

## XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI METFORMIN HYDROCLORID VÀ SAXAGLIPTIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO ĐẦU DÒ UV-VIS

Thôi Văn Lộc<sup>1</sup>, Trần Việt Hùng<sup>2</sup>, Huỳnh Thị Mỹ Duyên<sup>1\*</sup>

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh

\*Email: htmduyen@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 14/5/2025

Ngày phản biện: 17/7/2025

Ngày duyệt đăng: 25/7/2025

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Metformin hydrochlorid thuộc nhóm biguanid, saxagliptin là một chất ức chế men DPP-4 thế hệ mới. Kết hợp hai thành phần này trong cùng một dạng bào chế giúp tăng hiệu quả điều trị, giảm tác dụng không mong muốn và tăng tính tuân thủ điều trị của bệnh nhân. Để phát triển các dạng thuốc kết hợp hai hoạt chất này, trước hết cần phải xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời metformin hydrochlorid và saxagliptin. **Mục tiêu nghiên cứu:** Khảo sát điều kiện sắc ký, xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời metformin hydrochlorid và saxagliptin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò UV-Vis. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Hoạt chất metformin hydrochlorid, saxagliptin, thành phẩm viên nén chứa metformin hydrochlorid và saxagliptin đang lưu hành trên thị trường. **Kết quả:** Thông số sắc ký phù hợp: cột Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), pha động gồm methanol: đệm ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05N pH 3,0): acetonitril (tỉ lệ 20:70:10, tt/tt), tốc độ dòng 1 mL/phút, bước sóng phát hiện 215 nm. Phương pháp được thẩm định với độ thu hồi 98 – 102%; khoảng nồng độ tuyến tính lần lượt là 20 – 300  $\mu\text{g/mL}$  và 0,2 – 3,0  $\mu\text{g/mL}$ , phương trình hồi quy lần lượt là  $y = 32341x$  với  $R^2 = 0,9985$  và  $y = 14129x + 2201,3$  với  $R^2 = 0,9988$ ; RSD của độ chính xác trong và liên ngày lần lượt là 1,63% – 1,56% và 1,66% – 1,35% tương ứng với metformin hydrochlorid và saxagliptin. **Kết luận:** Đã phát triển quy trình phân tích có tính chọn lọc, chính xác, tin cậy cao để định lượng đồng thời metformin hydrochlorid và saxagliptin trong mẫu viên thành phẩm chứa metformin hydrochlorid và saxagliptin.

**Từ khóa:** metformin hydrochlorid, saxagliptin, định lượng đồng thời, HPLC.

### ABSTRACT

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE HPLC UV-VIS METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF METFORMIN HYDROCHLORIDE AND SAXAGLIPTIN

Thoi Van Loc<sup>1</sup>, Tran Viet Hung<sup>2</sup>, Huynh Thi My Duyen<sup>1\*</sup>

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Institute of Drug Quality Control-Ho Chi Minh City

**Background:** Metformin hydrochloride, a biguanide, and saxagliptin, a novel dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor. The combination of these two active pharmaceutical ingredients in a single dosage form enhances therapeutic efficacy, reduces adverse effects, and improves patient adherence. To develop combination dosage forms containing these two compounds, it is essential to develop and validate methods for the simultaneous determination of metformin hydrochloride and saxagliptin in tablets. **Objectives:** To investigate chromatographic conditions, and validate a simultaneous quantification method for metformin hydrochloride and saxagliptin using HPLC. **Materials and Methods:** Metformin hydrochloride and saxagliptin, and commercial fixed-dose combination tablets containing the active ingredients metformin hydrochloride and saxagliptin, were

utilized. **Results:** Optimal chromatographic parameters were established: a Gemini C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase consisting of methanol:buffer (0.05N  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.0):acetonitrile (20:70:10, v/v), flow rate of 1.0 mL/min, and detection wavelength 215 nm. The method was validated with recoveries ranging from 98% to 102%; linear concentration ranges of 20 – 300  $\mu\text{g/mL}$  and 0.2 – 3.0  $\mu\text{g/mL}$ , with regression equations of  $\hat{y} = 32341x$  ( $R^2 = 0.9985$ ) and  $\hat{y} = 14129x + 2201.3$  ( $R^2 = 0.9988$ ) for metformin hydrochloride and saxagliptin, respectively. The relative standard deviations (RSD) for intra-day and inter-day precision were 1.63% – 1.56% and 1.66% – 1.35% for metformin hydrochloride and saxagliptin, respectively. **Conclusion:** A selective, accurate, and reliable analytical method was successfully developed for the simultaneous quantification of metformin hydrochloride and saxagliptin in fixed-dose combination tablets.

