

Phương pháp Rp-HPLC định lượng đồng thời Salbutamol và Bromhexin trong si-rô thuốc

Dương Đình Chung*, Nguyễn Hữu Khánh Quan, Trương Thị Thu Thảo, Nguyễn Thị Ngọc Yến

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

*ddchung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Mục đích của nghiên cứu này là xây dựng phương pháp Rp-HPLC nhanh, chính xác, đơn giản dùng để phân tích đồng thời Salbutamol (Sal) và Bromhexin (Brom) trong si-rô thuốc. Quá trình phân tách sắc kí thực hiện trên cột Phenomenex Genimi NX-C18 (250mm × 4,6mm, 5μm). Pha động sử dụng hỗn hợp dung môi methanol – acid orthophosphoric 0,07% tỉ lệ 59:41 (tt/tt), chế độ đẳng dòng, duy trì ở tốc độ 0,9ml/phút, nhiệt độ buồng cột 25°C. Bước sóng phát hiện là 225nm. Kết quả cho thấy độ tuyến tính tốt ($R^2 > 0,999$), miền giá trị tuyến tính xác định từ 4-24μg/ml đối với Sal và 8-48μg/ml đối với Brom. Phương trình hồi qui tuyến tính lần lượt là $y = 16,503x + 0,0383$ cho Sal và $y = 17,084x + 0,624$ cho Brom; độ chính xác, độ đúng đạt yêu cầu (RSD < 2%, tỉ lệ phục hồi trung bình của Sal là 99,2-99,5% và của Brom là 99,5-99,8%). Từ số liệu thẩm định cho thấy, phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn và đạt theo yêu cầu của ICH Q2R1.

Nhận 12.12.2019
Được duyệt 05.02.2020
Công bố 30.03.2020

Từ khóa
Bromhexin, COPD,
HPLC, Salbutamol,
thẩm định phương pháp

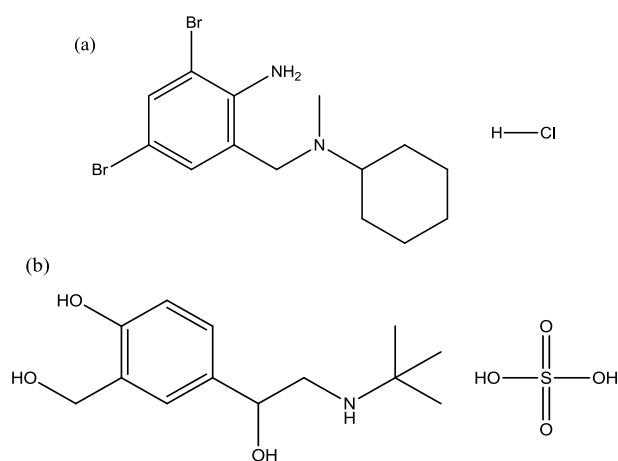
© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (Chronic obstructive pulmonary disease - COPD), đặc trưng bởi sự tắc nghẽn hô hấp và sự thông khí kém[1]. Tính đến năm 2015, COPD đã ảnh hưởng đến khoảng 2,4% dân số toàn cầu[2]. COPD được chẩn đoán ở các bệnh nhân có các triệu chứng đờm, ho và khó thở mạn tính, xác định bệnh dựa vào việc đo chức năng thông khí của phổi[1,3]. Điều trị COPD cần chú trọng đến cá thể hóa điều trị, điều trị các bệnh đồng mắc, điều trị dự phòng để tránh các đợt cấp và làm chậm quá trình tiến triển bệnh. Bên cạnh đó, các biện pháp khác như hỗ trợ cai nghiện thuốc lá, phục hồi chức năng hô hấp, giáo dục bệnh nhân cũng có vai trò quan trọng trong việc điều trị và quản lý bệnh nhân COPD[4].

Salbutamol sulfat hay được biết là bis [(1RS) -2 - [(1, 1-dimethylethyl) amino] -1- [4- hydroxy-3- (hydroxymethyl) phenyl] ethanol] sulphate (Hình 1a), là β-adrenoceptor chất chủ vận được sử dụng để làm giảm co thắt phế quản trong các tình trạng như hen suyễn và COPD[4]. Bromhexin hydrochlorid (Hình 1b) có tên hóa học là trans-4 - ((2-amino-3, 5-diBromobenzyl) amino) cyclohexanol hydrochlorid[5]. Trên lâm sàng, Bromhexin tăng cường vận chuyển chất nhầy bằng cách giảm độ nhầy dính của chất nhầy và kích hoạt biểu mô có lông chuyển giúp long đàm.

