

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF CARBOCISTEIN AND SALBUTAMOL IN HARD CAPSULE BY HPLC METHOD

NGUYEN THI HONG HANH¹, DAO ANH HOANG², NGUYEN LAM HONG³, ✉

¹National Institute of Drug Quality Control

²National Institute of Medicinal Materials

³Hanoi University of Pharmacy

✉ Corresponding author: hongnl@hup.edu.vn

Received September 24th, 2025; Accepted January 10th, 2026

Abstract: Several pharmaceutical products combining salbutamol and carbocisteine are currently available on the market; however, current pharmacopoeias such as USP 2025 and BP 2025 have not yet included any monograph for this finished combination product. Moreover, the content of carbocisteine is 250-fold higher than that of salbutamol, which poses a significant challenge for the development of a simultaneous assay method. To enhance drug quality control, this study focused on the development and validation of a simple and robust HPLC method for simultaneous determination of salbutamol sulfate and carbocisteine in capsule formulations. Chromatographic separation was achieved using a C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm), with detection at 225 nm, a flow rate of 1.2 mL/min, an injection volume of 50 μL, and a mobile phase consisting of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and acetonitrile with a gradient elution program. The method was fully validated for specificity; linearity with a range of 300 – 700 μg/mL for carbocisteine and 1.2 – 2.8 μg/mL for salbutamol, with correlation coefficients $R = 1.000$ and intercept percentages less than 1.0%; precision with RSD (%) of 0.5% for carbocisteine and 1.1% for salbutamol; and recovery at three concentration levels for both carbocisteine and salbutamol within the range of 98% – 102%.

Keywords: Carbocisteine, salbutamol, simultaneous quantification, HPLC

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CARBOCISTEIN VÀ SALBUTAMOL TRONG VIÊN NANG CỨNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH¹, ĐÀO ANH HOÀNG², NGUYỄN LÂM HỒNG³, ✉

¹Khoa Kiểm nghiệm Các dạng bào chế, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

²Viện dược liệu

³Khoa Hóa phân tích và Kiểm nghiệm thuốc, Trường Đại học Dược Hà Nội

✉ Tác giả liên hệ: hongnl@hup.edu.vn

Nhận bài ngày 24 tháng 9 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 1 năm 2026

Tóm tắt: Trên thị trường có các sản phẩm kết hợp salbutamol và carbocistein, tuy nhiên các dược điển hiện hành USP 2025, BP 2025... đều chưa có bất kỳ chuyên luận thành phẩm phối hợp. Trong khi đó lượng carbocistein gấp 250 lần salbutamol gây khó khăn khi phát triển phương pháp định lượng đồng thời. Nhằm mục đích nâng cao khả năng kiểm tra chất lượng thuốc, bước đầu nghiên cứu phát triển và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời salbutamol sulfate và carbocistein trong viên nang bằng phương pháp HPLC để sử dụng với điều kiện sắc ký gồm: Cột C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm); bước sóng 225 nm; tốc độ dòng 1,2 mL/phút; thể tích tiêm 50 μL; pha động là acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) – acetonitril với chương trình dung môi. Phương pháp được thẩm định đầy đủ: độ đặc hiệu; khoảng tuyến tính của carbocistein từ 300 μg/mL đến 700 μg/mL, salbutamol từ 1,2 μg/mL đến 2,8 μg/mL với hệ số tương quan $R = 1,000$ và % hệ số chặn đều nhỏ hơn 1,0%; độ chụm của carbocistein RSD(%) = 0,5% và salbutamol RSD(%) = 1,1%; độ thu hồi ở 3 mức nồng độ của carbocistein và salbutamol đều nằm trong khoảng 98% – 102%.

Từ khóa: Carbocistein, salbutamol, định lượng đồng thời, HPLC

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trên thị trường có các sản phẩm kết hợp giữa salbutamol sulfat và carbocistein nhằm điều trị các chứng ho đờm đi kèm trong các bệnh đường hô hấp tắc nghẽn cấp và mạn tính như bệnh viêm phế quản cấp và mạn tính, hen phế quản và để giảm thiểu số lần uống thuốc trên bệnh nhân. Tuy nhiên, trong các Dược điển hiện hành BP 2025, JP 18, ĐĐVN V, USP 2025, IP 2022 và CP 2020 chưa có bất kỳ chuyên luận thành phẩm nào phối hợp giữa carbocistein và salbutamol sulfat. Ngoài ra, các chế phẩm thuốc viên đăng ký tại Việt Nam có lượng salbutamol rất thấp chỉ 2 mg, trong khi lượng carbocistein gấp 250 lần so với salbutamol gây khó khăn khi xây dựng phương pháp định lượng đồng thời. Vì vậy, để phục vụ nhu cầu kiểm tra chất lượng và góp phần xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, nghiên cứu này tiến hành xây dựng phương pháp định lượng đồng thời carbocistein và salbutamol trong viên nang cứng X bằng HPLC/DAD.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu viên nang cứng X có công thức bào chế như sau: carbocistein 500 mg; salbutamol sulfat tương đương salbutamol 2 mg; lactose 50 mg; magie stearat 5 mg; aerosil 1 mg do công ty M cung cấp.