**Keywords:** Metformin hydrochloride, saxagliptin, simultaneously quantify, HPLC.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 2023, Việt Nam ghi nhận khoảng 7 triệu người mắc đái tháo đường, trong đó ước tính 55% đã xuất hiện các biến chứng trên tim mạch, mắt, thần kinh và thận. Tình trạng này không chỉ làm gia tăng đáng kể chi phí y tế mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân [1]. Các nghiên cứu lâm sàng đã chứng minh rằng việc kết hợp metformin hydrochlorid (MET) và saxagliptin (SAX) giúp giảm đáng kể nồng độ glucose huyết lúc đói, sau ăn, và chỉ số HbA1C ở những bệnh nhân chưa kiểm soát tốt đường huyết chỉ với metformin đơn trị [2], [3]. Do đó, việc phối hợp MET và SAX trong điều trị hứa hẹn sẽ tăng cường hiệu quả kiểm soát đường huyết và giảm thiểu tác dụng không mong muốn. Đặc biệt, khi hai hoạt chất này được bào chế trong cùng một chế phẩm, sẽ góp phần nâng cao tính tuân thủ điều trị của bệnh nhân, qua đó tối ưu hóa hiệu quả trị liệu. Trên thị trường, Komboglyze XR – một sản phẩm phối hợp hai hoạt chất MET và SAX – hiện vẫn còn độc quyền, dẫn đến chi phí điều trị cao và hạn chế khả năng tiếp cận của bệnh nhân. Để giải quyết vấn đề này, việc nghiên cứu và phát triển thuốc generic là một yêu cầu cấp thiết. Tuy nhiên, một trong những trở ngại ban đầu là việc thiếu một quy trình kiểm nghiệm chuẩn. Mặc dù trên thế giới, một số nghiên cứu về định lượng đồng thời MET và SAX đã được công bố bởi các tác giả như Caglar S. và cộng sự (2014) [4], Prasad P. B. N. và cộng sự (2015) [5], Suriseti R. và cộng sự (2018) [6], Gurav S. B. và cộng sự (2020) [7], Jena D. và cộng sự (2022) [8], nhưng các dược điển như ĐCVN V, USP 44 – NF 39, và BP 2023 vẫn chưa có chuyên luận chính thức. Đặc biệt, tại Việt Nam, chưa có công trình nghiên cứu nào về định lượng đồng thời hai hoạt chất này được công bố. Do đó, xuất phát từ nhu cầu thực tiễn về việc phát triển sản phẩm thuốc generic và những hạn chế về phương pháp kiểm nghiệm, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu: 1) Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký định lượng đồng thời metformin hydrochlorid và saxagliptin bằng phương pháp HPLC đầu dò UV-Vis. 2) Thăm định quy trình định lượng đồng thời metformin hydrochlorid và saxagliptin với điều kiện sắc ký đã khảo sát và ứng dụng định lượng một số sản phẩm trên thị trường.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

**Chất chuẩn:** Metformin hydrochlorid (số lô QT168 0323, hạn dùng 30/03/2028, Viện kiểm nghiệm thuốc TP. HCM), saxagliptin hydrochlorid dihydrat (số lô SG230003, hạn dùng 03/2028, do công ty CTX Lifesciences cung cấp), thuốc gốc Komboglyze XR 5/500 (metformin hydrochlorid 500 mg, saxagliptin dạng nguyên 5 mg) (số lô: TN0279, hạn dùng: 10/12/2026).

*Dung môi, hóa chất:* Methanol (MeOH – Merck), acetonitril (ACN – Merck) đạt chuẩn sắc ký lỏng, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), acid phosphoric (Merck) và các dung môi khác đạt tiêu chuẩn phân tích theo quy định.