Kết hợp bromhexin và salbutamol được sử dụng để điều trị hen suyễn và viêm phế quản[6].



Hình 1 Công thức cấu tạo: (a) Bromhexin hydrochlorid, (b) Salbutamol sulfat

Sal và Brom có thể gặp ở dạng đơn lẻ hay dạng kết hợp cả hai hoạt chất này trong các dạng dược phẩm như viên nén, si-rô. Các phương pháp áp dụng trong định lượng các hoạt chất này đã được sử dụng như quang phổ[7-10], HPTLC[11,12] và Rp-HPLC[11,13-17]. Tuy nhiên, cho tới thời điểm này, ở Việt Nam chưa có nhóm tác giả nào báo

cáo qui trình định lượng đồng thời Salbutamol và Bromhexin trong dạng bào chế si-rô. Do đó, đề tài này nhằm mục tiêu xây dựng và thẩm định qui trình định lượng đồng thời Sal và Brom trong dạng chế phẩm si-rô thuốc bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao. Kết quả của đề tài này có thể cung cấp thêm một phương pháp kiểm nghiệm nhằm đảm bảo kiểm soát tốt chất lượng dược phẩm trước khi đến tay người bệnh.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu, hóa chất, thuốc thử:

Mẫu thử: Si-rô Salmodil Expectorant do hãng dược phẩm FDC Limited, Ấn Độ với số đăng kí lưu hành VN-17229-13 được mua tại thị trường Việt Nam (100ml có chứa 40mg Salbutamol sulfat và 80mg hoạt chất Bromhexin hydrochlorid).

Thiết bị: Hệ thống sắc kí Agilent 1260, đầu dò PDA, sử dụng phần mềm ChemStation phiên bản B.04.32 (Agilent – Đức); Máy lọc nước siêu sạch (Pall – Mỹ); Máy đo pH S220K và cân phân tích MS105DU 0,01mg (Metler Toledo – Thụy Sĩ); Máy siêu âm SH180 (Elma – Đức).

Hóa chất: Methanol (Fischer – Mỹ), acid phosphoric và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck – Đức).

Chất đối chiếu: Salbutamol sulfat số lô: QT105 060913; Bromhexin hydrochlorid số lô: QT0008 050115 do Viện Kiểm nghiệm Thuốc TpHCM cung cấp.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:

Dung môi pha loãng: hỗn hợp methanol và nước chứa 0,07% orthophosphoric (OPA) tỉ lệ 1:1.

Dung dịch chuẩn gốc: hòa tan chất chuẩn đối chiếu trong methanol để có được nồng độ 1000 μ g/ml và 2000 μ g/ml lần lượt cho Salbutamol và Bromhexin. Từ dung dịch chuẩn gốc trên, thực hiện pha loãng để thu được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 4-24 μ g/ml và 8-48 μ g/ml.

2.2 Qui trình xử lí mẫu:

Chuẩn bị mẫu: 5ml si-rô được chuyển vào bình định mức 50ml chứa 35ml methanol, sau khi siêu âm không gia nhiệt trong 5 phút, thêm methanol vừa đủ thể tích. Sử dụng pipet lấy 5ml thể tích dung dịch được chuyển vào bình định mức 20ml và pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp methanol và nước 0,07% orthophosphoric tỉ lệ 1:1. Dung dịch sau khi pha loãng được lọc qua màng lọc PTFE kích thước lỗ lọc 0,45 μ m (Sartorius, Đức), thu dung dịch để tiêm sắc kí.

2.3 Phương pháp phân tích, định lượng

Điều kiện sắc kí:

Phương pháp HPLC định lượng Sal và Brom trong si-rô đã được thực hiện với các điều kiện sau: cột Phenomenex

Genimi NX-C18 (250mm x 4,6mm; 5 μ m); Pha động: methanol - acid phosphoric 0,07% (59:41, tt/tt); đầu dò UV tại bước sóng 225nm; Tốc độ dòng 0,9ml/phút; Thể tích tiêm 20 μ l và duy trì nhiệt độ buồng cột 25°C.