Mẫu placebo: mẫu giả dược, được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không chứa carbocistein và salbutamol sulfat.

Mẫu placebo salbutamol: hỗn hợp các tá dược và chuẩn carbocistein.

Mẫu placebo carbocistein: hỗn hợp các tá dược và chuẩn salbutamol.

2.2. Nguyên vật liệu, thiết bị nghiên cứu

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ phân tích

Tất cả các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP bao gồm: Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC 20A với detector diode array; Cân phân tích Mettler Toledo AG245 độ chính xác 0,01 mg và các thiết bị khác như: Máy lắc siêu âm; Bộ lọc dùng cho sắc ký;

Các dụng cụ thủy tinh: Bình định mức, pipet chính xác ... đạt tiêu chuẩn loại A.

Cột phân tích: Inertsil C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m).

2.2.2. Hóa chất, dung môi

Acid trifluoroacetic và acid hydrochloric (Scharlau, loại ACS); acetonitril (Merck, loại HPLC); nước cất dùng cho HPLC (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

2.2.3. Chất chuẩn

Chất chuẩn carbocistein do Viện Kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh cung cấp, số lô: QT33302121 và hàm lượng: 99,7% $C_5H_9NO_4S$ (nguyên trạng);

Chất chuẩn salbutamol sulfat do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp, lô: 010119; ẩm: 0,11% và hàm lượng: 99,62% $C_{26}H_{44}N_2O_{10}S$ (khan).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Dung môi pha mẫu: dung dịch acid hydrochloric 0,1 N.

Dung dịch chuẩn salbutamol gốc: Cân chính xác khoảng 48 mg chuẩn salbutamol sulfat (tương đương 40 mg salbutamol) trong bình định mức 100 mL, hòa tan và vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, trộn đều.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc: Cân chính xác khoảng 100 mg chuẩn carbocistein vào bình định mức 50 mL, thêm 1,0 mL dung dịch chuẩn salbutamol gốc, hòa tan và vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, trộn đều.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Hút chính xác 5 mL dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc vào bình định mức 20 mL, định mức vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, lắc đều.

Dung dịch thử: Cân 20 viên chế phẩm, xác định khối lượng trung bình viên, nghiền mịn. Cân một lượng bột thuốc tương ứng với 250 mg carbocistein vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 70 mL dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút, vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, trộn đều, lọc. Hút chính xác 10,0 mL dịch lọc này, pha loãng thành 50 mL bằng dung môi pha mẫu, trộn đều.

Dung dịch placebo: Cân chính xác khoảng 28 mg mẫu placebo vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 10 mL dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút và vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, trộn đều, lọc. Hút chính xác 10,0 mL dịch lọc này, pha loãng thành 50 mL bằng dung môi pha mẫu, trộn đều.

Dung dịch placebo carbocistein (PLC carbocistein): Cân chính xác khoảng 29 mg mẫu placebo carbocistein vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 10 mL dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút và vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, trộn đều, lọc. Hút chính xác 10,0 mL dịch lọc này, pha loãng thành 50 mL bằng dung môi pha mẫu, trộn đều.

Dung dịch placebo salbutamol (PLC salbutamol): Cân chính xác khoảng 278 mg mẫu placebo salbutamol vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 10 mL dung môi pha mẫu, siêu âm 10 phút và vừa đủ bằng dung môi pha mẫu, trộn đều, lọc. Hút chính xác 10,0 mL dịch lọc này, pha loãng thành 50 mL bằng dung môi pha mẫu, trộn đều.

2.3.2. Phương pháp phân tích

Các dược điển hiện hành USP, BP, ĐĐVN, JP... chưa có chuyên luận chế phẩm phối hợp giữa carbocistein và salbutamol. Tham khảo chuyên luận viên nén carbocistein trong JP 18 các điều kiện sắc ký với cột sắc ký C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m); pha động là dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v); thể tích tiêm mẫu 50 μ L.

2.3.3. Thẩm định phương pháp phân tích

Tiến hành thẩm định phương pháp theo các hướng dẫn của ICH và thông tư 08/2022/TT-BYT của Bộ Y tế với các chỉ tiêu: độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, độ ổn định của phương pháp [7, 8].

