

Xác định amlodipin besylate bằng phương pháp Von-ampe hòa tan hấp phụ xung vi phân

Nguyễn Thị Kim Thường^{1,*}, Trần Chương Huyền²

¹Viện Địa chất, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

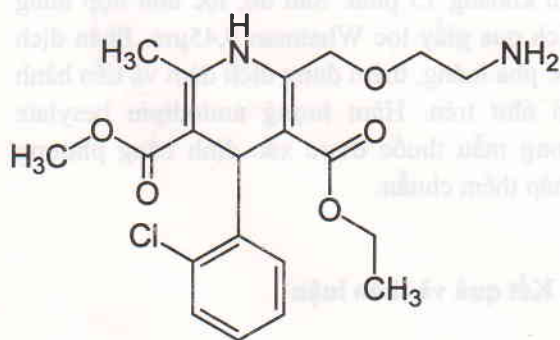
²Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 19 Lê Thánh Tông, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 5 tháng 4 năm 2010

Tóm tắt. Tính chất hấp phụ và điện hóa của amlodipin besylate trên điện cực than gương đã được nghiên cứu trong môi trường đệm Britton-Robinson bằng phương pháp von-ampe vòng và phương pháp von-ampe hòa tan xung vi phân. Phương pháp von-ampe vòng cho thấy, sự oxy hóa hai electron của amlodipin besylate trên bề mặt điện cực than gương là bất thuận nghịch và có hấp phụ xảy ra trên điện cực. Các điều kiện đo của dung dịch và các thông số máy đã được tối ưu để xây dựng quy trình xác định thuốc bằng phương pháp von-ampe hòa tan hấp phụ xung vi phân. Amlodipin besylate cho một peak oxy hóa tại 0,698V (So với Ag/AgCl) tại pH = 5. Peak oxy hóa được sử dụng để xác định amlodipin besylate trong khoảng nồng độ 10^{-8} M đến 10^{-6} M với giới hạn phát hiện là $7,6 \cdot 10^{-9}$ M. Quy trình được áp dụng thành công để xác định amlodipin besylate trong một số mẫu thuốc.

Từ khóa: Amlodipin besylat, điện cực than gương, von-ampe vòng, von-ampe hòa tan hấp phụ xung vi phân, hấp phụ, thuốc.

1. Mở đầu



Công thức cấu tạo của Amlodipin besylat

Amlodipin besylate, 2[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chloro-phenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridine carboxylic acid, 3-ethyl, 5-methylester besylate là chất đối kháng calci thuộc nhóm dihydropyridine. Thuốc có tác dụng chống đau thắt ngực và chống tăng huyết áp. Amlodipin có khả năng hấp thu chậm và gần như hoàn toàn ở đường tiêu hóa nên thuốc có tác dụng kéo dài[1]. Có một số phương pháp xác định amlodipin besylate trong thuốc như phương pháp trắc quang [2,3], phương pháp sắc ký khí (GC), sắc ký lỏng (LC)[4], sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)[5], và nhóm phương pháp cực phổ cũng như phương pháp von-ampe hòa tan. Tuy các phương pháp sắc ký có độ chọn lọc cao nhưng quy trình xử lý mẫu phức

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-37754724
E-mail: kimthuongh@yahoo.com

tạp hơn và chi phí phân tích cao hơn. Có một số công trình xác định amlodipine besylate bằng phương pháp cực phổ và phương pháp von-ampe sử dụng điện cực than gương và điện cực than mềm đã được báo cáo [6,7]. Tuy nhiên, nghiên cứu tính chất von-ampe bằng phương pháp von-ampe vòng (CV) và xung vi phân còn nhiều vấn đề chưa sáng tỏ. Mục đích của bài báo này là sử dụng phương pháp von-ampe vòng và phương pháp von-ampe hòa tan xung vi phân để nghiên cứu một số tính chất von-ampe của amlodipin besylate. Ứng dụng phương pháp von-ampe hòa tan xung vi phân để xác định amlodipin besylate trong một số mẫu thuốc.

2. Thử nghiệm

2.1. Thiết bị

Tất cả các phép đo được thực hiện trên thiết bị μ Autolab type III (Hà Lan) điều khiển bởi phần mềm 757 VA computrace, điện cực chuẩn Ag/AgCl (Metrohm, Thụy Sĩ), điện cực đối (phụ trợ) là thanh than gương và điện cực làm việc là điện cực than gương (Metrohm). Tất cả các phép đo được tiến hành trong dung dịch ở nhiệt độ phòng sau khi đuổi oxy bằng dòng khí nitơ siêu tinh khiết ít nhất 5 phút.