Thẩm định phương pháp:

Phương pháp phân tích được thẩm định các chỉ tiêu: độ đúng, độ chính xác, tính tuyến tính, tính tương thích hệ thống và giới hạn định lượng theo các hướng dẫn của ICH[18] và theo qui định của *Sổ tay hướng dẫn đăng kí thuốc*, phụ lục 8, Quyết định của Cục trưởng Cục Quản lí Dược, Bộ Y tế số 07/QĐ-QLD ngày 11 tháng 01 năm 2013.

Phương pháp thống kê:

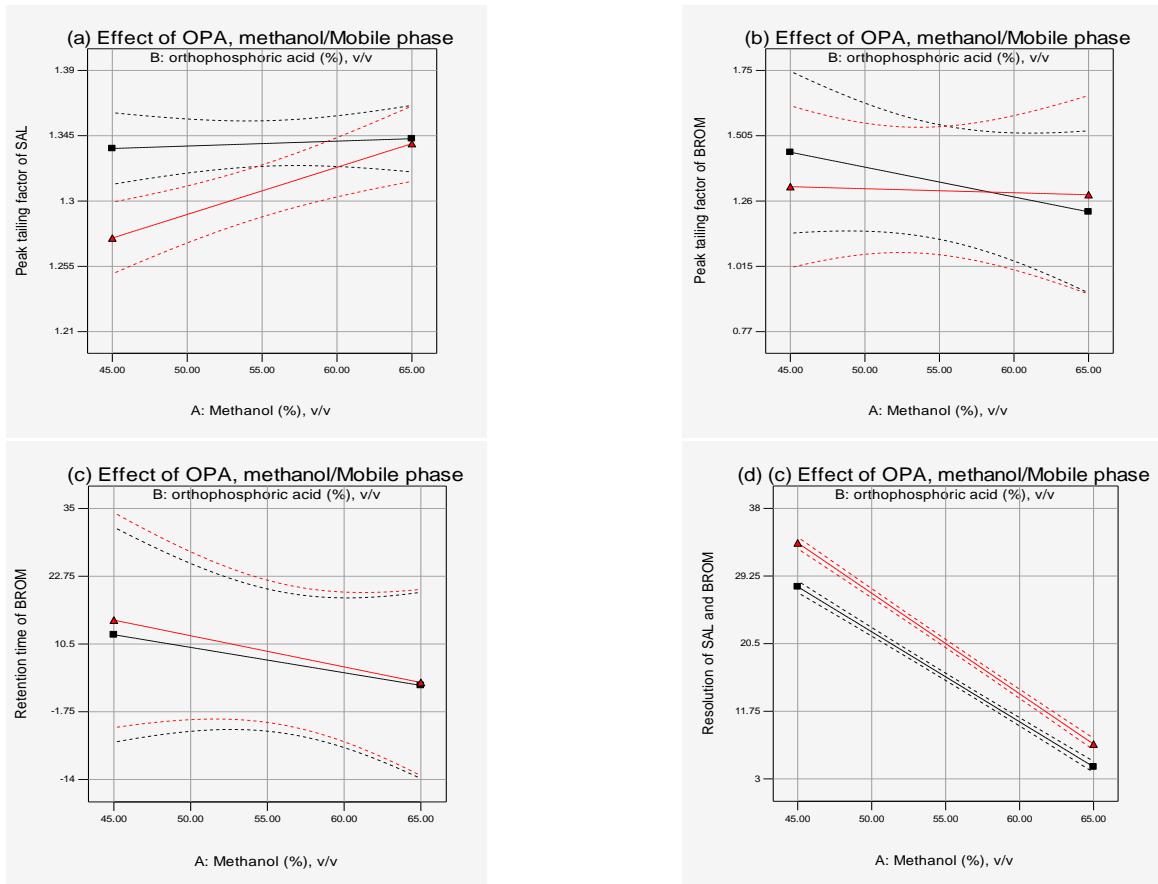
Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng TB \pm SD. Dữ liệu và hình ảnh được xử lí bằng phần mềm ChemStation. Microsoft Excel được áp dụng để tính toán thống kê (trung bình, SD, %RSD).