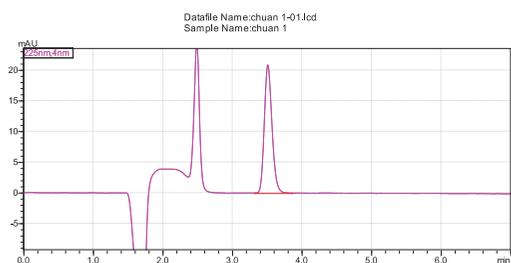
3. KẾT QUẢ

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

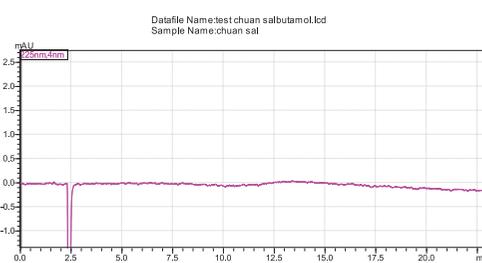
3.1.1. Lựa chọn pha động

Tham khảo tài liệu [1], pha động là dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) với tốc độ dòng 1,0 mL/phút chỉ phân tích được carbocistein (thời gian lưu khoảng 3,5 phút), salbutamol khó rửa giải và phát hiện ra bởi hệ pha động này (hình 1). Khi thêm 10% acetonitril

vào dung dịch đệm có thể rửa giải ra salbutamol (thời gian lưu khoảng 5,2 phút) nhưng pic carbocistein được rửa giải trùng các pic không lưu giữ (hình 2). Vì vậy, chương trình gradient được điều chỉnh, giai đoạn rửa giải carbocistein: pha động là 100% dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v), sau khi pic carbocistein đã rửa giải hoàn toàn, thêm 10% acetonitril vào pha động để rửa giải salbutamol thì thấy chương trình pha động: acetonitril - dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) (10 – 90) đã tách được hoàn toàn 2 chất với thời gian lưu phù hợp. Từ kết quả thu được lựa chọn pha động A: dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) và pha động B: acetonitril - dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) (10 – 90) với chương trình sắc ký ở bảng 1 và thu được sắc ký đồ hình 3.

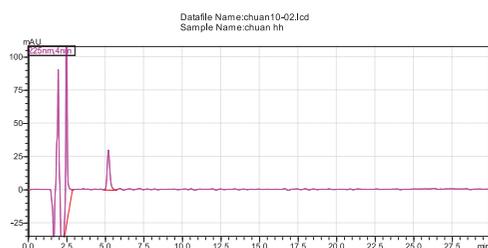


(a)

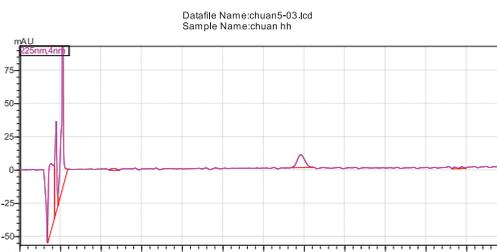


(b)

Hình 1. Sắc ký đồ chuẩn carbocistein (a) và chuẩn salbutamol (b)



(a) acid trifluoroacetic 0,1% – ACN (90 – 10)



(b) acid trifluoroacetic 0,1% – ACN (95 – 5)

Hình 2. Sắc ký đồ chuẩn hỗn hợp carbocistein và salbutamol khi thêm acetonitril

Bảng 1. Chương trình pha động tách carbocistein và salbutamol

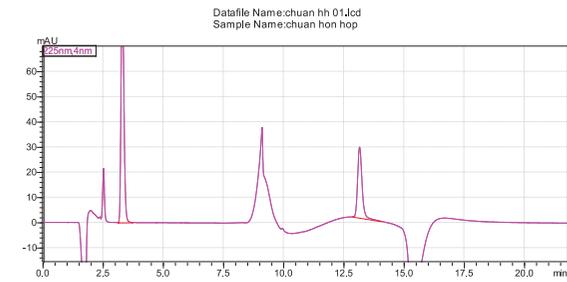
Chương trình pha động 1

Thời gian (phút)	Pha động A	Pha động B
0	100	0
5,0	100	0
6,0	0	100
12,0	0	100
12,1	100	0
20,0	100	0

