ngày đồng ý đăng: 25/07/2025; Ngày xuất bản: 25/09/2025
DOI: 10.34071/jmp.2025.5.xx

hết một trong số chúng đôi khi lại thể hiện sự khác biệt rõ rệt về các hoạt tính sinh học như dược lý học, độc tính học, dược động học, chuyển hóa, v.v. Do đó, điều quan trọng là phải thúc đẩy quá trình phân tách và định lượng được các thuốc có chứa đồng phân đối ảnh trong ngành dược phẩm để loại bỏ các đồng phân không mong muốn khỏi chế phẩm, tìm ra phương pháp điều trị tối ưu cũng như kiểm soát điều trị phù hợp cho bệnh nhân. Việc tách các đồng phân đối ảnh trong các loại thuốc racemic là một hoạt động cần thiết trong ngành dược phẩm cũng như trong điều trị lâm sàng. Vì vậy, việc phát triển các kỹ thuật phân tách các đồng phân đối ảnh đã, đang và sẽ là chủ đề quan trọng trong nghiên cứu học thuật cũng như tiến bộ trong nền công nghiệp dược phẩm [2].

Salbutamol là một thuốc đã được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh về đường hô hấp ở người và thường được bào chế dưới dạng thuốc racemic. Tuy nhiên, gần đây đồng phân *R*-salbutamol (Levosalbutamol) đã được đưa vào thực hành lâm sàng trong điều trị bệnh hen suyễn ở người và điều này được cho là một cải tiến về dạng racemic của thuốc. Nguyên nhân là vì một số nghiên cứu đã chứng minh đồng phân *S*-Salbutamol (Dextrosalbutamol) có tác dụng phụ ở phổi (gia tăng khả năng co thắt phế quản) khi sử dụng thường xuyên [3] (*Hình 1*). Mặc dù, cho đến nay vẫn chưa có quy định chính thức về việc xác định hàm lượng *R*- và *S*- trong hỗn hợp racemic của Salbutamol, tuy nhiên vì những lý do bất cập về đồng phân *S*- nên việc tiếp cận và phân tách được các đồng phân đối quang của Salbutamol là cần thiết. Hơn nữa, Dược điển Việt Nam V đã có nhiều chuyên luận về việc quy định mức giới hạn tạp chất đối quang cho các dược chất [4], minh chứng cho việc nghiên cứu phân tách các sản phẩm bất đối đóng vai trò không thể thiếu trong lĩnh vực dược học. Việc tiếp cận các kĩ thuật phân tách đồng phân, đặc biệt là phân tách Salbutamol sẽ làm tiền đề cho việc phân tách được nhiều dược chất ở dạng racemic khác đang lưu hành trên thị trường.



Hình 1. Công thức cấu tạo hai đồng phân *R*- và *S*- của Salbutamol

Ngoài ra, điện di mao quản (CE) là một công cụ hiệu quả để phân giải các chất đồng phân đối quang với ưu điểm là kỹ thuật đơn giản, ít tốn dung môi, hiệu quả, ít tốn kém, linh động trong việc thay đổi tác nhân đối quang nên đáp ứng được nhiều dược chất khác nhau. Quá trình này liên quan đến việc sử dụng một bộ chọn bất đối trong một dung dịch điện phân để phân biệt các đồng phân đối quang của một hỗn hợp racemic, bộ chọn bất đối xứng có thể nhận diện và tương tác với các đồng phân đối quang khác nhau theo cách khác nhau, do sự khác biệt về cấu trúc hình học của chúng. Trên thực tế, CE bất đối đã là chủ đề được chú ý nhiều và đã được áp dụng thành công để phân tách đồng phân đối quang của các hợp chất bất đối khác nhau trong thập kỷ qua. Các chất chọn lọc bất đối được sử dụng cho mục đích này bao gồm cyclodextrin (CD) và các dẫn xuất của cyclodextrin (a-cyclodextrin (a-CD), b-cyclodextrin (b-CD), methyl-b-cyclodextrin (Me-b-CD); hydroxypropyl-b-cyclodextrin (HP-b-CD), ete bất đối, oligosacarit không vòng và polysacarit, protein và peptide, phức hợp kim loại và chất hoạt động bề mặt bất đối [5] …Nhóm nghiên cứu chỉ tìm được một đề tài nghiên cứu liên quan đến việc tách các đồng phân quang học Salbutamol bằng điện di mao quản dưới hình thức là đề tài cấp trường, tuy nhiên chúng tôi hoàn toàn không tìm thấy được dữ liệu khoa học liên quan đến công trình này. Ngoài ra, việc thực hiện phân tách với mỗi loại cấu hình điện di khác nhau sẽ cho nhiều dữ liệu nghiên cứu khác nhau, hơn nữa, bằng việc tiếp cận phân tách các đồng phân đối quang của Salbutamol, cũng sẽ làm tiền đề cho việc phân tách được nhiều dược chất ở dạng racemic khác đang lưu hành trên thị trường. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này, bàng việc sử dụng cyclodextrin (CD) hoặc các dẫn xuất của cyclodextrin như tác nhân chọn lọc bất đối trong việc phân tách các đồng phân đối ảnh, với hai mục tiêu: 1) Xây dựng phương pháp tách các đồng phân đối quang Sabutamol bằng phương pháp điện di mao quản. 2) Thẩm định phương pháp xây dựng được.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu salbutamol sunfat ở dạng racemic (*Bảng 1*)

Bảng 1. Mẫu salbutamol sunfat ở dạng racemic

Biệt dược	Hoạt chất	Nhà sản xuất	Số lô – Số đăng ký	Hạn dùng
Salbutamol 2mg	Salbutamol sulfat	THE MEDICPHARMA CO.,LTD (Thái Lan)	Lot No 096678 1A 358/40	24/04/2024

Chất đối chiếu:

- Chuẩn sabutamol dạng Racemic (*Bảng 2)*

Bảng 2. Chuẩn salbutamol sunfat ở dạng racemic

Hoạt chất	Số kiểm soát	Hàm lượng tính trên chế phẩm nguyên trạng (%)	Nơi cung cấp
Salbutamol sulfat	QT 105 060913	98,79	Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh

- Chuẩn *R*-sabutamol (Levosalbutamol) Levolin 0.63mg Respules 5X2.5 ml

Trang thiết bị: Cân phân tích HR - 250AZ (Hàn Quốc); máy lắc xoáy Vortex, micropipet Labnet (Mỹ); tủ lạnh bảo quản mẫu TOSHIBA (Nhật); Máy điện di mao quản Agilent 7100 đầu dò PDA (Mỹ); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức) và các dụng cụ thủy tinh chính xác.

Dung môi - hóa chất: Natri tetraborat decahydrat ($Na_2B_4O_7.10H_2O$), acid boric (H_3BO_3), methanol (MeOH) và nước (H_2O) của Merck (Đức); đệm Tris của Merck (Đức), NaOH 1N và NaOH 0,1 N của Agilent (Mỹ); các chất chọn lọc đối quang b-cyclodextrin (b-CD), methyl-b-cyclodextrin (Me-b-CD), hydroxypropyl-b-cyclodextrin (HP-b-CD) của TCI (Nhật bản).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn Salbutamol 100 µg/mL: Cân chính xác 1 mg Salbutamol, cho vào bình định mức 10 mL, thêm nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn Salbutamol 100 µg/mL.