2.2. Hóa chất

- Tất cả các hóa chất sử dụng trong quá trình phân tích là tinh khiết phân tích (p.A). Amlodipin besylate mua tại viện kiểm định thuốc 48 Hai Bà Trưng.

- Dung dịch gốc amlodipin besylate 10^{-2} mol/l được chuẩn bị trong 20% metanol. Dung dịch sau khi pha xong cất trong bình tối và bảo quản lạnh ở 4°C .

- Các dung dịch chuẩn được pha hàng ngày từ dung dịch gốc. Bảo quản dung dịch trong lọ màu tối và lạnh 4°C .

- Dung dịch đệm Britton-Robinson từ 2- 11, được pha từ hỗn hợp axit CH_3COOH , axit H_3PO_4 và H_3BO_3 nồng độ 0,04M, điều chỉnh giá trị pH bằng dung dịch NaOH 0,2M.

2.3. Quy trình

Điện cực làm việc than gương được đánh bóng bằng bột Al_2O_3 $0,3\mu\text{m}$ ẩm nước trên miếng nhung the, điện cực được đánh đến khi sáng bóng như gương. Làm giàu amlodipin besylate trên điện cực than gương trong một thời gian thích hợp tại thế hấp phụ không đổi, dung dịch được khuấy với tốc độ 2000 vòng phút. Sau đó ngừng khuấy dung dịch 5s, tiến hành ghi đường von-ampe vòng (CV) hoặc ghi đường von-ampe hòa tan xung vi phân. Trước mỗi thí nghiệm đo, bề mặt điện cực được làm sạch bằng hoạt hóa 5 chu trình trong khoảng thế từ 0 đến +1,3V.

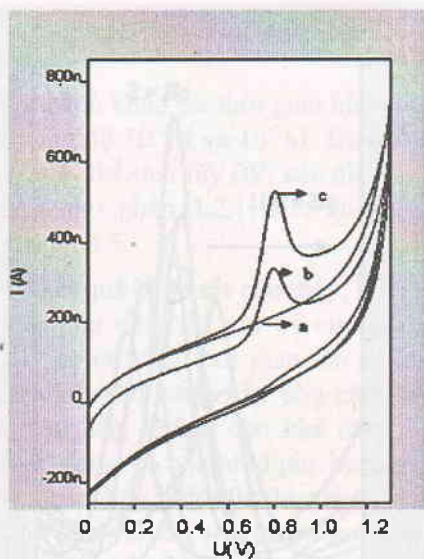
Đối với mẫu thuốc, trước khi phân tích thì viên thuốc được nghiền mịn bằng cối mã não (nếu mẫu ở dạng viên nén), sau đó hòa tan trong metanol: nước theo tỉ lệ 1:3, lắc kỹ, siêu âm khoảng 15 phút. Sau đó, lọc hỗn hợp dung dịch qua giấy lọc Whatman $0,45\mu\text{m}$. Phần dịch lọc pha loãng, thêm dung dịch đệm và tiến hành đo như trên. Hàm lượng amlodipin besylate trong mẫu thuốc được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Von ampe vòng (CV)

Để hiểu được quá trình điện hóa xảy ra trên bề mặt điện cực than gương, phương pháp von-ampe vòng được sử dụng để nghiên cứu.





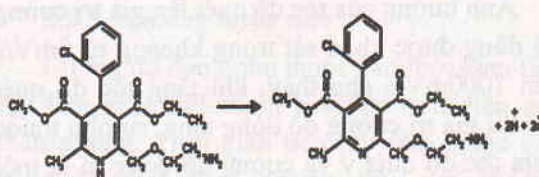
Hình 1. Đường CV tại pH = 5,0. Đường a là đường CV nền đệm khi có thời gian tích lũy 60s, đường b là đường CV của amlodipin $10^{-5}M$ khi không hấp phụ làm giàu, đường c là đường CV của amlodipin $10^{-5}M$ khi hấp phụ làm giàu 60 s.

Điều kiện ghi đường CV: Nồng độ amlodipin besylate $10^{-5}M$, thế hấp phụ 0V, thời gian hấp phụ 60s, khoảng quét thế từ 0 đến +1,3V. Trước khi làm giàu chất phân tích trên bề mặt điện cực thì điện cực được làm sạch bằng hoạt hóa 5 chu trình trong khoảng thế từ 0 đến +1,3V.