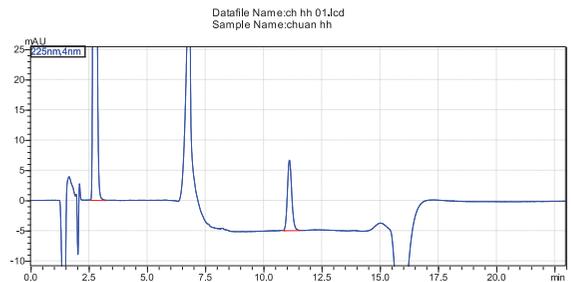
Chương trình pha động 2

Thời gian (phút)	Pha động A	Pha động B
0	100	0
3,5	100	0
4,0	20	80
13,0	20	80
13,1	100	0
20,0	100	0

Kết quả thu được như hình 3:



(a) Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp theo chương trình pha động 1



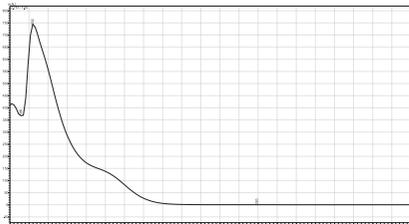
(b) Sắc ký đồ dung dịch chuẩn hỗn hợp theo chương trình pha động 2

Hình 3. Sắc ký đồ khảo sát các hệ pha động.

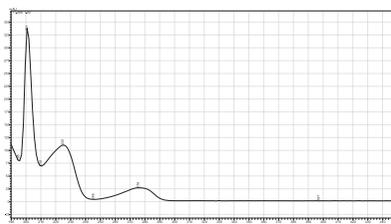
Từ kết quả thu được cho thấy, cả 2 hệ đều rửa giải được 2 pic carbocistein và salbutamol riêng biệt. Tuy nhiên, đường nền xung quanh pic salbutamol (thời gian lưu ~ 13 phút) trong hệ chương trình pha động 1 chưa thẳng và chưa ổn định, trong khi đường nền xung quanh pic salbutamol của chương trình pha động 2 thẳng, ổn định. Do đó, lựa chọn chương trình pha động 2 làm pha động của phương pháp phân tích.

3.1.2. Lựa chọn bước sóng phát hiện

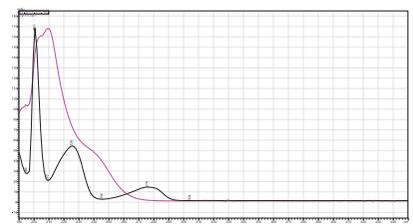
Thực hiện quét phổ UV trên các pic của hai hoạt chất carbocistein và salbutamol của các dung dịch chuẩn đơn và chồng các phổ UV trên các pic của dung dịch chuẩn hỗn hợp cho kết quả như sau:



(a)



(b)



(c)

Hình 4. Hình ảnh phổ UV của pic carbocistein (a), pic salbutamol (b) và chồng phổ (c)

Hàm lượng carbocistein trong viên nang X gấp 250 lần so với salbutamol, nồng độ salbutamol trong dung dịch thử rất thấp (2 µg/mL), do đó lựa chọn bước sóng cực đại của salbutamol làm bước sóng phân tích. Phổ UV từ bước sóng 210 – 450 nm của salbutamol cho 2 cực đại tại 225 nm và 276 nm. Tại cực đại 276 nm hoạt chất carbocistein gần như không hấp thụ, trong khi tại bước sóng 225 nm carbocistein có hấp thụ phù hợp. Do đó lựa chọn bước

sóng 225 nm làm bước sóng phân tích định lượng đồng thời 2 hoạt chất.

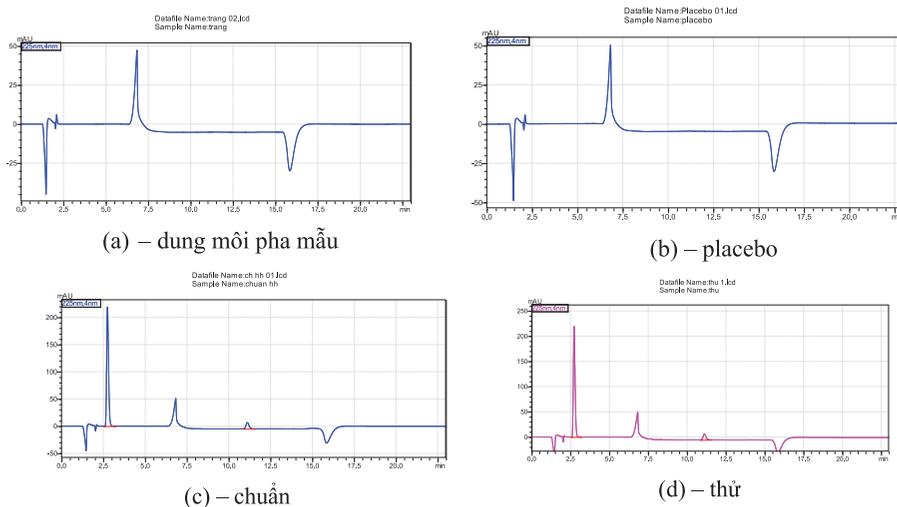
3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký lần lượt các dung dịch placebo, dung dịch thử, dung dịch chuẩn hỗn hợp, ghi lại sắc ký đồ, kết quả thể hiện ở bảng 2:

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu dung dịch placebo, chuẩn, thử

RT (phút)	Placebo	PLC salbutamol	PLC carbocistein	Thử	Chuẩn
Carbocistein	-	2,732	-	2,727	2,739
Salbutamol	-	-	11,069	11,122	11,104



Hình 5. Thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp

Từ kết quả thu được trong bảng 2, dung môi pha mẫu và dung dịch placebo không xuất hiện pic nào ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp. Mẫu placebo salbutamol chỉ cho pic tương ứng với carbocistein mà không cho pic tương ứng với pic salbutamol. Mẫu placebo carbocistein chỉ cho pic tương ứng với salbutamol mà không cho pic tương ứng với carbocistein.

Sắc ký đồ của dung dịch thử cho 2 pic có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với thời gian lưu và phổ UV của pic carbocistein và salbutamol thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp. Độ tinh khiết pic carbocistein và salbutamol trên dung dịch chuẩn và dung dịch thử đều khoảng 0,999.

3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp, ghi lại các sắc ký đồ, xác định giá trị thời gian lưu và diện tích pic của các pic carbocistein và salbutamol. Kết quả thể hiện ở Bảng 3 và Bảng 4.

Bảng 3. Kết quả tính thích hợp của hệ thống của carbocistein

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu\text{Au.s}$)	Hệ số kéo đuôi	Số đĩa lý thuyết
1	2,744	1728797	1,271	2727
2	2,739	1728357	1,271	2715
3	2,739	1730104	1,269	2717
4	2,737	1726872	1,268	2722
5	2,736	1727405	1,265	2726
6	2,737	1728043	1,264	2719
TB	2,739	1728263	1,268	2721
RSD% (n = 6)	0,1	0,1		

Bảng 4. Kết quả tính thích hợp hệ thống của salbutamol

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu\text{Au.s}$)	Hệ số kéo đuôi	Số đĩa lý thuyết
1	11,115	148897	1,153	17239
2	11,096	148742	1,144	17282
3	11,099	148345	1,144	17317
4	11,100	148851	1,144	17184
5	11,106	148531	1,142	17320
6	11,105	149092	1,142	17227
TB	11,104	148743	1,145	17262
RSD% (n = 6)	0,1	0,2	0,4	0,3

Hệ thống sắc ký và điều kiện phân tích HPLC có độ lặp lại cao, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu 0,1% ($\leq 1,0\%$) và RSD của diện tích pic từ 0,1% đến 0,2% đều nhỏ hơn 2,0%. Số đĩa lý thuyết cả hai hoạt chất đều lớn hơn 2000 và hệ số kéo đuôi đều nằm trong khoảng từ 0,8 đến 1,5. Như vậy, phương pháp HPLC trên là phù hợp với việc phân tích định tính, định lượng carbocistein và salbutamol.

3.2.3. Khoảng tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc carbocistein (2,0 mg/mL) và salbutamol (0,008 mg/mL), pha loãng bằng dung môi pha mẫu để thu được 05 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ các hoạt chất chính xác trong khoảng 60%, 80%, 100%, 120%, 140% so với nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn cho kết quả trong Bảng 5 cho thấy, trong khoảng nồng độ đã khảo sát, các hoạt chất đều có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic đáp ứng với hệ số tương quan $r = 1,000$.

Bảng 5. Kết quả khoảng tuyến tính của carbocistein và salbutamol

STT	% so với định lượng	Carbocistein		Salbutamol	
		Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic ($\mu\text{AU.s}$)	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic ($\mu\text{AU.s}$)
1	60	305,7	1035617	1,198	88935
2	80	407,6	1383449	1,597	119281
3	100	509,5	1728263	1,996	148743
4	120	611,4	2079663	2,395	178947
5	140	713,3	2415071	2,795	208830
Phương trình hồi quy		$y = 3390,9x + 851,6$		$Y = 75007,3x + 780,8$	
Hệ số tương quan		1,000		1,000	
% Hệ số chặn		0,05%		0,52%	

3.2.4. Độ đúng

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Dùng dung dịch chuẩn hỗn hợp ở mức độ thích hợp hệ thống.