*Trang thiết bị:* Hệ thống sắc ký lỏng shimadzu LC20A đầu dò UV-Vis (cột Phenomenex Gemini C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), bể siêu âm, máy đo pH Mettler Toledo, cân phân tích 4 số lẻ Mettler Toledo (Đức).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Chuẩn bị mẫu

*Dung dịch chuẩn gốc MET và SAX:* Dung dịch chứa đồng thời MET và SAX nồng độ tương ứng khoảng 1000 μg/mL 10 μg/mL trong MeOH.

*Dung dịch chuẩn MET và SAX:* Pha từ dung dịch chuẩn gốc, pha loãng bằng dung môi pha động để thu được dung dịch có nồng độ MET khoảng 250 μg/mL và SAX khoảng 2,5 μg/mL, lọc qua màng lọc 0,45 μm.

*Dung dịch mẫu thử:* Cân 10 viên thuốc Komboglyze XR 5/500, xác định khối lượng trung bình của một viên, sau đó nghiền viên thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khối lượng 1/2 viên, cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 10 mL MeOH, lắc kỹ và siêu âm 10 phút, thêm pha động vào đến 85% thể tích, tiếp tục siêu âm 20 phút, bổ sung vừa thể tích bằng pha động, lắc đều, lọc qua giấy lọc 0,45 μm. Tiếp tục pha loãng bằng pha động để thu được dung dịch có nồng độ MET khoảng 250 μg/mL và SAX khoảng 2,5 μg/mL, lọc qua màng lọc 0,45 μm.

*Dung dịch mẫu trắng:* MeOH, pha động.

*Dung dịch giả dược (placebo):* Cân chính xác lượng hỗn hợp bột giả dược [9] tương ứng 1/2 viên (thành phần nguyên liệu giả dược dựa theo patent của viên Komboglyze XR 5/500 đã được công bố) [9], cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 10 mL MeOH, lắc kỹ và siêu âm 20 phút, thêm pha động vừa đủ 100 mL, lắc đều, lọc qua giấy lọc 0,45 μm. Tiếp tục pha loãng và lọc mẫu như chuẩn bị dung dịch thử.

### 2.2.2. Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích

Dựa vào tính chất lý hóa của MET và SAX, kết hợp với các nghiên cứu [4], [5], [6], [8], điều kiện sắc ký ban đầu được lựa chọn như sau:

Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu LC20A đầu dò UV-Vis với cột Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5 μm); Chương trình rửa giải đẳng dòng; Thể tích tiêm mẫu: 10 μL; Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; Bước sóng phát hiện 215 nm. Pha động: tiến hành khảo sát thành phần, tỉ lệ và pH pha động. Dung môi pha động bao gồm có: ACN, MeOH, dung dịch đệm phosphat 0,05N (điều chỉnh pH 4,0 bằng acid phosphoric). *Yêu cầu:* các thông số sắc ký có RSD ≤ 2%, số đĩa lý thuyết N > 2000, hệ số bất đối 0,8 < As < 1,2, độ phân giải Rs > 1,5.

Thẩm định quy trình phân tích đã khảo sát theo hướng dẫn của ICH gồm các tiêu chí sau: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính và miền giá trị, độ đúng, độ chính xác [10].

+ Tính tương thích hệ thống: Đánh giá tính phù hợp và ổn định của hệ thống trước khi tiến hành phân tích. Thực hiện phân tích 6 lần liên tiếp mẫu chuẩn, đánh giá theo hướng dẫn ICH [10].

+ Độ đặc hiệu: thực hiện với các mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu trắng và mẫu placebo. Sắc ký đồ các mẫu phải đạt tiêu chuẩn theo hướng dẫn của ICH [10]

+ Tính tuyến tính và miền giá trị: xây dựng đường chuẩn với các mức nồng độ trong khoảng 20 - 300 μg/mL đối với MET và 0,2 - 3,0 μg/mL đối với SAX. Phương trình hồi

quy được chấp nhận khi  $R^2 \geq 0,995$ . Miền giá trị được xây dựng trong khoảng 200 – 300  $\mu\text{g/mL}$  cho MET và 2,0 – 3,0  $\mu\text{g/mL}$  cho SAX.