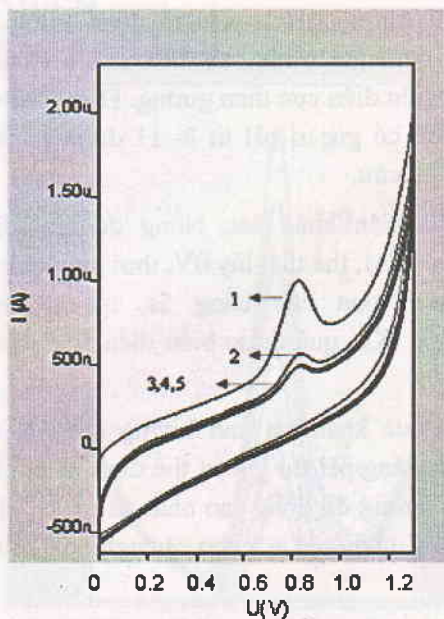
Qua đường CV cho thấy, amlodipin cho một peak anot, chỉ xảy ra quá trình oxy hóa trên bề mặt điện cực, không xảy ra quá khử. Như vậy, quá trình oxy hóa của amlodipin besylate là bất thuận nghịch. Tính chất hấp phụ của amlodipin besylate được thể hiện rõ ràng qua hình 1.

Khi thời gian hấp phụ 60s thì giá trị cường độ dòng tăng gần gấp đôi khi không có hấp phụ làm giàu.

Như vậy, sau giai đoạn hấp phụ làm giàu trên điện cực, có một peak anot xuất hiện tại thế +0,801V là do quá trình oxy hóa 2 electron không thuận nghịch của vòng 1,4 dihydropyridine tạo thành dẫn xuất pyridin tương ứng.



Hình 2, đường CV được quét 5 vòng, vòng đầu tiên thì giá trị cường độ dòng cao hơn, 4 vòng sau đó thì giá trị cường độ dòng thấp hơn. Sở dĩ có hiện tượng khác nhau về giá trị cường độ dòng của đường CV quét liên tục sau khi hấp phụ 60s tại thế 0V vì khi quét vòng thứ nhất, amlodipin đã được hấp phụ trên điện cực, sau khi quét vòng thứ nhất thì chất được hòa tan, không còn hấp phụ trên điện cực nữa, vòng thứ 2 cao hơn các vòng 3, 4, 5 có lẽ do chất chưa được hòa tan hoàn toàn ra khỏi bề mặt điện cực. Các vòng 3, 4, 5 thì giá trị cường độ dòng thấp và bằng nhau, tín hiệu cường độ dòng của các đường CV 3, 4, 5 tương tự như khi nghi trực tiếp không có quá trình tích lũy. Điều này khẳng định thêm rằng amlodipin besylate có hấp phụ trên điện cực than gương.



Hình 2. Đường von-ampe vòng quét 5 vòng liên tục: 1- quét vòng thứ nhất, sau giai đoạn tích lũy làm giàu 60s tại thế 0V, 2- quét vòng thứ 2; 3,4,5 – quét vòng thứ 3,4,5.

Ảnh hưởng của tốc độ quét lên giá trị cường độ dòng được khảo sát trong khoảng từ 5mV/s đến 1000mV/s cho thấy, khi tăng tốc độ quét thì giá trị cường độ dòng tăng, sự phụ thuộc giữa tốc độ quét v và cường độ dòng i_p là một đường thẳng tuyến tính được biểu diễn theo phương trình $\log i_p = 0,999 + 0,79 \cdot \log v$. Ngoài ra, khi tăng tốc độ quét thì thế đỉnh peak dịch chuyển sang phía dương hơn, điều này có thể khẳng định quá trình oxy hóa trên điện cực than gương là bất thuận nghịch.