Dung dịch mẫu chuẩn R-sabutamol (Levosalbutamol) 250 µg/mL và dãy nồng độ 50; 20; 17,5; 12,5; 2,5 µg/mL: Cân chính xác 2.5 mg Salbutamol, cho vào bình định mức 10 mL, thêm nước cất vừa đủ đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn *R*-Salbutamol 250 µg/mL. Từ dung dịch chuẩn này, sử dụng micropipet và bình định mức 10 mL để pha loãng dần các nồng độ tiếp theo.

Dung dịch mẫu thử Salbutamol 100 µg/mL:

Cân 20 viên chế phẩm, tính khối lượng trung bình một viên, nghiền thành bột mịn. Cân một lượng thuốc tương đương với 1 mg Salbutamol cho vào bình định mức 10 ml, thêm nước cất, siêu âm cho tan hết. Để nguội, thêm nước tới vạch. Lọc qua giấy lọc, thu được dung dịch mẫu thử Salbutamol 100 µg/mL.

Xây dựng quy trình phân tách các đồng phân đối quang của Salbutamol bằng điện di mao quản đầu dò UV – Vis

Khảo sát các điều kiện điện di của Salbutamol dạng racemic khi chưa thêm tác nhân đối quang Dựa vào tính chất lý hóa của Salbutamol, tiến hành khảo sát sơ bộ các điều kiện điện di bao gồm gồm nồng độ dung dịch đệm, pH dung dịch đệm bước sóng phát hiện, nhằm tạo ra một pic Salbutamol chuẩn, đẹp; sau đó mới tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của các tác nhân đối quang để tách riêng được các đồng phân đối ảnh của Salbutamol với mục đích tiết kiệm thời gian vì khi cho tác nhân đối quang vào thời gian lưu sẽ kéo dài hơn, ngoài ra, thực hiện bước khảo sát này cũng thể hiện rằng, trong dung dịch khảo sát chỉ tồn tại tác chất salbutamol.

Khảo sát các điều kiện điện di của Salbutamol dạng racemic khi thêm tác nhân đối quang:

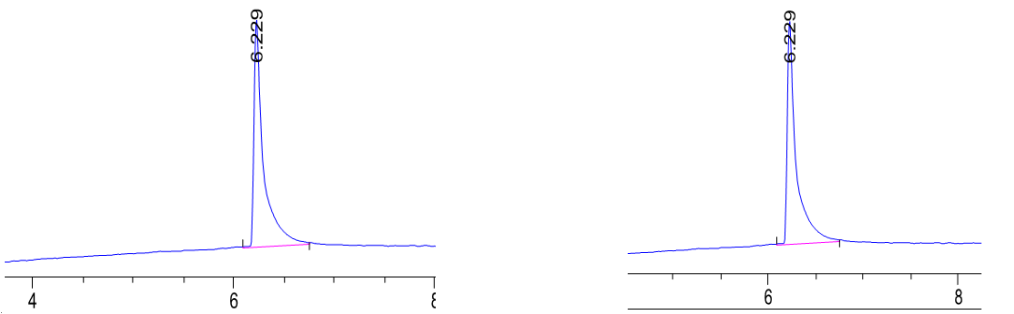
Sử dụng các điều kiện điện di đã khả sát ở trên, tiến hành khảo sát thêm tác nhân đối quang nhằm phân tách được các đồng phân đối quang của Salbutamol. Các chất chọn lọc đối quang có thể được lựa chọn khảo sát bao gồm: CD, b-CD, M-b-CD, HP-b-CD và hỗn hợp M-b-CD + HP-b-CD và một số điều kiện khác như nồng độ dung dịch đệm, nhiệt độ cột, điện thế.

Thẩm định phương pháp: Tính đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng theo hướng dẫn ICH, AOAC [6,7].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

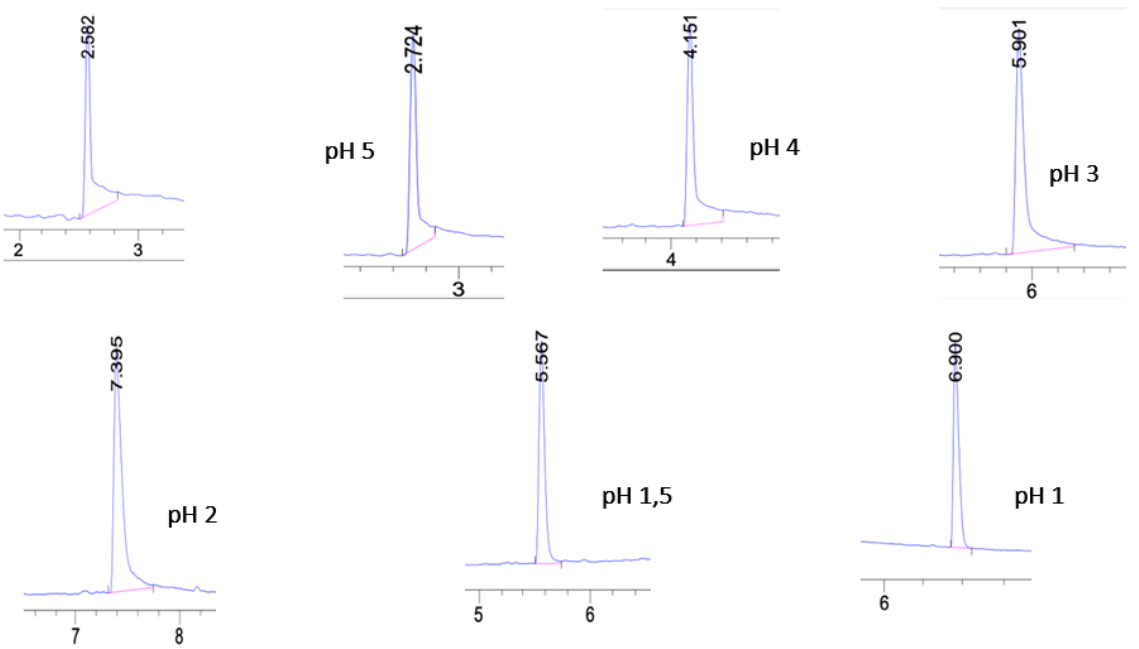
3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện điện di mao quản đầu dò UV – Vis