Chuẩn bị 03 loại mẫu tự tạo: Chuẩn bị các mẫu tự tạo ở các mức nồng độ 70%, 100%, 130% so với nồng độ định lượng bằng cách thêm một lượng chính xác mỗi chất chuẩn vào mẫu placebo. Tại mỗi mức nồng độ, thực hiện 03 mẫu độc lập. Phân tích mẫu theo quy trình phân tích đã chọn, xác định hoạt chất thu hồi. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả độ đúng của phương pháp.

% so với định lượng	Carbocistein			Salbutamol		
	Lượng cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	Lượng cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
70%	179,2	1222423	100,8	17,52	105039	100,8
	178,2	1221359	101,3	17,66	104387	99,4
	181,3	1222878	99,7	17,72	104877	99,5
TB (n = 3)			100,6			99,9
RSD% (n = 3)			0,8			0,8
100%	254,8	1734845	100,7	25,11	149415	100,0
	256,9	1729622	99,5	25,22	149411	99,6
	255,3	1733995	100,4	24,89	149034	100,7
TB (n = 3)			100,2			100,1
RSD% (n = 3)			0,6			0,5
130%	332,3	2271902	101,1	32,52	195635	101,1
	333,1	2264566	100,5	32,70	195818	100,7
	334,2	2277639	100,8	32,63	195596	100,8
TB (n = 3)			100,8			100,9
RSD% (n = 3)			0,3			0,2
TB (n = 9)			100,5			100,3
RSD% (n = 9)			0,6			0,7

Kết quả cho thấy % thu hồi của carbocistein và salbutamol đều nằm trong giới hạn từ 98,0% đến 102,0% và RSD nhỏ hơn 2,0%. Như vậy phương pháp có độ đúng tốt.

3.2.5. Độ chụm của phương pháp

Tiến hành phân tích trên 12 mẫu thử độc lập, với 02 kiểm nghiệm viên khác nhau trên 2 ngày khác nhau (mỗi kiểm nghiệm viên phân tích 06 mẫu thử độc lập). Kết quả thể hiện ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả độ chụm của phương pháp

STT	Hàm lượng % carbocistein		Hàm lượng % salbutamol	
	Kiểm nghiệm viên 1	Kiểm nghiệm viên 2	Kiểm nghiệm viên 1	Kiểm nghiệm viên 2
1	101,5	101,3	99,5	100,0
2	100,4	100,6	98,2	98,9
3	101,7	100,5	100,0	100,9
4	101,6	100,7	99,9	101,4
5	100,2	100,1	98,3	98,8
6	100,6	100,9	98,1	99,0
TB (n = 6)	101,0	100,7	99,0	99,8
RSD% (n = 6)	0,6	0,4	0,8	1,0
TB (2 kiểm nghiệm viên) = 100,9%			TB (2 kiểm nghiệm viên) = 99,4%	
RSD (2 kiểm nghiệm viên) = 0,5%			RSD (2 kiểm nghiệm viên) = 1,1%	

Từ kết quả thu được cho thấy phương pháp có độ chính xác cao (RSD% của 12 mẫu thử trên 2 kiểm nghiệm viên ở cả hai hoạt chất đều nhỏ hơn 2,0%) có thể áp dụng để định lượng chế phẩm.

3.2.6. Khoảng xác định

Trong phần đánh giá độ đúng, độ tuyến tính suy ra khoảng xác định của carbocistein là 0,35 mg/mL đến 0,65 mg/mL và khoảng xác định của salbutamol là 1,4 µg/mL đến 2,6 µg/mL.

3.2.7. Độ ổn định của phương pháp

3.2.7.1. Độ ổn định của dung dịch

Tiến hành đánh giá độ ổn định của dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử bảo quản ở 15°C, trong lọ đựng thủy tinh cho kết quả như bảng 8.

Bảng 8. Kết quả đánh giá độ ổn định trong dung dịch

Hoạt chất	Dung dịch chuẩn			Dung dịch thử		
	Ban đầu	Sau 11 giờ	% thay đổi	Ban đầu	Sau 7 giờ	% thay đổi
Carbocistein	1728797	1726506	0,1%	1736225	1730490	0,3%
Salbutamol	148897	149153	0,2%	149592	148576	0,7%

% thay đổi của dung dịch chuẩn sau 11 giờ và dung dịch thử sau 7 giờ đều nhỏ hơn 2%. Do đó dung dịch chuẩn và dung dịch thử ổn định trên khoảng thời gian nghiên cứu ở nhiệt độ bảo quản 15°C.