3.2. Phương pháp von-ampe hòa tan xung vi phân

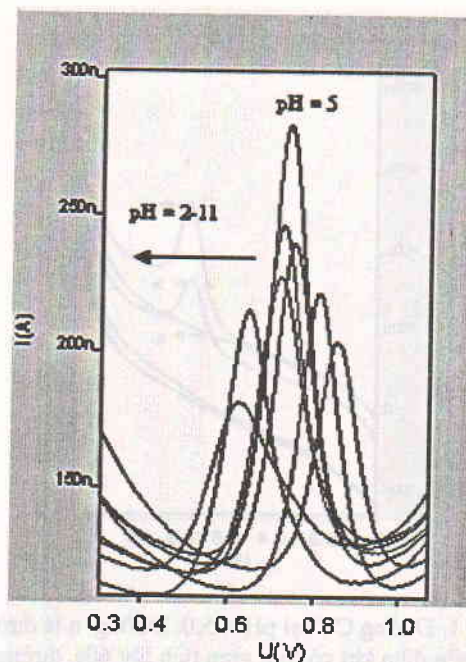
Phương pháp von-ampe hòa tan xung vi phân có độ nhạy và độ chọn lọc cao được ứng dụng để xác định amlodipin besylat. Các điều kiện tối ưu cho quá trình phân tích được khảo sát. Áp dụng quy trình tối ưu đó để phân tích amlodipin besylat trong mẫu thuốc.

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH

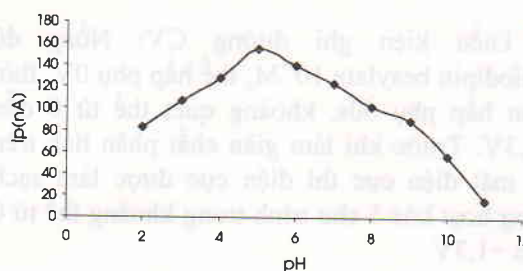
Môi trường pH là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình oxy hóa của amlodipin besylat trên điện cực than gương. Đệm Britton - Robinson có giá trị pH từ 2- 11 được sử dụng để nghiên cứu.

Điều kiện khảo sát: Nồng độ amlodipin besylat $10^{-5}M$, thế tích lũy 0V, thời gian tích lũy 30s, thời gian cân bằng 5s, tốc độ quét 12,5mV/s. Kết quả được biểu diễn trên hình 3 và hình 4.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH cho thấy, khi tăng pH thì giá trị thế đỉnh peak giảm dần, và cường độ dòng cao nhất tại giá trị pH = 5. Do vậy, chọn pH = 5 cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến cường độ dòng pic.



Hình 4. Sự phụ thuộc giữa cường độ dòng và Ph.

3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng thế hấp phụ (E_{hp})

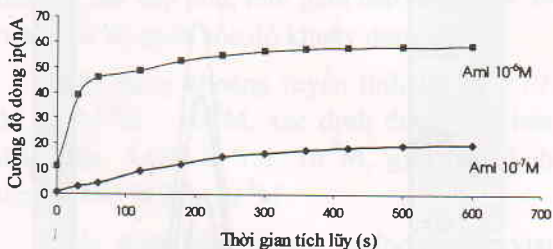
Sự phụ thuộc cường độ dòng vào thế hấp phụ được khảo sát trong khoảng từ -0,3V đến + 0,4V tại pH = 5, các điều kiện khác tương tự như phần 3.2.1. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi thế hấp phụ dương hơn 0V thì giá trị cường độ dòng giảm, thế hấp phụ từ 0V đến -0,3V thì giá trị cường độ dòng tăng không đáng kể, pic không được cân đối. Tuy nhiên, để đảm bảo độ chọn lọc của quá trình làm giàu tích lũy chất lên bề mặt điện cực, chúng tôi chọn thế hấp phụ là 0V.

3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian hấp phụ (t_{hp})

Tiến hành khảo sát thời gian hấp phụ tại hai giá trị nồng độ $10^{-7}M$ và $10^{-6}M$. Điều kiện khảo sát: pH = 5, thế tích lũy 0V, các điều kiện khác tương tự như phần 3.2.1. Kết quả được biểu diễn trên hình 5.

Qua kết quả khảo sát cho thấy, khi tăng thời gian hấp phụ chất thì giá trị cường độ dòng tăng, tuy nhiên tăng thời gian lên đến một giá trị nhất định khả năng hấp phụ chất trên điện cực bị bão hòa, không còn khả năng hấp phụ nữa. Với dung dịch amlodipin besylat $10^{-6}M$, sau thời gian hấp phụ 60s thì giá trị cường độ dòng cao gấp 4,2 lần so với trường hợp không hấp phụ. Đối với dung dịch amlodipin besylat $10^{-7}M$, thời gian hấp phụ 240s thì giá trị cường độ dòng cao gấp 20 lần so với trường hợp không hấp phụ.