Khảo sát các điều kiên điện di của Salbutamol khi chưa thêm tác nhân đối quang: Sử dụng chuẩn Sabultamol dạng racemic để khảo các điều kiện điện di sau: Khảo sát bước sóng phát hiện (220 nm, 225 nm, 230 nm, 245 nm), dung dịch điện ly nền (Tris, Natri dihydrophosphat ở cùng nồng độ 40 mM và pH3), pH dung dịch điện ly nền (1.0-6.0): Dựa vào kết quả từ các điện di đồ thu được, chọn điều kiện di với pic Salbutamol cho pic sắc nhọn, đường nền đẹp, thời gian xuất hiện pic sớm với các điều kiện điện di thích hợp như sau: Cột mao quản: cột silica nung chảy, chiều dài tổng cộng 52,5 cm, chiều dài hiệu quả 44 cm, đường kính trong 50 µm; Bước sóng phát hiện: 225 nm và BGE: Đệm Tris 40 mM pH 3 (*Hình 1)*; dung dịch Tris nền pH 1 (*Hình 2*). Điện thế: 20 kV; Nhiệt độ cột: 25 °C; Tiêm mẫu: 50 mBar - 5 giây; Hoạt hóa mao quản lần đầu: H_2O 3 phút, NaOH 1 N trong vòng 30 phút, NaOH 0,1 N 30 phút, H_2O 30 phút; Rửa mao quản đầu ngày, trước mỗi lần phân tích: NaOH 0,1 N 10 phút, H_2O 10 phút, BGE 10 phút; Rửa mao quản cuối ngày: H_2O 5 phút, NaOH 0,1 N trong vòng 5 phút, H_2O 10 phút.



a) bước sóng 225 nm b) dung dịch điện ly Tris 40 mM pH3

Hình 1. Điện di đồ Salbutamol với bước sóng 225 nm, và dung dịch điện ly Tris 40 mM pH3



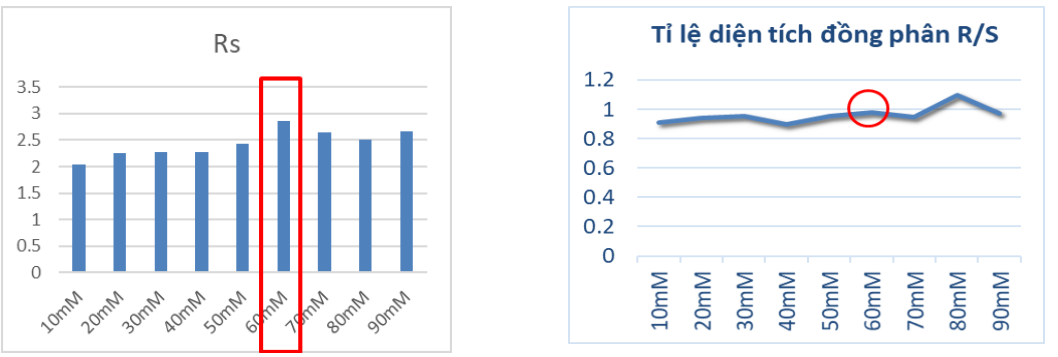
Hình 2. Điện di đồ Salbutamol với hệ đệm Tris 40 mM ở pH 1.0-6.0

Khảo sát các điều kiên điện di của Salbutamol dạng racemic khi thêm các tác nhân đối quang:

Khảo sát nồng độ dung dịch điện ly nền:

Tiến hành điện di với dung dịch điện ly Tris pH 1,0 ở các nồng độ khác nhau với các điều kiện: Điện thế 20 kV, nhiệt độ cột 25 °C, áp suất tiêm mẫu 50 mbar, thời gian tiêm mẫu 5s và thêm tác nhân đối quang M-β-CD 200 mg/mL. Kết quả thu được thể hiện ở *Hình 3*:

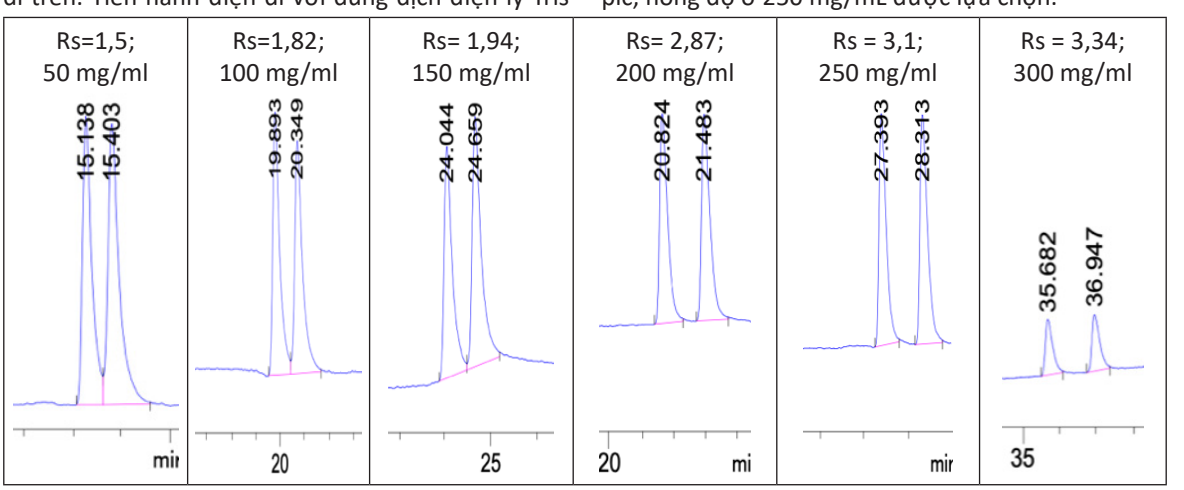
Từ 9 sắc ký đồ tương ứng với 9 nồng độ của dung dịch điện ly Tris pH 1,0 cho thấy độ phân giải Rs tách giữa hai đồng phân *R*- và *S*- của Salbutamol đạt giá trị lớn nhất tại nồng độ đệm Tris pH 1 khi thêm M-β-CD 200 mg/mL là 60 mM. Tỉ lệ diện tích đồng phân R/S gần bằng 1 nhất là ở nồng độ đệm Tris 60 mM. Vì vậy, dung dịch đệm Tris 60 mM được lựa chọn để tiếp tục khảo sát.



Hình 3. Đồ thị thể hiện mối tương quan giữa nồng độ Tris và độ phân giải và tỉ lệ đồng phân R/S

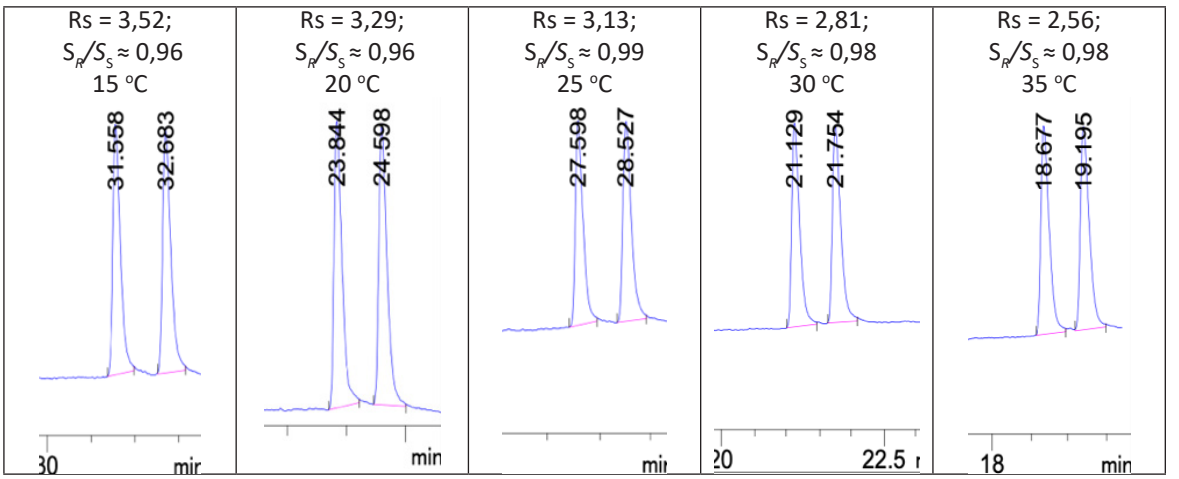
Khảo sát các tác nhân đối quang: Tiến hành điện di để khảo sát các tác nhân đối quang bao gồm b-CD, M-β-CD, HP-β-CD, hỗn hợp HP-β-CD và M-β-CD. Tuy nhiên b-CD, HP-β-CD; hỗn hợp HP-β-CD và M-β-CD hầu như không tách được 02 đồng phân đối ảnh ra khỏi nhau. Vì vậy ở đây chỉ báo cáo khảo sát các tác nhân đối quang M-β-CD.