3 Kết quả và bàn luận

3.1 Khảo sát các điều kiện sắc kí:

Tham khảo các tài liệu [11,13-17] và tính chất hóa lí của Sal và Brom, phương pháp sắc kí lỏng pha đảo có thể áp dụng để phân tích định lượng đồng thời hai hoạt chất này. Nghiên cứu ban đầu thực hiện thăm dò một số hệ pha động trên cột Phenomenex Genimi NX-C18 và ghi nhận tín hiệu ở bước sóng 225nm. Pha động là methanol, acetonitril, nước có thêm các acid (formic, acetic, orthophosphoric) điều chỉnh với các điều kiện tỉ lệ khác nhau. Chọn điều kiện sắc kí sao cho peak Sal và Brom tách khỏi nhau và tách rời khỏi các peak tạp. Peak đạt độ tinh khiết cần thiết cho định lượng và các thông số peak sắc kí đạt yêu cầu.

Hình 2 cho thấy sự tương tác của tỉ lệ phần trăm methanol và nồng độ OPA trong hỗn hợp pha động. Nồng độ OPA ảnh hưởng không nhiều đến hệ số kéo đuôi của Salbutamol (Hình 2a). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ OPA thì giúp cải thiện hệ số bất đối xứng của tín hiệu Brom (Hình 2b). Nồng độ OPA và methanol đồng ảnh hưởng đến thời gian lưu của tín hiệu peak Brom (Hình 2) và độ phân giải của Sal và Brom (Hình 2c,d). Tăng nồng độ OPA và methanol dẫn đến giảm thời gian phân tích. Tuy nhiên, ở tỉ lệ methanol – nước có chứa 0,07% OPA (59:41, tt/tt) thời gian phân tích phù hợp (<5 phút), peak nhọn, và đạt yêu cầu các thông số sắc kí. Do đó, hệ tỉ lệ dung môi (methanol – nước có chứa 0,07% OPA; 59:41, tt/tt) này được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2 Ảnh hưởng của %OPA, % methanol: (a) hệ số kéo đuôi của Sal; (b) hệ số kéo đuôi của Brom; (c) Thời gian lưu của Brom và (d) Độ phân giải của tín hiệu peak sắc kí Sal và Brom

Kết quả lựa chọn được hệ pha động methanol – nước có chứa 0,07% OPA theo tỉ lệ (59:41, tt/tt).

Thảm định phương pháp:

Tính tương thích hệ thống:

Thực hiện tiêm 6 lần dung dịch chuẩn ở nồng độ định lượng. Ghi lại các thông số sắc kí: Thời gian lưu tương đối, diện tích peak, số đĩa lí thuyết biểu kiến và độ phân giải

giữa tín hiệu Sal và Brom. Bảng 1 cho thấy các giá trị %RSD của thời gian lưu, diện tích peak <2%, hệ số kéo đuôi đạt yêu cầu $0,8 < T < 1,5$ và số lớn hơn qui định ($N > 2000$) chứng tỏ qui trình đạt yêu cầu tính tương thích hệ thống. Sắc kí mẫu chuẩn trong điều kiện tối ưu được thể hiện trong Hình 3.

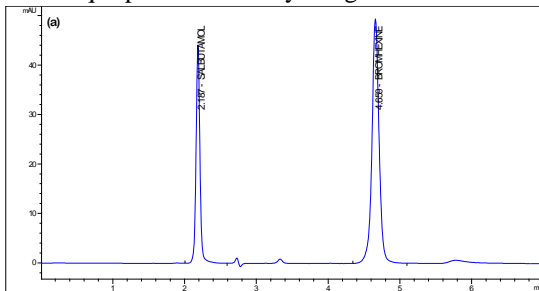
Bảng 1 Kết quả đánh giá tính tương thích hệ thống