Hiện tượng hấp phụ của amlodipin besylate trên điện cực than gương có thể tuân theo quy luật của phương trình Langmuir nên có thể giả thiết rằng quá trình hấp phụ của chất trên bề mặt điện cực là đơn lớp.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian tích lũy đến cường độ dòng tại pH = 5, Eacc = 0V.

2.3.4. Khảo sát các điều kiện khác.

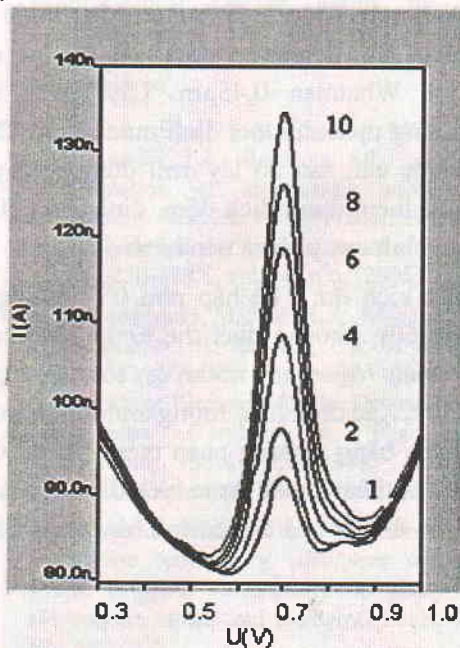
Các điều kiện khác ảnh hưởng đến giá trị cường độ dòng như tốc độ quét, biên độ xung cũng ảnh hưởng đến giá trị cường độ dòng. Qua khảo sát, để đảm bảo được độ chọn lọc, peak cân đối, chúng tôi chọn biên độ xung 50mV, tốc độ quét 12,5mV/s

2.3.5. Khoảng tuyến tính

Cường độ dòng phụ thuộc vào thời gian tích lũy làm giàu amlodipin besylate trên điện cực than gương. Thời gian tích lũy phụ thuộc vào nồng độ chất được nghiên cứu, với khoảng nồng độ amlodipin besylate $10^{-7}M - 10^{-6}M$, thời gian làm giàu là 120s, với khoảng nồng độ $10^{-8}M$ đến $10^{-7}M$, chọn thời gian làm giàu là 300s. Giới hạn phát hiện LOD là $3S_D/m$ và giới hạn định lượng LOQ là $10S_D/m$, trong đó S_D là độ lệch chuẩn, m là hệ số góc của phương trình hồi quy tuyến tính.

Với khoảng nồng độ $10^{-7}M - 10^{-6}M$, các pic biểu diễn trên hình 6, phương trình hồi quy tuyến tính là $i_p = 6,16 + 4,29 \cdot C_x(10^{-7})$, hệ số tương quan hồi quy $R = 0,998$.

Với khoảng nồng độ $10^{-8}M - 10^{-7}M$, phương trình hồi quy tuyến tính là $i_p = 0,65 + 0,93 C_x(10^{-8})$, hệ số tương quan hồi quy 0,997, độ lệch chuẩn S_D là 0,237. Từ phương trình này xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp LOD là $7,6 \cdot 10^{-9}M$, giới hạn định lượng LOQ là $2,5 \cdot 10^{-8}M$.



Hình 6. Khoảng tuyến tính của amlodipin $10^{-7}M - 10^{-6}M$.

Độ chính xác của phương pháp được xác định bằng cách đo 6 dung dịch có nồng độ 10^{-7} M, giá trị cường độ dòng trung bình là 9,07 nA với các giá trị cường độ dòng trong khoảng 8,9 nA - 9,19 nA. Độ lệch chuẩn là 0,956, độ lệch chuẩn tương đối 10,5%.