+ Độ đúng: thực hiện trên các mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 80%, 100%, 120% so với nồng độ từng chất phân tích (lượng mẫu thử bằng 80% nồng độ yêu cầu, thêm chuẩn 20%), mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu. Xác định tỉ lệ thu hồi. Yêu cầu tỉ lệ thu hồi trong khoảng 98 – 102%.

+ Độ chính xác: thực hiện trên 6 mẫu thử độc lập trong ngày (độc lập lại) và trong 3 ngày liên tiếp (độc lập chính xác trung gian). Xác định hàm lượng hoạt chất trong mẫu. RSD của hàm lượng hoạt chất trong ngày và trong các ngày liên tiếp phải  $\leq 2\%$ .

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký

Bảng 1. Khảo sát thành phần và tỉ lệ dung môi pha động

STT	Thành phần pha động	Tỉ lệ dung môi pha động (tt/tt)	Thời gian lưu ( $t_R$ )		Độ phân giải (Rs)		Hệ số bất đối (As)	
			MET	SAX	MET	SAX	MET	SAX
1	MeOH : Đệm	35 : 65	3,16	6,33	-	10,40	1,28	1,08
2	Đệm : ACN	65 : 35	2,82	-	-	-	1,41	-
3	MeOH : Đệm : ACN	20 : 60 : 20	3,12	4,17	-	4,46	1,30	1,50
4		10 : 70 : 20	3,11	4,55	-	6,36	1,39	1,10
5		20 : 70 : 10	3,22	5,32	-	7,86	1,25	1,12

(-): không phát hiện pic/không ghi nhận; Thời gian phân tích: 30 phút;  $t_R$  (phút)

Đệm:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05N, pH 4,0

Nhận xét: Hệ (2) không phát hiện được SAX, hệ số (3) pic MET và SAX đều có  $A_s > 1,2$ . Các hệ (1), (4) và (5) các pic có độ phân giải, hệ số bất đối có cải thiện hơn trong đó hệ (5) cho thông số tối ưu nhất với thời gian lưu lần lượt là 3,22 và 5,32 phút, độ phân giải của SAX với MET là 7,86, hệ số bất đối lần lượt là 1,25 và 1,12 tương ứng với MET và SAX. Do đó, điều kiện (5) được sử dụng để tiến hành khảo sát pH pha động nhằm cải thiện hệ số bất đối của pic MET.

Bảng 2. Khảo sát pH pha động MeOH : Đệm : ACN (20 : 70 : 10)

STT	pH pha động	Thời gian lưu ( $t_R$ )		Hệ số bất đối (As)		Độ phân giải (Rs)	
		MET	SAX	MET	SAX	MET	SAX
1	pH 3,0	3,16	5,32	1,18	1,08	-	7,85
2	pH 4,0	3,18	5,33	1,25	1,12	-	7,86

(-) không ghi nhận

Nhận xét: Khi pH của pha động được điều chỉnh về pH 3,0 thì hệ số bất đối của pic MET đã được cải thiện. Do đó, hệ pha động có pH 3,0 được sử dụng để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo.

#### 3.2. Thẩm định quy trình định lượng

##### 3.2.1. Tính tương thích hệ thống

Bảng 3. Thẩm định tính tương thích hệ thống của quy trình phân tích (n=6)

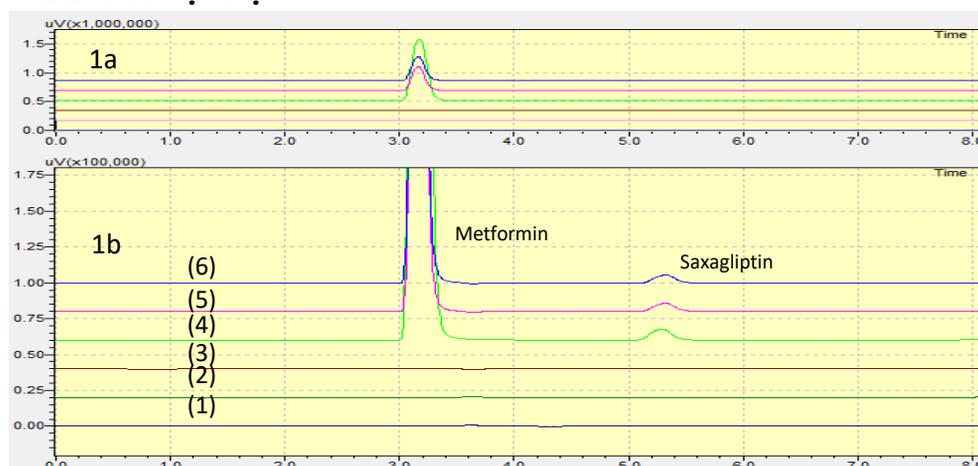
Chỉ tiêu	$t_R$ (phút)	S ( $\mu\text{V.s}$ )	N	As	Rs
MET (mẫu chuẩn)	3,16	3351608	22094	1,18	-
RSD (%)	0,36	0,48	-	-	-