| Lần tiêm | Tín hiệu Sal | | | | Tín hiệu Brom | | | | Rs |
|----------|--------------|---------|-------|------|---------------|---------|-------|-------|-------|
| | t_R | S | T | N | t_R | S | T | N | |
| 1 | 2,148 | 162,408 | 1,085 | 8679 | 4,538 | 331,825 | 1,142 | 12509 | 18,74 |
| 2 | 2,149 | 162,781 | 1,101 | 8832 | 4,535 | 335,603 | 1,117 | 12472 | 18,75 |
| 3 | 2,147 | 162,800 | 1,188 | 8640 | 4,532 | 335,621 | 1,140 | 12449 | 18,69 |
| 4 | 2,147 | 162,521 | 1,157 | 8832 | 4,525 | 332,924 | 1,128 | 12597 | 18,79 |
| 5 | 2,146 | 162,143 | 1,190 | 8833 | 4,525 | 334,034 | 1,154 | 12562 | 18,78 |
| 6 | 2,147 | 159,612 | 1,068 | 8852 | 4,525 | 327,359 | 1,157 | 12786 | 18,88 |
| TB | 2,15 | 162,044 | | | 4,530 | 332,894 | | | |
| %RSD | 0,05% | 0,75% | | | 0,13% | 0,92% | | | |

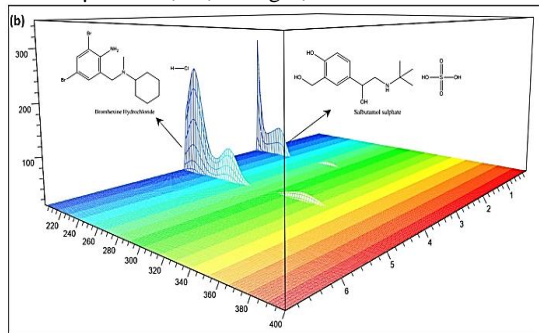
Ghi chú: t_R – Thời gian lưu (phút); S- diện tích peak (mAU*S); T – Hệ số đuôi (USP Tailing); N – Số đĩa lí thuyết; Rs- độ phân giải (giá trị này được tính theo tín hiệu của Sal và Brom)

Độ đặc hiệu:

Tiêm mẫu trắng, mẫu thử, mẫu chuẩn vào hệ thống sắc kí. Kết quả tại thời gian lưu của mẫu thử cho thấy các tín hiệu trùng với thời gian lưu của mẫu chuẩn và không thấy xuất hiện tín hiệu nào tại mẫu trắng. Kết quả cho thấy sự tương đồng phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử là 0,999. Kiểm tra độ tinh khiết peak sắc kí bằng đầu dò DAD, kết quả trên 99% tinh khiết. Như vậy, phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cho Sal và Brom. Kết quả phổ 3D trình bày trong Hình 4.



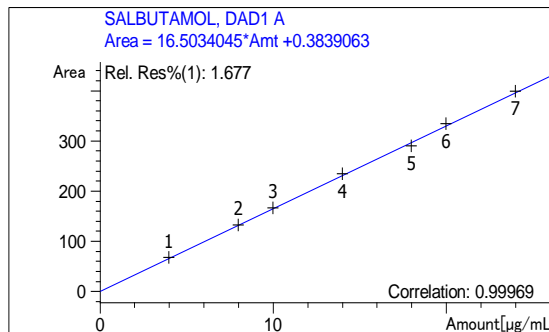
Hình 3 Sắc kí đồ của Salbutamol 10µg/ml và Bromhexin 20µl tại điều kiện sắc kí (cột Phenomenex Genimi NX-C18 (250mm x 4,6mm; 5µm); Pha động methanol - acid phosphoric 0,07% (59:41, tt/tt); Đầu dò UV: 225nm; Tốc độ dòng 0,9ml/phút; Thể tích tiêm 20µl và nhiệt độ buồng cột 25°C.



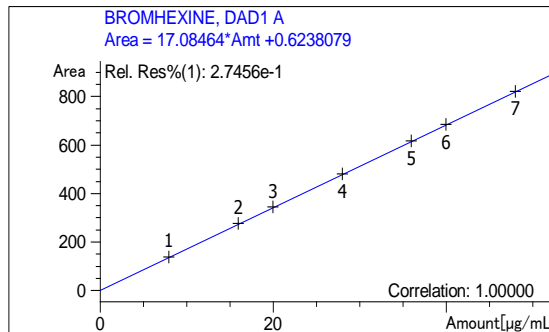
Hình 4 Sắc kí đồ 3D, kết quả kiểm tra tính đặc hiệu.