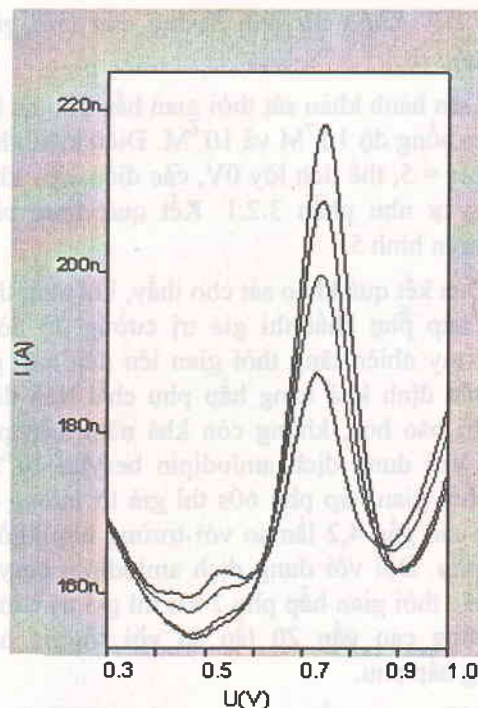
Để đánh giá độ lặp lại, đo lặp lại 6 lần hai dung dịch có nồng độ 10^{-6} M và 10^{-7} M, các giá trị trung bình tương ứng là 48,03 nA và 9,18 nA với độ lệch chuẩn tương đối tương ứng là 1,4% và 9,1%.

2.4. Xác định amlodipin besylat trong mẫu thuốc

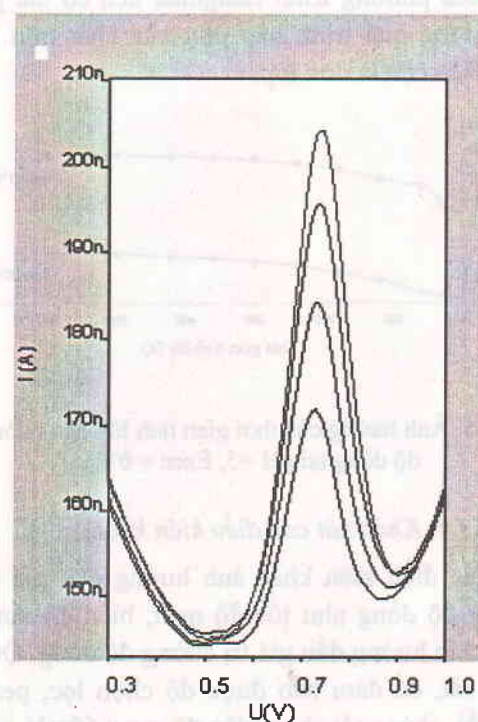
Thuốc có hoạt chất amlodipin besylat hàm lượng 5mg dạng bột trong bao con nhộng.

Quy trình xác định: Lấy hoàn toàn lượng bột trong 10 viên bao ra cho vào cốc, hòa tan lượng thuốc đó trong khoảng 100ml etanol: nước (1:1), khuấy đều và siêu âm 10 phút. Sau đó chuyển toàn bộ hỗn hợp dung dịch đó vào bình định mức 250 ml, định mức bằng nước cất đến vạch. Lắc đều dung dịch, sau đó lọc qua giấy lọc Whatman $0,45\mu\text{m}$. Lấy chính xác 2,5ml dung dịch sau lọc, định mức thành 25ml bằng nước cất, sau đó lấy 1ml dung dịch pha loãng đó thêm dung dịch đệm, định mức 50ml cho vào bình cực phổ và tiến hành đo.

Điều kiện đo: Thế hấp phụ 0V, thời gian hấp phụ 60s, khoảng quét thế từ +0,3V đến +1,0V, biên độ xung 50mV, tốc độ quét 12,5mV/s. Xác định hàm lượng amlodipin trong mẫu thuốc bằng phương pháp thêm chuẩn. Các pic mẫu và thêm chuẩn được biểu diễn trên hình 7 và hình 8. Kết quả được trình bày trong bảng 1.



Hình 7. Mẫu Amlodipin Ấn Độ.



Hình 8. Mẫu Amlodipin Việt Nam.

Bảng 1. Hàm lượng amlodipin besylate trong mẫu thuốc

| Loại thuốc | Hàm lượng amlodipin ghi trên nhãn (mg) | Hàm lượng amlodipin xác định được (mg) | Hiệu suất thu hồi (%) | Độ lệch chuẩn tương đối (%) |
|--------------------------|--|--|-----------------------|-----------------------------|
| Amlodipin stada Việt Nam | 5,0 | 5,11 | 102,2 | 1,4 |
| Amlocard Ấn Độ | 5,0 | 5,09 | 101,8 | 1,7 |

Kết quả xác định hàm lượng amlodipin trong mẫu thuốc là đáng tin cậy, độ lệch chuẩn tương đối nhỏ, hiệu suất thu hồi đạt tiêu chuẩn, đáp ứng được yêu cầu của một phương pháp phân tích

Kết luận

- Quá trình oxy hóa amlodipin besylate trên bề mặt điện cực than gương là bất thuận nghịch, chỉ xảy ra quá trình oxy hóa hai electron của vòng 1,4 dihydropyridine thành dẫn xuất pyridin, quá trình có đặc trưng hấp phụ.