Chỉ tiêu	$t_R$ (phút)	S ( $\mu V.s$ )	N	As	Rs
SAX (mẫu chuẩn)	5,33	74404	27315	1,05	7,85
RSD (%)	0,98	0,67	-	-	-

(-) không ghi nhận

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy thời gian lưu, diện tích đỉnh (S) của pic MET và SAX đều có RSD nhỏ hơn 2%. Các thông số sắc ký khác như số đĩa lý thuyết:  $N > 2000$ ; Hệ số bất đối:  $0,8 < A_s < 1,2$ ; Độ phân giải:  $R_s > 1,5$  đều đạt yêu cầu. Quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

### 3.2.2. Tính đặc hiệu



Hình 1. Overlay sắc ký đồ thể hiện tính đặc hiệu. 1a: không scale up, 1b: scale up 10 lần (1) MeOH, (2) pha động, (3) giả dược, (4) mẫu thử thêm chuẩn, (5) mẫu thử, (6) mẫu chuẩn.

Nhận xét: Sắc ký đồ mẫu trắng (MeOH và pha động) và mẫu giả dược không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của MET và SAX trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thử có các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic MET và SAX trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Các pic tách nhau hoàn toàn ( $R_s > 1,5$ ). Sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn có sự tăng lên rõ rệt về chiều cao và diện tích của các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic trong mẫu chuẩn. Như vậy, quy trình phân tích đạt tính đặc hiệu.

### 3.2.3. Tính tuyến tính, miền giá trị, độ chính xác, độ đúng

Bảng 4. Thảm định tính tuyến tính, miền giá trị, độ chính xác và độ đúng

Chỉ tiêu		Metformin hydroclorid		Saxagliptin	
Phương trình hồi quy		$\hat{y} = 32341x$		$\hat{y} = 14129x + 2201,3$	
Khoảng tuyến tính ( $\mu g/mL$ )		20 - 300		0,2 - 3,0	
Hệ số tương quan ( $R^2$ )		0,9985		0,9988	
Độ chính xác					
+ Độ lặp lại (n=6)		HLTB = 249,1 (RSD = 1,63%)		HLTB = 2,50 (RSD = 1,66%)	
+ Độ chính xác trung gian (n=18)		HLTB = 248,7 (RSD = 1,56%)		HLTB = 2,51 (RSD = 1,35%)	
Độ đúng (n=9)	Mức nồng độ	Ti lệ thu hồi (%)	RSD (%)	Ti lệ thu hồi (%)	RSD (%)
	80% (200 $\mu g/mL$ )	100,21	1,12	98,29	1,65
	100% (250 $\mu g/mL$ )	99,55	1,37	99,19	1,27
	120% (300 $\mu g/mL$ )	99,83	1,64	100,25	1,68
Miền giá trị ( $\mu g/mL$ )		200 - 300		2,0 - 3,0	