Tính tuyến tính:

Phương pháp phân tích được thiết lập độ tuyến tính ở khoảng nồng độ 4-24µg/ml đối với Sal và 8-48µg/ml đối với Brom. Phương trình hồi qui lần lượt là $y = 16,503x + 0,038$ cho Sal và $y = 17,084x + 0,624$ cho Brom. Giá trị hệ số tương quan giữa (x) nồng độ của chuẩn đối chiếu và (y) diện tích peak ($R^2 > 0,999$) chứng tỏ phương pháp đạt yêu cầu độ tuyến tính. Hình 5 và Hình 6 trình bày dữ liệu tuyến tính của phương pháp.



Hình 5 Đồ thị biểu diễn tính tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak của Sal.



Hình 6 Đồ thị biểu diễn tính tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak của Brom.

Độ đúng:

Độ đúng được xác định bằng cách đánh giá kiểm tra độ lặp lại của phương pháp phân tích thông qua giá trị độ phục hồi. Phương pháp đánh giá bằng cách thêm chuẩn vào mẫu ở 3 cấp độ khác nhau, mỗi cấp nồng độ thực hiện 3 mẫu. Trong nghiên cứu này, 3 mức (80%, 100% và 120%) của giá trị nồng độ định lượng trong phương pháp, tương ứng với 8, 10 và 12µg/ml cho Sal và 16, 20 và 24µg/ml cho Brom. Kết quả cho thấy giá trị phục hồi của Sal là 99,2-99,5%, trong khi của Brom là 99,5-99,8%. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Độ chính xác:

Tiến hành phân tích 6 mẫu khác nhau, lặp lại trong 2 ngày. Giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu $\leq 2,0\%$. Vì vậy, qui trình định lượng đạt yêu cầu độ chính xác. Kết quả trình bày trong Bảng 3.

Bảng 2 Kết quả thẩm định độ đúng

| Mẫu | Nồng độ thêm vào (µg/ml) | | Nồng độ tìm lại µg/ml (TB ± S.D) | | % Độ phục hồi (TB ± S.D) | |
|------|--------------------------|------|----------------------------------|--------------|--------------------------|-------------|
| | Sal | Brom | Sal | Brom | Sal | Brom |
| 80% | 8 | 16 | 7,98 ± 0,04 | 15,99 ± 0,03 | 99,5 ± 0,42 | 99,8 ± 0,32 |
| 100% | 10 | 20 | 9,96 ± 0,02 | 19,98 ± 0,05 | 99,2 ± 0,21 | 99,6 ± 0,53 |
| 120% | 12 | 24 | 11,97 ± 0,05 | 24,03 ± 0,02 | 99,5 ± 0,54 | 99,5 ± 0,51 |

Bảng 3 Kết quả thẩm định tính chính xác

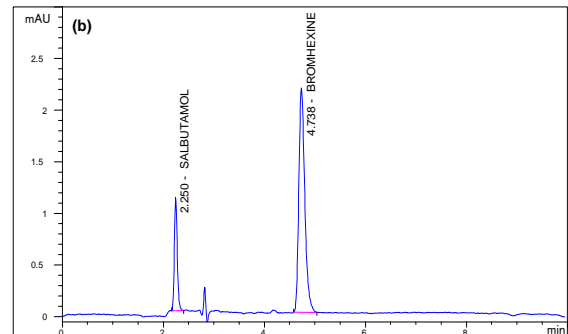
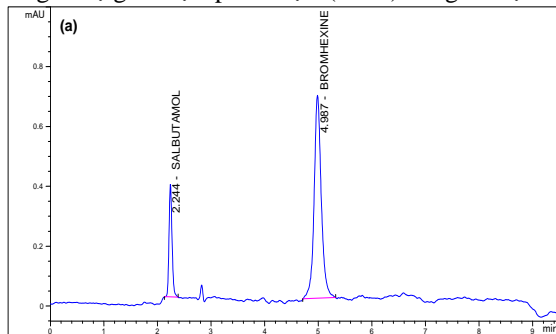
| STT | Trong ngày | | | | Khác ngày | | | |
|------|-----------------|------------------------|-----------------|----------|-----------------|------------------------|-----------------|----------|
| | Nồng độ ± SD | Diện tích peak ± SD | % Hàm lượng* | % RSD | Nồng độ ± SD | Diện tích peak ± SD | % Hàm lượng* | % RSD |
| Sal | 9,97 ± 0,02 | 166,74 ± 0,38 | 99,76 | 0,23 | 9,98 ± 0,09 | 166,81 ± 0,14 | 99,81 | 0,86 |
| Brom | 19,91 ± 0,09 | 340,99 ± 1,48 | 98,38 | 0,57 | 19,96 ± 0,08 | 341,84 ± 1,32 | 99,79 | 0,39 |