+ Với M-β-CD: Giữ cố định các thông số máy điện di trên. Tiến hành điện di với dung dịch điện ly Tris 60 mM ở pH 1,0. Khảo sát tác nhân đối quang M-β-CD ở các nồng độ 50-250 mg/mL. Kết quả thu được thể hiện ở *hình 4* cho thấy*:* Tại các nồng độ 200 mg/mL, 250 mg/mL và 300 mg/mL của M-β-CD**,** pic của 2 đồng phân *R*- và *S*- đẹp, tách ra nhau hoàn toàn cùng hệ số Rs cao. Tuy nhiên, từ nồng độ 300 mg/mL, diện tích pic bị giảm đi còn một nửa cùng với thời gian lưu dài hơn nhiều. So sánh về hệ số Rs lẫn diện tích của pic, nồng độ ở 250 mg/mL được lựa chọn.



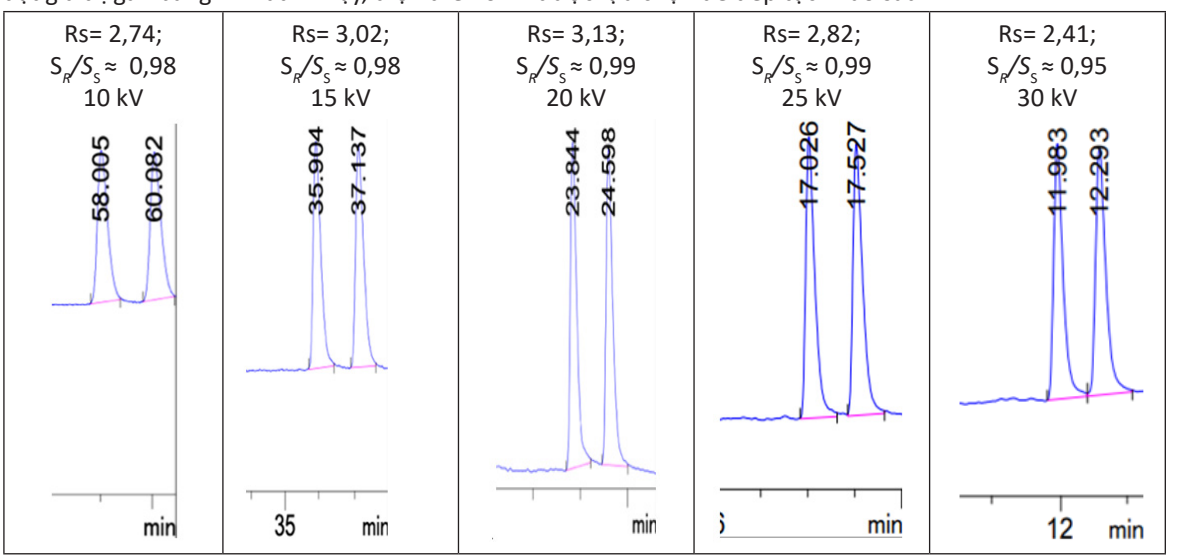
Hình 4. Điện di đồ Salbutamol khi thêm M-β-CD: 50 - 300 mg/mL

Khảo sát nhiệt độ cột: tiến hành điện di với các điều kiện: Điện thế 20 kV; Áp suất tiêm mẫu 50 mbar; Thời gian tiêm mẫu 5s; Dung dịch điện ly Tris 60 mM pH 1,0; Tác nhân đối quang M-β-CD 250 mg/mL. Khảo sát nhiệt độ cột từ 15 – 35°C, kết quả trên *Hình 5* cho thấy độ phân giải ở các nhiệt độ đều cao, giá trị Rs lớn nhất khi nhiệt độ là 15°C nhưng kéo theo thời gian lưu cũng là dài nhất. Xét về tỉ lệ diện tích giữa đồng phân *R* và *S* thì ở nhiệt độ 25°C đạt giá trị gần bằng 1 nhất. Vì vậy, nhiệt độ 25°C được lựa chọn để tiếp tục khảo sát.



Hình 5. Điện di đồ Salbutamol ở nhiệt độ 15-35 °C

Khảo sát điện thế: Với các điều kiện: Nhiệt độ cột 25°C; Áp suất tiêm mẫu 50 mbar; Thời gian tiêm mẫu 5s; Dung dịch điện ly Tris 60 mM pH 1,0; Tác nhân đối quang M-β-CD 250 mg/mL. Khảo sát các điện thế từ 10 kV-30 kV. Kết quả thu được thể hiện ở *Hình 6* cho thấy độ phân giải ở các nhiệt độ đều cao, giá trị Rs lớn nhất khi điện thế là 20 kV, ngoài ra, xét về tỉ lệ diện tích giữa đồng phân *R*- và *S*- thì ở điện thế 20 kV và 25 kV đạt giá trị gần bằng 1 nhất. Vì vậy, điện thế 20 kV được lựa chọn để tiếp tục khảo sát.