HLTB: Hàm lượng trung bình

Nhận xét: Quy trình đạt độ đúng và độ chính xác khi RSD đều  $\leq 2\%$ . Sau khi phân tích thống kê tương quan bằng trắc nghiệm F, giá trị F thực nghiệm ( $F_{MET} 2029,3; F_{SAX} 2530,8$ ) đều lớn hơn  $F_{0,05}(10,13)$  nên 2 phương trình hồi quy đều tương thích với giá trị thực nghiệm. Kiểm tra ý nghĩa của hệ số a và b trong phương trình hồi quy bằng trắc nghiệm T kết quả cho thấy hệ số a và b trong phương trình hồi quy của SAX đều có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ). Phương trình hồi quy của MET chỉ có hệ số a là có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) còn hệ số b thì không ( $p = 0,06 > 0,05$ ). Như vậy, phương trình hồi quy của MET và SAX lần lượt là  $\hat{y} = 32341x$  và  $\hat{y} = 14129x + 2201,3$  với  $R^2$  đều  $> 0,995$  và tuyến tính trong khoảng nồng độ MET từ 20 – 300  $\mu\text{g/mL}$  và SAX từ 0,2 – 3,0  $\mu\text{g/mL}$ . Quy trình đạt độ chính xác và độ đúng trong khoảng 200 – 300  $\mu\text{g/mL}$  và 2,0 – 3,0  $\mu\text{g/mL}$  tương ứng với MET và SAX xác định miền giá trị của quy trình phân tích là khoảng nồng độ trên.

## IV. BÀN LUẬN

### 4.1. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký

Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký ghi nhận với pha tĩnh là cột Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), pha động gồm MeOH : Đệm ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3,0) : ACN tỉ lệ (20 : 70 : 10 tt/tt) cho kết quả tối ưu với thời gian lưu lần lượt là 3,16 phút và 5,33 phút tương ứng với MET và SAX, độ phân giải giữa hai pic là 7,85 và hệ số bất lần lượt là 1,18 và 1,05 tương ứng với MET và SAX. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Jena và cộng sự [8], Prasad và cộng sự [5] khi đều sử dụng hệ pha động kết hợp ba thành phần MeOH, đệm và ACN. Hệ pha động phối hợp 3 thành phần với tỉ lệ thích hợp như trên tạo ra tính phân cực tối ưu giúp phân tách được MET – một chất phân cực mạnh và SAX – một chất phân cực kém hơn với Rs cao (9,09), các pic cân đối và có thời gian lưu phù hợp. Pha động gồm đệm : ACN (hệ 2, bảng 1) chỉ phát hiện được MET điều này có thể được lý giải là do ACN có độ phân cực khá cao (cao hơn MeOH) nên khi kết hợp với dung dịch đệm tạo ra một pha động có độ phân cực cao, không phù hợp để rửa giải 1 chất phân cực trung bình như SAX trên pha tĩnh là pha đảo. Hệ đệm giúp ổn định pH của pha động, giúp chất phân tích chuyển dạng hoàn toàn và ổn định hơn. Qua tham khảo các nghiên cứu [4], [5], [6], [8] đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  được lựa chọn. pH được khảo sát trong khoảng 3,0 – 4,0 dựa trên tính chất lý hóa của MET và SAX. Kết quả khảo sát cho thấy đệm pH 3,0 cho sắc ký đồ tối ưu, các pic đối xứng, tách nhau hoàn toàn và có thời gian lưu phù hợp. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu [4], [7], [8] khi pH của đệm đều trong vùng 2,5 – 3,5. Kết quả này có thể được giải thích là do MET và SAX có pKa lần lượt là 12,4 và 7,9 nên ở pH 3,0 hai chất này tồn tại ở dạng ion hóa nên quá trình rửa giải nhanh hơn ( $t_R$  phù hợp), pic đối xứng hơn ( $As$  0,8 – 1,2). MET có cực đại hấp thụ là 232 nm, của SAX lần lượt là 215 nm và 271 nm. Trong mẫu thử nồng độ MET cao gấp 100 lần nồng độ SAX. Do đó, bước sóng 215 nm và 271 nm được lựa chọn để khảo sát nhằm tăng độ nhạy của phương pháp. Kết quả khảo sát cho thấy hai hoạt chất đều có hấp thụ ở bước sóng 215 nm, các thông số của pic đều đạt yêu cầu, kết quả này cũng tương đồng với các nghiên cứu [5], [7], [8].