3.2.7.2. Đánh giá thay đổi nhỏ điều kiện sắc ký

Độ ổn định của phương pháp được đánh giá thông qua việc khảo sát một số thay đổi nhỏ điều kiện sắc ký bao gồm: cột sắc ký Inertsil ODS-3 (150 x 4,6 mm; 5 µm) sử dụng trên 2 cột khác số seri (cột 1: H15-23340 và cột 2: 70664-8); tốc độ dòng (1,1 mL/phút đến 1,3 mL/phút); bước sóng (± 2 nm); tỉ lệ pha động tại giai đoạn gradient rửa giải salbutamol ($\pm 2\%$ nồng độ tuyệt đối); thời gian bắt đầu giai đoạn gradient ($\pm 5\%$) cho kết quả:

Bảng 9. Kết quả đánh giá thay đổi nhỏ điều kiện sắc ký

Thông số	Carbocistein			Salbutamol			
	Rt (phút)	T	N	Rt (phút)	T	N	Rs
Ban đầu	2,721	1,277	3088	10,263	1,113	22081	31,9
Bước sóng 223 nm	2,721	1,277	3081	10,263	1,113	22039	31,9
Bước sóng 227 nm	2,721	1,277	3092	10,263	1,109	22107	32,0
Giảm tốc độ dòng	2,975	1,303	3197	10,910	1,112	21884	31,4
Tăng tốc độ dòng	2,513	1,275	3014	9,786	1,112	22313	32,7
Giảm pha động B	2,737	1,310	3100	10,602	1,102	20972	32,1
Tăng pha động B	2,733	1,301	3105	10,143	1,118	22499	31,8
Giảm thời gian	2,731	1,297	3100	10,134	1,105	21097	31,2
Tăng thời gian	2,729	1,292	3101	10,516	1,117	22552	32,7
Cột số 2	2,744	1,271	2727	11,115	1,153	17239	30,5

Kết quả cho thấy thời gian lưu của pic carbocistein và salbutamol được rửa giải phù hợp với khoảng thời gian thiết lập cho chương trình pha động. Các thông số số địa lý thuyết (N), hệ số kéo đuôi (T) của cả hai pic carbocistein và salbutamol, độ phân giải (Rs) giữa carbocistein và salbutamol đều đạt yêu cầu.

4. BÀN LUẬN

Dựa vào tính chất carbocistein là chất tan rất ít trong nước và alcol, tan trong dung dịch acid vô cơ loãng và dung dịch kiềm loãng. Salbutamol sulfat tan tốt trong nước, thực tế không tan hoặc tan ít trong ethanol 96% và methylen chlorid [1, 2]. Vì vậy, nghiên cứu này đã lựa chọn HCl 0,1 N để hòa tan cả hai hoạt chất để xây dựng phương pháp định lượng đồng thời carbocistein và salbutamol trong viên nang X do tham khảo JP XVIII chuyên luận viên nén carbocistein, sử dụng dung dịch acid hydrochloric 0,5 N làm dung môi pha mẫu ban đầu. Dung môi HCl 0,1 N có tính acid, tuy nhiên trong một số chuyên luận của các dược điển quốc tế đã sử dụng HCl 0,1 N làm dung môi hoà tan mẫu như JP XVIII chỉ tiêu định lượng trong chuyên luận aciclovir, USP 2025 chỉ tiêu thử độ hoà tan của các chuyên luận viên nén tác dụng kéo dài albuterol, viên nén carbidopa, levodopa, entacapon, viên nén tramadol hydrochlorid và acetaminophen [1, 3].

Trong công thức bào chế viên nang X, hàm lượng carbocistein rất lớn (500 mg), trong khi salbutamol chỉ 2 mg, xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 2 hoạt chất này gặp nhiều khó khăn. Các dược điển hiện hành USP 2025, BP 2025, ĐĐVN V, JP XVIII... chưa có chuyên luận chế phẩm phối hợp giữa carbocistein và salbutamol, các bài báo quốc tế cũng chưa tìm được công bố nào xây dựng phương pháp định lượng đồng thời carbocistein và salbutamol. Tham khảo JP XVIII chuyên luận viên nén carbocistein với điều kiện sắc ký: cột sắc ký C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); pha động là dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v); thể tích tiêm mẫu 50 µL.

Nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn cột C18 là cột thông dụng tại các phòng thí nghiệm và khảo sát hệ pha động là dung dịch acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) để đánh giá khả năng tách của 2 chất carbocistein và salbutamol. Khi khảo sát hệ pha động là 100% acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) thì carbocistein có thời gian lưu của carbocistein khoảng 3,5 phút, còn salbutamol không rửa giải được. Theo tài liệu tham khảo phương pháp định lượng đồng thời salbutamol sulfat và bromhexin sử dụng pha động là ACN : MeOH : đệm phosphat pH 4 [4, 5] hoặc viên nén salbutamol, theophylline và ambroxol sử dụng pha động ACN : đệm phosphat pH 3 [6]. Vì vậy, sau 3,5 phút rửa giải carbocistein, hệ pha động phối hợp thêm ACN vào để rửa giải salbutamol với thời gian lưu 11 phút. Phương pháp được xây dựng đã được thẩm định đầy đủ độ đặc hiệu, tuyến tính, lặp lại, đúng và ổn định phương pháp trong khoảng nồng độ khảo sát và có thể áp dụng kiểm tra chất lượng cho chế phẩm viên nang X. Khi nhà sản xuất khác muốn sử dụng phương pháp này cho chế phẩm của mình cần xác nhận lại giá trị sử dụng của phương pháp.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã công bố phương pháp HPLC định lượng đồng thời carbocistein và salbutamol, hai thành phần có hàm lượng trong viên nang chênh lệch nhau rất nhiều. Phương pháp sử dụng cột C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); bước sóng 225 nm; tốc độ dòng 1,2 mL/phút; thể tích tiêm 50 µL; pha động là acid trifluoroacetic 0,1% (v/v) – acetonitril với chương trình dung môi phương pháp đơn giản, dễ thực hiện tại các phòng kiểm nghiệm. Phương pháp xây dựng có tính đặc hiệu cao, sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic đáp ứng và nồng độ hoạt chất, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng cao, phương pháp ổn định với các điều kiện trang thiết bị, hóa chất thuốc thử phù hợp với đa số các phòng thí nghiệm. Với các kết quả thu được, có thể áp dụng phương pháp đã nghiên cứu để xác định đồng thời carbocistein và salbutamol trong chế phẩm viên nang cứng X.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. The Committee on JP (2021), *The Japanese Pharmacopoeia XVIII: L-Carbocysteine monograph; L-Carbocysteine tablets; Salbutamol sulfate monograph*.
2. Council of Europe, *British Pharmacopoeia 2025*.
3. United States Pharmacopoeial Convention (2025), *The United States Pharmacopoeia 2025*.
4. Dương Đình Chung, Nguyễn Hữu Khánh Quan, Trương Thị Thu Thảo, Nguyễn Thị Ngọc Yến, Phương pháp Rp-HPLC định lượng đồng thời Salbutamol và Bromhexin trong si-rô thuốc, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Số 9* (2020), 6-9.
5. P N S Pai, G K Rao, M S Murthy, A Agarwal, S Puranik, Simultaneous Determination of Salbutamol Sulphate and Bromhexine Hydrochloride in Tablets by Reverse Phase Liquid Chromatography, *Indian J Pharm Sci.* (2009); 71(1): 53–55. doi: 10.4103/0250-474X.51957.
6. Sravani Ratnam Arji, Sarma SRS Eranki, Anitha Kadimi, Prakash Nathaniel Kumar Sarella and Vinny Therissa Mangam, Development and validation of an HPLC method for the simultaneous estimation of salbutamol, theophylline and ambroxol in tablet dosage form, *International Journal of Science and Research Archive*, (2023), 10(02), 634–645.
7. Bộ Y tế (2022), *Thông tư 08/2022/TT-BYT, Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc*.
8. ICH (2023), *Q2(R2) Validation of analytical procedures*.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TELMISARTAN AND HYDROCHLOROTHIAZIDE IN HUMAN PLASMA BY LC-MS/MS METHOD

NGUYEN THI CHAM¹, DOAN CAO SON¹,
VU ANH TUAN², HOANG VAN DUC¹, LE THI LA¹, ✉

¹National Institute of Drug Quality Control

²Faculty of Chemistry, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

✉Corresponding author: la.tdsh@gmail.com

Received October 10th, 2025; Accepted November 19th, 2025

Abstract: A high and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma was developed. Telmisartan-d3 and hydrochlorothiazide-13C,d2 were utilized as internal standards. Analytes were extracted from plasma by protein precipitation using acetonitrile combined with sample freezing. Liquid chromatography was performed on Luna C18(2)-HST; (50 x 3 mm; 2.5µm) column with mixture of methanol and 5 mM ammonium acetate, with 0.1% acetic (80 : 20, tt/tt) as mobile phase at flow rate of 0.3 mL per minute. The method has a rapid analysis time and LLOQ value and standard curves were found to be linear in the wide range 1 to 1000 ng/mL for TEL and 1 to 400 ng/mL for HCT. The method's precision and accuracy are within acceptable limit. The validated method has been used successfully to determine telmisartan and hydrochlorothiazide concentrations in healthy adult volunteers and demonstrate its applicability to bioavailability/bioequivalence studies of telmisartan and hydrochlorothiazide combination preparations.

Keywords: telmisartan, hydrochlorothiazide, plasma, LC-MS/MS.