* Hàm lượng được tính từ giá trị trung bình so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Tiến hành pha loãng mẫu và phân tích sắc kí, ghi tín hiệu đáp ứng của mẫu phân tích (S-Signal). Sắc kí mẫu trắng, ghi tín hiệu (N-Noise). Tỉ số S/N = 3 và 10 lần lượt được xem là giá trị giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định

lượng (LOQ). Kết quả cho thấy LOD và LOQ cho Sal là 0,08µg/ml và 0,2µg/ml và cho Brom là 0,32µg/ml và 0,96µg/ml. Sắc kí đồ Hình 7 cho thấy nồng độ tại LOD và LOQ của 2 hoạt chất.

**Hình 7** Sắc kí đồ mẫu thử: (a) LOD và (b) LOQ.

Áp dụng qui trình phân tích để xác định hàm lượng mẫu si-rô đang lưu hành trên thị trường:

Tiến hành như phương pháp xử lí mẫu tại mục 2.3. Phân tích 3 mẫu đã đồng nhất, mỗi mẫu 3 lần, kết quả trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4 Kết quả phân tích hàm lượng Sal và Brom trong mẫu thử

| Mẫu | Nồng độ so với nhãn | |
|-----|---------------------|--------------------|
| | Brom | Sal |
| 1 | 3,86 ± 0,08mg/5ml | 1,91 ± 0,002mg/5ml |
| 2 | 3,98 ± 0,04mg/5ml | 1,97 ± 0,001mg/5ml |
| 3 | 4,01 ± 0,01mg/5ml | 1,88 ± 0,001mg/5ml |

4 Kết luận

Đề tài đã thành công trong việc xây dựng và thẩm định qui trình định lượng đồng thời Sal và Brom trong si-rô thuốc.

Kết quả cho thấy với qui trình xử lí mẫu và điều kiện sắc kí đã trình bày ở trên, phương pháp đạt độ đúng, độ chính xác, tính tuyến tính, tính tương thích hệ thống và độ lặp lại, giới hạn định lượng theo các hướng dẫn của ICH và theo qui định của Sổ tay hướng dẫn đăng kí thuốc, phụ lục 8, Quyết định của Cục trưởng Cục Quản lí Dược, Bộ Y tế số 07/QĐ-QLD ngày 11 tháng 01 năm 2013. Qui trình này có thể áp dụng để phân tích thường qui Sal và Brom trong chế phẩm si-rô thuốc.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2019.01.68.

Tài liệu tham khảo

1. C. F. Vogelmeier et al., "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary," (in e), American journal of respiratory and critical care medicine, vol. 195, no. 5, pp. 557-582, 2017.
2. T. Vos et al., "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015," (in e), The Lancet, vol. 388, no. 10053, pp. 1545-1602, 2016.
3. F. F. Ferri, Ferri's Netter Patient Advisor (Netter Clinical Science). Saunders, 2011.