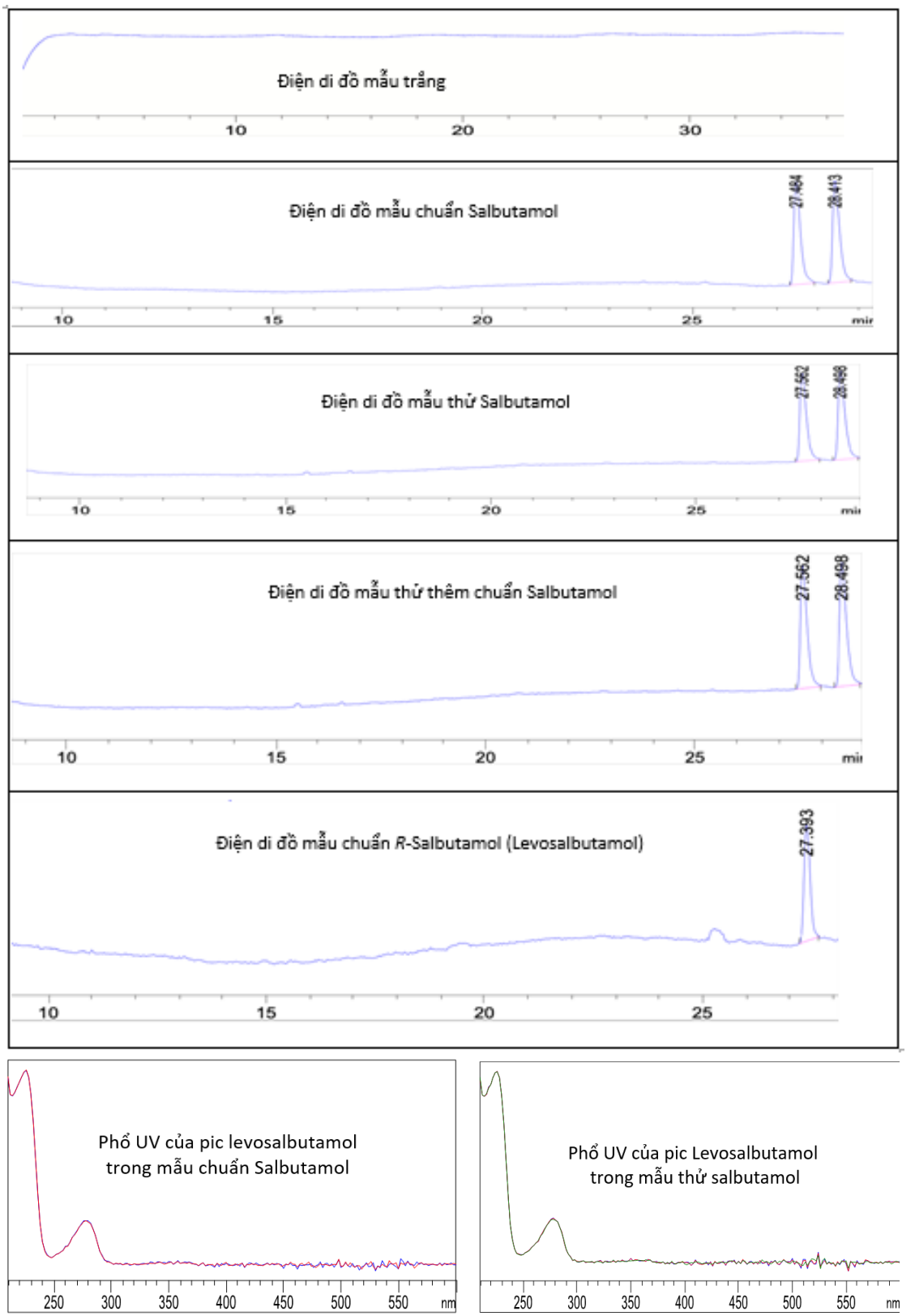


Hình 6: Điện di đồ Salbutamol ở điện thế 10-30 kV

3.2. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn ICH và AOAC

Độ đặc hiệu:

Tiến hành điện di các mẫu: mẫu trắng, mẫu chuẩn salbutamol, mẫu thử salbutamol, mẫu thử thêm chuẩn salbutamol, mẫu chuẩn *R*-sabutamol (Levosalbutamol). Kết quả thu được thể hiện ở *Hình 7* cho thấy: dung dịch thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương so với thời gian lưu của pic salbutamol trong mẫu chuẩn. Mẫu trắng không có pic nào trùng với các pic của mẫu chuẩn và mẫu thử. Khi thêm chất chuẩn vào mẫu thử, chiều cao và diện tích pic của hoạt chất tăng lên. Độ phân giải của hai pic đồng phân trong mẫu racemic đều lớn hơn 1,5. Phổ UV tại thời gian lưu của 2 pic đồng phân trong mẫu thử và chuẩn giống nhau. Pic của Levosalbutamol (Đồng phân *R*) xuất hiện trước. Vì vậy quy trình phân tích đồng phân quang học Salbutamol bằng phương pháp điện di mao quản đạt độ đặc hiệu.



Hình 7. Điện di đồ và phổ UV của mẫu trắng, mẫu chuẩn salbutamol, mẫu thử salbutamol, mẫu thử thêm chuẩn salbutamol, mẫu chuẩn *R*-sabutamol (Levosalbutamol)

Tính phù hợp hệ thống: Tiêm lặp lại 06 lần đối với mẫu thử, thu được các điện di đồ. Mặc dù thông thường theo quy định, độ lệch chuẩn tương đối RSD của thời gian di chuyển t_R và diện tích S của mẫu không lớn hơn 2%. Tuy nhiên, số lần tiêm lặp lại đối với mẫu thử không được thực hiện trong cùng một thời điểm, nên chúng tôi xem xét độ chính xác trung gian của RSD nhỏ hơn 3 %. Độ phân giải của hai pic đồng phân trong mẫu racemic đều lớn hơn 1,5. Kết quả ở bảng 3 cho thấy quy trình phân tích đồng phân quang học Salbutamol bằng phương pháp điện di mao quản đạt tính phù hợp hệ thống.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu đối chiếu Salbutamol

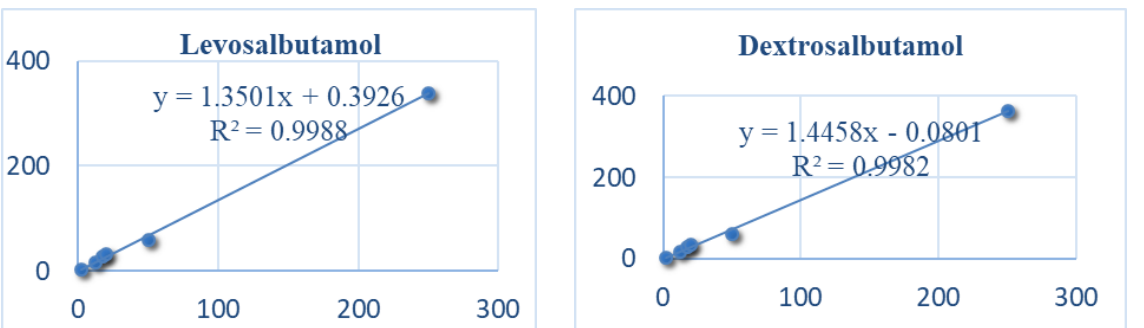
	Levosalbutamol		Dextrosalbutamol		R_s
Mẫu chuẩn	T_M (phút)	Area (mAU*s)	T_M (phút)	Area (mAU*s)	
MC 1	23,82	60,06333	24,574	61,18882	2,95
MC 2	23,826	57,1209	24,579	58,45535	2,98
MC 3	23,839	57,654	24,591	59,63818	2,96
MC 4	23,776	57,95589	24,523	59,69543	2,97
MC 5	23,721	58,51567	24,467	59,00484	2,97
MC 6	23,797	59,83517	24,548	60,98637	2,96
TB	23,7965	58,52416	24,547	59,828165	
SD	0,04324234	1,19474779	0,04618658	1,07787001	
RSD	0,18171723	2,04146081	0,18815569	1,80160968	

Độ tuyến tính:

Tiến hành điện di các mẫu chuẩn salbutamol có nồng độ 5 µg/ml, 25 µg/ml, 35 µg/ml , 40 µg/ml, 100 µg/ml, 500 µg/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của salbutamol. Kết quả được xử lý bằng phần mềm MS-Excel và các trắc nghiệm thống kê (Fisher và Student), kết quả được thể hiện trong *bảng 4 và hình 8*