- Tối ưu hóa các điều kiện xác định amlodipin besylate trên điện cực than gương như pH, thế hấp phụ, thời gian hấp phụ, biên độ xung, tốc độ quét, tốc độ khuấy dung dịch.

- Xây dựng khoảng tuyến tính $10^{-7}M - 10^{-6}M$ và $10^{-8}M - 10^{-7}M$, xác định được giới hạn phát hiện LOD là $7,6 \cdot 10^{-9}M$, giới hạn định lượng LOQ là $2,5 \cdot 10^{-8}M$.

- Xác định hàm lượng Amlodipin besylat trong hai mẫu thuốc amlodipin stada của Việt nam liên doanh với Đức và Amlocard Ấn Độ, hiệu suất thu hồi là 102,2% và 101,8%, độ lệch chuẩn tương đối là 1,4% và 1,7% tương ứng.

Phương pháp von-ampe hòa tan hấp phụ xung vi phân xác định amlodipin besylat trên điện cực than gương là phương pháp có độ nhạy, độ chọn lọc và độ chính xác cao. Vì vậy, chúng tôi đã ứng dụng thành công để xác định hoạt chất đó trong các mẫu thuốc.

Tài liệu tham khảo

- [1] Pfizer Ireland Pharmaceuticals, Caduet, Lab-0276-14.0, Dublin, Ireland, 2009.
- [2] Kanakapura Basavaiah, Umakanthappa Chandrashekar and Paregowda Nagegowda, Titrimetric and Modified Spectrophotometric Methods for the Determination of Amlodipine Besylate Using Bromate-Bromide Mixture and Two Dyes, *ScienceAsia* 32 (2006) 271
- [3] Hanaa M. Abdel-Wadood, Niveen A. Mohamed, Ashraf M. Mahmoud, Validated spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets, *Spectrochimica Acta Part A* 70 (2008) 564.
- [4] Marcelo Donadel Malesuik, Simone Gonçalves Cardoso, Lisiane, Bajerski, Fibeles Analíne Lanzanova, Determination of Amlodipine in Pharmaceutical Dosage Forms by Liquid Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry, *ISSN 1060-3271*, Vol 89(2006) 359.
- [5] Shah D.A, Bhatt K.K, Shankar M.B, Mehtar R.S, Gandhi T.R, Baldania S.L, RP-HPLC determination of atorvastatin calcium and amlodipine besylate combination in tablets, *Indian journal of pharmaceutical sciences* ISSN 0250-474X, vol. 68, n°6, (2006) 796.
- [6] M. Kazemipoura, M. Ansari, A. Mohammadi, H. Beitollahi, and R. Ahmadi, Use of Adsorptive Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry at Carbon Paste Electrode for the Determination of Amlodipine Besylate in Pharmaceutical Preparations, *SSN 1061-9348, Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 64, No. 1(2009) 65.
- [7] Azza Abdel Kader Gazy, Determination of amlodipine besylate by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets and biological fluids, *Talanta* 62 (2004) 575.

Determination of amlodipine besylate by adsorptive different pulse anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets

Nguyen Thi Kim Thuong¹, Tran Chuong Huyen²

¹*Institute of geological sciences, Vietnamese Academy of Science and Technology*

²*Department of Chemistry, Hanoi University of Science, VNU, 19 Le Thanh Tong, Hanoi, Vietnam*

The adsorptive and electrochemical behavior of amlodipine besylate on a glassy carbon electrode were explored in Britton-Robinson buffer solution by using cyclic and different pulse voltammetry. Cyclic voltammetric studies indicated the oxidation of amlodipine besylate at the electrode surface through a single two-electron irreversible step and fundamentally controlled by adsorption. The solution conditions and instrumental parameters were optimized for the determination of the authentic drug by adsorptive different pulse stripping voltammetry. Amlodipine besylate gave a sensitive adsorptive oxidation peak at 0.698V (versus Ag/AgCl). The oxidation peak was used to determine amlodipine besylate in range 10^{-8} M to 10^{-6} M with a detection of limit of $7.6 \cdot 10^{-9}$ M. The procedure was successfully applied for assay of amlodipine besylate in drugs.