4. Nguyễn Việt Tiến, Ngô Quý Châu, and L. N. Khuê, Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính. Nhà xuất bản Y học: Bộ Y tế, 2018.
5. V. Jain and M. C. Sharma, "Validated RP-HPLC method for determining the levels of bromhexine HCl, chlorpheniramine maleate, dextromethorphan HBr and guaifenesin in their pharmaceutical dosage forms," (in e), Journal of Taibah University for Science, vol. 10, no. 1, pp. 38-45, 2016.
6. Dược Thư Quốc Gia Việt Nam. Nhà xuất bản Y Học Hà Nội, 2018.
7. R. V. Rele, "Simultaneous UV-spectrophotometric estimation of bromhexine hydrochloride and salbutamol sulphate by second order derivative method in combined dosage form," (in e), Research Journal of Pharmacy and Technology, vol. 8, no. 6, pp. 702-706, 2015.
8. H. Dave, R. Mashru, and A. Thakkar, "Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods," (in e), Analytica Chimica Acta, vol. 597, no. 1, pp. 113-120, 2007.
9. I. Habib, M. Hassouna, and G. Zaki, "Simultaneous spectrophotometric determination of salbutamol and bromhexine in tablets," (in e), Il Farmaco, vol. 60, no. 3, pp. 249-254, 2005.
10. K. Abdel, S. M. Attia, M. W. Nassar, and A. Osman, "Different spectrophotometric methods manipulating ratio spectra for simultaneous determination of salbutamol and bromhexine in binary mixture," (in e), 2016.
11. A. Tyagi, N. Sharma, K. Mittal, R. Mashru, and T. Bhardwaj, "HPTLC-densitometric and RP-HPLC method development and validation for determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in tablet dosage forms," (in e), Pharm Anal Acta, vol. 6, no. 350, p. 2, 2015.
12. H. Dave, R. Mashru, and A. Patel, "Thin layer chromatography method for the determination of ternary mixture containing salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and Etofylline," (in e), Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, vol. 2, no. 3, p. 143, 2010.
13. P. S. Pai, G. Rao, M. Murthy, A. Agarwal, and S. Puranik, "Simultaneous determination of salbutamol sulphate and bromhexine hydrochloride in tablets by reverse phase liquid chromatography," (in e), Indian journal of pharmaceutical sciences, vol. 71, no. 1, p. 53, 2009.
14. R. V. Rele, "Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and salbutamol sulphate in pharmaceutical dosage by reverse phase high performance liquid chromatography," (in e), Der. Pharmacia. Lettre, vol. 7, no. 3, pp. 157-161, 2015.
15. P. M. Njaria, K. O. Abuga, F. N. Kamau, and H. K. Chepkwony, "A versatile HPLC method for the simultaneous determination of bromhexine, guaifenesin, ambroxol, salbutamol/terbutaline, pseudoephedrine, triprolidine, and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrups," (in e), Chromatographia, vol. 79, no. 21-22, pp. 1507-1514, 2016.
16. K. Chakravarthi and N. Devanna, "Simultaneous Estimation of Salbutamol, Oxtriphylline and Bromhexine Hydrochloride in Tablet Dosage Form by RP-HPLC," (in e), Asian Journal of Chemistry, vol. 29, no. 7, pp. 1629-1634, 2017.
17. N. Rao and K. D. Gawde, "Method development and force degradation studies for simultaneous estimation of salbutamol sulfate, etofylline and bromhexine hydrochloride in pharmaceutical dosage form using reversed-phase high-performance liquid chromatography method," (in e), Asian J Pharm Clin Res, vol. 11, no. 8, pp. 378-382, 2018.
18. I. H. T. Guideline, "Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)," in International conference on harmonization, Geneva, Switzerland, 2005, pp. 11-12.

Rp-HPLC methods for the simultaneous determination of Salbutamol and Bromhexine in syrup

Duong Dinh Chung*, Nguyen Huu Khanh Quan, Truong Thi Thu Thao, Nguyen Thi Ngoc Yen

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

*ddchung@ntt.edu.vn

Abstract The purpose of this study is to develop a fast, accurate, simple Rp-HPLC method for the simultaneous analysis of Salbutamol and Bromhexine in drug syrup. Chromatographic separation was performed on the Phenomenex Genimi NX-C18 column (250mm × 4.6mm, 5µm). Isocratic elution with a mixture of methanol - orthophosphoric acid 0.07% (59:41, v/v). The flow rate was maintained at 0.9ml/min, and the column temperature was 25°C. The detection wavelength is 225nm. The method has been validated according to the guidelines and met the requirements of ICH Q2R1. The research results show good linearity ($R^2 > 0.999$), the linear range determined are from 4-24µg/ml for Salbutamol and 8-48µg/ml for Bromhexine. The regression equation was $y = 16,503x + 0,0383$ for Salbutamol and $y = 17,084x + 0,624$ for Bromhexine, respectively; the precision and accuracy of the method ($RSD < 2\%$, average recovery value of Salbutamol is 99.2-99.5% and Bromhexine is 99.5-99.8%).

Keywords Bromhexin, COPD, HPLC, Salbutamol, Validation.