### 4.2. Thẩm định quy trình định lượng

Khoảng tuyến tính và miền giá trị được khảo sát dựa trên hàm lượng của hai chất trong viên đối chiếu. Các nghiên cứu của Prasad và cộng sự [5], Suriseti và cộng sự [6] cho thấy MET và SAX có hấp thụ UV tuyến tính ở các mức nồng độ thấp. Từ đó, nhóm tiến hành khảo sát khoảng tuyến tính ở các mức nồng độ trong khoảng 20 – 300  $\mu\text{g/mL}$  và 0,2 – 3,0  $\mu\text{g/mL}$  tương ứng với MET và SAX và đã chứng minh được quy trình đạt tính tuyến

tính trong khoảng nồng độ đề xuất. Với mục đích định lượng hoạt chất trong chế phẩm lưu hành trên thị trường, miền giá trị được xây dựng trong khoảng 80 – 120% nồng độ của từng chất trong mẫu thử. Kết hợp với kết quả thẩm định độ chính xác và độ đúng, miền giá trị của quy trình phân tích được xác định trong khoảng 200 – 300 µg/mL và 2,0 – 3,0 µg/mL tương ứng với MET và SAX. Đồng thời, các yêu cầu còn lại của thẩm định quy trình cũng đạt theo hướng dẫn hiện hành.

## V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công quy trình định lượng đồng thời metformin hydroclorid và saxagliptin trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC đầu dò UV-Vis đáp ứng các yêu cầu về tính tương thích với hệ thống sắc ký, đảm bảo tính đặc hiệu, có độ đúng trong khoảng 98 – 102%, có độ chính xác cao ( $RSD \leq 2\%$ ) và đạt độ chính xác trung gian theo hướng dẫn quy định ICH, cho phép áp dụng trong kiểm soát chất lượng và nghiên cứu dược phẩm, góp phần nâng cao hiệu quả và an toàn của sản phẩm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Việt Nam hiện tỉ lệ người mắc bệnh đái tháo đường đang gia tăng nhanh. 2023. [https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-/asset\\_publisher/3Yst7YhbKA5j/content/viet-nam-hien-ty-le-nguoi-mac-benh-ai-thao-uong-ang-gia-tang-nhanh](https://moh.gov.vn/tin-noi-bat/-/asset_publisher/3Yst7YhbKA5j/content/viet-nam-hien-ty-le-nguoi-mac-benh-ai-thao-uong-ang-gia-tang-nhanh).
  2. DeFronzo R., Hissa M.N., Garber A.J., Gross J.L., Duan R.Y., *et al.* Once-daily saxagliptin added to metformin provides sustained glycaemic control and is well tolerated over 102 weeks in patients with type 2 diabetes. 2009.
  3. Doucet J., Chacra A., Maheux P., Lu J., Harris S., *et al.* Efficacy and safety of saxagliptin in older patients with type 2 diabetes mellitus. *Current Medical Research and Opinion*. 2011. 27(4), 863–869, <https://doi.org/10.1185/03007995.2011.554532>.
  4. Caglar Andac S., Alp A.R. A validated high performance liquid chromatography method for the determination of Saxagliptin and metformin in bulk, a stability indicating study. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2014. 12, 2-4, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.S12-010>.
  5. Prasad P.B.N., Satyanaryana K., Krishnamohan, G. Development and validation of a method for simultaneous determination of metformin and saxagliptin in a formulation by RP-HPLC. *American journal of analytical chemistry*. 2015. 6(11), 841-850, <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2015.611080>.
  6. Suriseti R., Nagaraju, K. Analytical method development and validation for the estimation of Saxagliptin and Metformin by RP HPLC method. *International Journal for Advance Research and Development*. 2018. 3(10), 23-28.
  7. Gurav S.B., Manish N. Development and validation of novel stability-indicating LC method for the determination of saxagliptin and metformin. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2020. 54, 350-357, doi:10.5530/ijper.54.2s.93.
  8. Jena D., Behera S.R., Chintapalli G.S., Mishra K., Gowri S., *et al.* Development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous estimation of saxagliptin and metformin in bulk and pharmaceutical dosage forms based on quality by design. *Research Journal of Pharmacy and Life Sciences*. 2022. 3(3), 45-61.
  9. Robl J.A., Sulsky R.B., Augeri D.J., Magnin D.R., Hamann L.J., *et al.* Cyclopropyl - fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV and method. AstraZeneca Singapore Pte., Ltd. 2001.
  10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and methodology. 2005. Q2(R1), 03-13.
-