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của Levosalbutamol và Dextrosalbutamol

Nồng độ (µg/mL)	2,5	12,5	17,5	20	50	250
Diện tích *R*- (mAU*s)	4,2123	15,8349	27,0501	32,1987	60,0068	338,9774
Diện tích *S*- (mAU*s)	4,1924	17,3493	28,7095	34,8243	61,2184	362,872



Hình 8. Đường biểu diễn tương quan giữa diện tích của đồng phân Levosalbutamol, Dextrosalbutamol với nồng độ

- Đối với Lavosalbutamol: Có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ với diện tích pic Lavosalbutamol trong khoảng nồng độ khảo sát 5-500 µg/mL với R^2 = 0,9988. Sử dụng trắc nghiệm t - test và trắc nghiệm F – test; với F được xác định: F = 3363,222356 > $F_{0,05}$ = 7,708647422 chứng tỏ phương trình hồi quy của đồng phân Levosalbutamol có tính tương thích. Ngoài ra, trắc nghiệm t xác định: t_a = 57,99329578 > $t_{0,05}$ = 2,570581836; t_b= 0,160928793 < $t_{0,05}$ = 2,570581836 chứng tỏ hệ số a có ý nghĩa và hệ số b không có ý nghĩa. Từ đó đã xác định được phương trình biểu diễn tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Lavosalbutamol trong salbutamol là ŷ = 1,3501x.

- Đối với Dextrosalbutamol: Có sự tương

quan tuyến tính giữa nồng độ với diện tích pic Dextrosalbutamol trong khoảng nồng độ khảo sát 5-500 µg/mL với R^2 = 0,9982. Sử dụng trắc nghiệm t - test và trắc nghiệm F – test; với F được xác định: F = 2196,045894 > $F_{0,05}$ = 7,708647422 chứng tỏ phương trình hồi quy của đồng phân Levosalbutamol có tính tương thích. Ngoài ra trắc nghiệm t xác định: t_a = 46,86198773 > $t_{0,05}$ = 2,570581836 và t_b = -0,024775634 < $t_{0,05}$ = 2,570581836. Chứng tỏ hệ số a có ý nghĩa và hệ số b không có ý nghĩa. Từ đó đã xác định được phương trình biểu diễn tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Dextrosalbutamol trong salbutamol là ŷ = 1,4458x.

Độ chính xác: Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình phân tích đồng phân Salbutamol bằng phương pháp điện di mao quản được trình bày trong *bảng 5.* Kết quả cho thấy tỷ lệ phục hồi thực nghiệm nằm trong giới hạn cho phép 95-105 %. Vì vậy phương pháp phân tích đồng phân Salbutamol bằng phương pháp điện di mao quản đạt độ đúng.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình phân tích Salbutamol.

Tên đồng phân đối ảnh	Tỷ lệ chất chuẩn thêm vào (%)	S mẫu thử (mAU*s)	Lượng chất chuẩn Salbutamol thêm vào (µg/mL)	S tổng (mAU*s)	HL phục hồi (µg/mL)	Tỉ lệ phục hồi (%)
LEVO-	80	60,9006	40,5138	115,8272	40,6821	100,4155
		60,9006	40,415	113,9857	39,3182	97,28613
		60,9006	39,9209	114,3679	39,6013	99,19934
	100	60,9006	50,4941	129,0275	50,4591	99,93069
		60,9006	50,9881	130,2067	51,3325	100,6754
		60,9006	50,5929	129,046	50,4728	99,76262
	120	60,9006	60,5237	142,4308	60,3864	99,7732
		60,9006	60,2767	140,1892	58,7262	97,42763
		60,9006	60,7708	142,8206	60,6751	99,8426
DEXTRO	80	61,0602	40,5138	119,6676	40,5361	100,0552
		61,0602	40,415	118,2501	39,5557	97,87386
		61,0602	39,9209	117,0694	38,7391	97,03961
	100	61,0602	50,4941	132,9538	49,7256	98,47808
		61,0602	50,9881	134,9704	51,1204	100,2595
		61,0602	50,5929	134,2907	50,6503	100,1134
	120	61,0602	60,5237	148,8942	60,7509	100,3754
		61,0602	60,2767	148,1502	60,2363	99,93297
		61,0602	60,7708	150,8711	62,1182	102,2172

Độ lặp lại: Kết quả khảo sát độ chính xác của quy trình phân tách đồng phân Salbutamol bằng phương pháp điện di mao quản được trình bày trong *bảng 6*. Kết quả này cho thấy RSD của thời gian dịch chuyển ≤3%; RSD của diện tích pic ≤ 3%, ngài ra Rs của 2 mẫu dồng trong trong salbutamol đều >1,5. Vì vậy quy trình phân tích đồng phân quang học Salbutammol bằng phương pháp điện di mao quản đạt độ lặp lại.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp trên mẫu thử Salbutamol.

	T_M (phút)		Area (mAU*s)		R_S
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	
Mẫu thử 1	23,844	24,598	48,73451	49,18727	3,13
Mẫu thử 2	23,88	24,634	48,7116	49,39339	3,06
Mẫu thử 3	23,904	24,658	47,7429	49,27398	3,06
Mẫu thử 4	23,872	24,625	47,57512	47,65097	3,07

Mẫu thử 5	23,82	24,57	45,90154	47,77756	3,11
Mẫu thử 6	23,738	24,485	47,98669	49,25075	3,06
TB	23,843	24,595	47,7753933	48,75565333	
SD	0,05913713	0,06184497	1,03860729	0,810404354	
RSD	0,24802721	0,25145342	2,17393771	1,662175149	

4. BÀN LUẬN

4.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện điện di

Mẫu Salbutamol dạng racemic trong viên nén trên thị trường chứa hỗn hợp 2 đồng phân đối ảnh gồm *R*-Salbutamol (Levosalbutamol) và *S*-Salbutamol (Dextrosalbutamol). Khi dùng điều kiện điện di bình thường thì hỗn hợp này chỉ tạo thành 01 pic trên điện di đồ. Trong một số công trình trước đây, người ta đã báo cáo rằng có thể tách các đồng phân đối ảnh của salbutamol bằng cách sử dụng đệm acetate 25 mM (pH 5) chứa 13,1 mg/mL CM-b-CD ở nhiệt độ 25°C và điện áp được áp dụng là 20 kV trong mao quản có chiều dài hiệu dụng là 25 cm [8]. Những điều kiện này đã được thử áp dụng trong công trình này, tuy nhiên chúng tôi đã sử dụng máy điện di hiện có và tìm kiếm lại các điều kiện thích hợp để tách được các pic ra khỏi nhau, cũng chính là phân tách các đồng phân đối ảnh của salbutamol ra khỏi nhau.

4.1.1. Khảo sát các điều kiện điện di sau khi chưa thêm tác nhân đối quang:

Bước đầu công trình này đã khảo sát các điều kiện điện di sơ bộ đối với mẫu Salbutamol chưa thêm tác nhân đối quang; bao gồm các điều kiện như khảo sát bước sóng phát hiện, khảo sát dung dịch điện ly và pH để tìm kiếm điều kiện thích hợp cho 1 pic salbutamol sắc đẹp trên điện di đồ. Việc khảo sát này, ngoài việc áp dụng một số điều kiện sau này khi thêm vào các tác nhân đối quang để phân tách được các đồng phân đối ảnh salbutamol, giảm thời gian khảo sát các điều kiện phân tách, còn là để xác định trong mẫu chỉ tồn tại salbutamol.

Khảo sát bước sóng phát hiện: việc lựa chọn bước sóng phát hiện thích hợp là rất quan trọng để đảm bảo kết quả phân tích chính xác và đáng tin cậy. Việc chọn bước sóng phát hiện thích hợp có thể giúp tăng cường sự phân biệt giữa các chất trong mẫu phân tích. Để lựa chọn bước sóng phát hiện thích hợp, phân tích phổ UV – Vis của Salbutamol bằng detector DAD kết hợp tham khảo các tài liệu [9]. Từ đó, đề tài lựa chọn bước sóng 225 nm để làm bước sóng phân tích trong nghiên cứu này.

Khảo sát dung dịch điện ly nền và pH: Điện di mao quản là kỹ thuật tách chất dựa vào khả năng linh động điện di, việc lựa chọn pH và dung dịch đệm ảnh hưởng tới linh động điện di của các cấu tử, đặc biệt là các chất có những tính chất tương tự nhau. Do đó trong quy trình phân tích này, dung dịch đệm và pH của dung dịch đệm là hai yếu tố quan trọng cần được khảo sát. Dung dịch điện ly nền được sử dụng trong phân tích đồng phân đối quang phải có: Khả năng đệm tốt trong khoảng pH được lựa chọn, hạn chế được sự hấp thu ở vùng bước sóng phát hiện sẽ ít gây nhiễu đường nền và ít ảnh hưởng đến độ hấp thu; có linh độ ion thấp để giảm hiệu ứng nhiệt Joule. Qua các kết quả sắc kí đồ, có thể thấy Tris là một dung dịch đệm lý tưởng để áp dụng cho nghiên cứu này. Với yếu tố pH, độ lớn dòng điện thẩm phụ thuộc nhiều nhất vào pH dung dịch; pH cao thì nhóm silanol bị ion hoá hoàn toàn, điện tích trên thành mao quản tăng, thế zeta tăng dẫn đến Dòng điện thẩm (EOF) tăng. Ngoài ra, độ phân giải, độ nhạy và hình dạng pic có thể thay đổi một cách rõ rệt khi có sự thay đổi pH vì thông số này ảnh hưởng đến khả năng ion hoá của chất tan và dòng EOF. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của độ pH được nghiên cứu với các giá trị pH thử nghiệm được kiểm soát ở mức 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 7,0 và 8,0. Kết quả đưa đến kết luận rằng độ linh động điện di biểu kiến tăng từ pH 1,0 đến pH 6,0 với EOF tăng theo độ pH. Dòng EOF tăng kéo theo thời gian lưu giảm, hệ số phân giải giảm. So sánh kết quả khảo sát thu được ở các giá trị cho thấy ở pH = 1,0 tách tốt nhất, pic gọn nhất và tín hiệu đường nền ổn định, thời gian phân tích hợp lý. Sau khảo sát, các điều kiện được chọn thích hợp là bước sóng phát hiện 225 nm, dung dịch điện ly nền Tris pH 1.

4.1.2. Khảo sát các điều kiện điện di sau khi đã thêm tác nhân đối quang:

Sử dụng các điều kiện đã khảo sát trên, tiếp tục khảo sát các yếu tố khác nhằm tách được các đồng phân đối ảnh ra khỏi nhau trên điện di đồ.

Khảo sát nồng độ dung dịch điện ly nền:

Nồng độ dung dịch điện ly nền được khảo sát vì nồng độ này phải đủ lớn để tạo nên môi trường điện ly cho các ion di chuyển và không tạo ra các vùng dẫn điện khác nhau trong mao quản làm ảnh hưởng đến quá trình di chuyển này. Thường sử dụng nồng độ dung dịch đệm lớn hơn nồng độ chất phân tích ít nhất 100 lần, nếu không sẽ tạo ra sự biến dạng điện trường. Trong quá trình khảo sát, khi tăng nồng độ của dụng dịch đệm, pic của chất phân tích ở nồng độ

đệm cao sẽ sắc nhọn hơn so với nồng độ thấp. Khi tăng nồng độ dung dịch đệm sẽ hạn chế sự khuếch tán của chất phân tích nên pic sắc nhọn hơn. Tuy vậy, sử dụng nồng độ đệm cao sẽ làm cột nhanh hỏng hơn. Do đó, kết hợp với xem xét về hệ số phân giải, cũng như tỉ lệ giữa 2 dạng đồng phân thì 60 mM là nồng độ thích hợp để lựa chọn.

Khảo sát tác nhân đối quang:

M-β-CD và HP-β-CD là hai loại cyclodextrin được sử dụng phổ biến trong phương pháp tách đồng phân đối quang bằng điện di mao quản (CE). Số lượng nhóm methyl trên phân tử mỗi *β*-CD có thể làm tăng khả năng tương tác với các phân tử phân tích trong mẫu, từ đó cải thiện khả năng tách. Methyl beta cyclodextrin có một nhóm methyl ($-CH_3$) gắn vào vòng *β*-cyclodextrin, trong khi hydroxypropyl beta cyclodextrin có một hoặc nhiều nhóm hydroxypropyl ($-CH_2-CHOH-CH_3$) gắn vào vòng *β*-cyclodextrin. Sự khác biệt này có thể tạo ra sự khác biệt trong khả năng tạo phức với Salbutamol. Điện di đồ cho thấy M-*β*-CD tương tác với Salbutamol tốt hơn HP-*β*-CD nên khả năng tách hai đồng phân ra khỏi dược chất tốt hơn. Bên cạnh đó, *nồng độ của tác nhân bất đối* cũng là một thông số phải được khảo sát trong quá trình phân tách đồng phân đối quang.

Với sự gia tăng nồng độ M-*β*-CD, sự phân tách dần dần của các chất đồng phân đối ảnh càng ngày càng rõ ràng hơn, hệ số phân giải cũng càng ngày càng tăng. Điều này có thể xuất phát từ hai khía cạnh sau: (1) Nồng độ M-*β*-CD cao hơn sẽ làm giảm độ linh động biểu kiến, dẫn đến thời gian di chuyển lâu hơn và do đó thời gian tương tác của chất phân tích với bộ chọn cũng lâu hơn; (2) Nồng độ M-*β*-CD cao hơn có lợi cho việc tạo phức cyclodextrin với chất phân tích.

Tuy nhiên, khi nồng độ M-*β*-CD tăng từ 300 mg/mL, xu hướng phân giải trở nên không thay đổi, diện tích pic của hai đồng phân giảm, trong khi đó thời gian di chuyển tăng đáng kể. Nồng độ M-*β*-CD là 250 mg/mL cuối cùng đã được lựa chọn khi xem xét đến cả độ phân giải và thời gian lưu.

Khảo sát hỗn hợp nhiệt độ cột:

Ảnh hưởng của nhiệt độ cũng được xem xét trong quá trình tối ưu hóa quá trình phân tách CE. Độ nhớt và độ ổn định của BGE sẽ thay đổi theo sự thay đổi của nhiệt độ, do đó ảnh hưởng đến thời gian lưu và độ phân giải. Độ phân giải giảm khi nhiệt độ tăng cùng với thời gian di chuyển ngắn hơn. Quá trình tách trong điện di mao quản thường được thực hiện ở (hoặc gần) nhiệt độ phòng. Điều nhiệt kém dẫn đến hiệu quả tách thấp hơn và thời gian di chuyển có độ lặp kém.

Xem xét cả thời gian chạy và độ phân giải ở các sắc kí đồ thu được, ta thấy nhiệt độ 25 °C là phù hợp để tách đồng phân đối ảnh của Salbutamol.

Khảo sát điện thế:

Tăng thế (V) áp vào 2 đầu mao quản làm tăng tốc độ dòng EOF, tốc độ di chuyển nhanh, thời gian lưu nhỏ, giảm khả năng tách. Vì khi tăng điện thế thì thời gian rửa giải giảm do làm tăng tốc độ dòng EOF và tốc độ điện di của chất phân tích. Điều này làm cho các chất di chuyển nhanh, dồn vào nhau dẫn đến giảm độ phân giải. Ngược lại, khi giảm điện thế sẽ làm giảm tốc độ di chuyển, dẫn đến hiện tượng doãng và dẹt ở pic. Khi áp thế từ 10 kV đến 30 kV, thời gian di chuyển của các chất giảm. Vì khi tăng thế E, dòng điện I lớn sẽ gây ra hiệu ứng nhiệt Jun lớn làm nóng mao quản, làm giảm hiệu quả tách. Tại điện thế tách 20kV cho hiệu quả tách tốt giữa các pic và thời gian phân tích phù hợp. Vì vậy, lựa chọn thế 20 kV là thế tách tối ưu.

4.2. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn ICH và AOAC

Phương pháp được thẩm định đạt các yêu cầu của ICH và ACAC. Thẩm định quy trình theo ICH và AOAC. Đối với tính phù hợp hệ thống, làm theo quy định ở Dược điển Việt Nam V. Yêu cầu %RSD của thời gian di chuyển và diện tích pic không vượt quá 3% do sử dụng quy trình chạy máy không cùng một thời gian. Xác định tỉ lệ thu hồi theo quy định của AOAC. Tỉ lệ phần trăm thu hồi được xác định đối với quy trình này là: 95 – 102%. Đề tài đã xây dựng được quy trình phân tách đồng phân đối quang của Salbutamol bằng phương pháp điện di mao quản, kết quả cho thấy hệ số phân giải R_S = 3,13; Tỉ lệ diện tích đồng phân *R/S* ≈≈0,99.

So với nghiên cứu của ông Amaia Esquisabel và các cộng sự được thực hiện trên máy điện di mao quản năm 1997 [10], đã dùng tác nhân đối quang heptakis (2,6-di-O-methyl)-β- cyclodextrin, đệm tris nồng độ 40mM và pH= 2.5, điện thế 15 kV. Kết quả phân tách cho độ phân giải 3.09 với thời gian lưu của đồng phân (*R*)-Salbutamol là 13.74 phút, đồng phân (*S*)-salbutamol là 13.98 phút, khoảng tuyến tính 1 – 40 μg/mL, đề tài có hệ số phân giải cao hơn. Tuy nhiên, thời gian lại kéo dài hơn nhưng vẫn đáp ứng được các yêu cầu về tách đồng phân đối quang.

Với nghiên cứu của TS. Manus M.Rogan và các cộng sự thực hiên năm 1994 [11], đã dùng tác nhân đối quang Dimethyl-β-cyclodextrin nồng độ 112mM, đệm citric/phosphate pH 2,5,thêm methanol và iso-propyl alcohol 20%, thì đề tài sử dụng dung dịch đệm đơn giản và nồng độ thấp hơn.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp phân tách các đồng phân đối ảnh salbutamol trong viên nén bằng điện di mao quản với các điều kiện điện di: Cột mao quản silica nung chảy, chiều dài tổng cộng 52,5 cm, chiều dài hiệu quả 44 cm, ID 50µ*m,* điện thế 20 kV; nhiệt độ cột 25°C; bước sóng phát hiện 225 nm; áp suất tiêm mẫu 50 mbar; thời gian tiêm mẫu 5s, dung dịch điện ly nền: Tris 60 mM pH1; Tác nhân đối quang M-β-CD 250mg/ml. Với điều kiện điện di này, kết quả thu được pic của 2 đồng phân *R*-Salbutamol và *S*-Salbutamol sắc nhọn, hệ số phân giải cao R_S =3,13; Tỉ lệ diện tích đồng phân R/S = 0,99; Thời gian lưu của hai đồng phân *R và S* lần lượt là 23,880 phút và 24,634 phút. Phương pháp được thẩm định theo yêu hướng dẫn ICH và AOAC, có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính phù hợp, độ chọn lọc cao, giới hạn phát hiện tốt.

Lời cảm ơn: Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Trường Đại học Y – Dược, Đại học Huế cho đề tài mã số 26/24 để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rentsch KM. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. J Biochem Biophys Methods. 2002 Dec 31; 54(1-3): 1-9.

2. Sulaiman K, Mari-Luiza K, Gerhard KES. Advances of capillary electrophoresis enantioseperations in pharmaceutical analysis (2017-2020). Electrophoresis. 2021Sep; 42(17-18), 1709-1725.

3. Niall S. Salbutamol: hero or villain?. Paediatrics and Child Health. 2023 April; 33(4), 97-103.

4. Dược điển Việt Nam V: abacavir-sulfat, acebutolol-hydroclorid, vien-nen-acenocoumarol.

5. Fanali S. Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis, Bezhan Chankretadze, John Wiley & Sons, Chichester, UK. 1997, ISBN 0-471-974 15-3, 1998: 572.

6. ICH Secretariat. Validation of Analytical Procedures: Text and methodology. International conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005, pp. 1 - 17.

7. Association of official analytical chemists (AOAC). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.

8. Ela E, Carmen G, García A, Maria LM. Rapid determination of salbutamol in pharmaceutical preparations by chiral capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2003 Aug; 24(15), 2680-2686.

9. Yan K, Zhang H, Hui W, Zhu H, Li X, Zhong F, Tong X, Chen C. Rapid screening of toxic salbutamol, ractopamine, and clenbuterol in pork sample by high-performance liquid chromatography-UV method. Journal of Food Drug Analysis. 2016 April; 24(2): 277-283.

10. Esquisabel AHR, Gascon AR, Igartua M, Calvo B, Pedraz JL. Determination of salbutamol enantiomers by high-performance capillary electrophoresis and its application to dissolution assays. Journal Pharm Biomed Analysis. 1997 Oct; 16(2): 357-366.

11. Rogan MM, Altria KD, Goodall DM. Enantiomeric separation of salbutamol and related impurties using capillary electrophoresis. Electrophoresis. 1994 Jun; 15(6): 808-817.