

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG VIÊN NÉN PREDNISOLON BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-PDA

● THẠCH THỊ BÔ PHA - PHAN THỊ YẾN NGỌC - LÂM THỊ THÚY KIỀU

TÓM TẮT:

Phương pháp HPLC- PDA có độ nhạy cao đã được xây dựng thành công để phân tích prednisolon trong viên nén. Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH. Độ chính xác của phương pháp với giá trị RSD không quá 0,26%. Phương pháp đã thẩm định có thể được ứng dụng để định lượng các chế phẩm đơn thành phần prednisolon đang lưu hành trên thị trường.

Từ khóa: sắc ký lỏng hiệu năng cao, viên nén prednisolon, Trường Đại học Trà Vinh.

1. Đặt vấn đề

Corticosteroid là tác nhân trị liệu quan trọng được sử dụng để điều trị các rối loạn dị ứng và viêm nhiễm hoặc để ngăn chặn các hoạt động không mong muốn hoặc không phù hợp của hệ thống miễn dịch. Prednisolon là một glucocorticoid tổng hợp có đặc tính chống viêm và điều hòa miễn dịch được chỉ định trong các trường hợp: viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ toàn thân, một số thể viêm mạch, hen phế quản, thiếu máu tán huyết, giảm bạch cầu hạt và những bệnh dị ứng nặng. Ngày nay, với sự phát triển của khoa học, các phương pháp như quang phổ tử ngoại - khả kiến, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA, điện di mao quản, sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ (LC-MS; LC-MS/MS),... được sử dụng để định lượng prednisolon [1-3, 5-8]. Trong đó phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao là phương pháp được sử dụng khá phổ biến do kỹ thuật phân tích hiện đại, quá trình xử lý mẫu đơn giản, cho độ chính xác và độ nhạy cao. Phương pháp HPLC-PDA với các ưu điểm như hóa chất phổ biến, thời gian phân tích nhanh, tiết kiệm

được hóa chất, hạ giá thành phân tích mẫu và có thể tiến hành đồng loạt nên rất phù hợp với điều kiện nghiên cứu trong nước. Mặt khác, để phát triển một phương pháp đơn giản và chính xác để định lượng prednisolone đề tài: “Xây dựng quy trình định lượng viên nén Prednisolon bằng phương pháp HPLC - PDA” được tiến hành để góp phần đánh giá thực trạng chất lượng dược phẩm chứa prednisolone trên thị trường.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Chất đối chiếu: Prednisolon acetat 99,7%; được cung cấp bởi viện kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh.

Dung môi: nước cất dùng cho HPLC; methanol và acetonitril đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng do Merck cung cấp.

Trang thiết bị: hệ thống sắc ký lỏng (UHPLC) Ultimate 3000 của hãng Thermo Scientific- Mỹ, đầu dò PDA. Cột Phenomenex C8 và C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), cân phân tích, bể siêu âm và các dụng cụ thủy tinh như bình định mức, pipet có độ chính xác phù hợp cho mỗi thử nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa vào đặc tính lý hóa của prednisolon, đặc điểm của mẫu và tham khảo một số tài liệu [1-3, 5-8], kỹ thuật HPLC-PDA đã được lựa chọn để xây dựng quy trình định lượng viên nén prednisolon. Quy trình sau khi được xây dựng đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [4]. Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính và khoảng xác định, độ chính xác và độ đúng.

2.2.1. Chuẩn bị mẫu

- Mẫu trắng: dung môi pha động.
- Dung dịch đối chiếu gốc: prednisolon đối chiếu được hòa tan trong methanol để được dung dịch có nồng độ 500 µg/mL. Từ các dung dịch gốc, pha loãng với methanol để được các dung dịch đối chiếu cho mục đích thẩm định quy trình có nồng độ phù hợp cho mỗi thử nghiệm.

- Dung dịch đối chiếu: Hút chính xác 2mL dung dịch đối chiếu gốc cho vào bình định mức 20mL, thêm pha động đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm. Dung dịch thu được có nồng độ prednisolon 50ppm.

- Mẫu thử: Cân 20 viên, tính khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 5 mg prednisolon vào bình định mức 100 mL, thêm 50 mL methanol

lắc trong 10 phút, thêm nước đến định mức, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

2.2.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký dự kiến: Cột sắc ký: cột Phenomenex C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm); Pha động: MeOH - H₂O (50 : 50); Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; Bước sóng phát hiện: 254 nm; Thể tích tiêm: 10µl; Nhiệt độ cột: 40°C.

Tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách của phương pháp bao gồm: cột sắc ký, pha động, tỷ lệ pha động.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

3.1.1. Cột sắc ký

Tiến hành khảo sát trên cột C8 và C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm). Kết quả được trình bày trong Bảng 1 và Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu đối chiếu và mẫu thử với 2 cột sắc ký khảo sát.

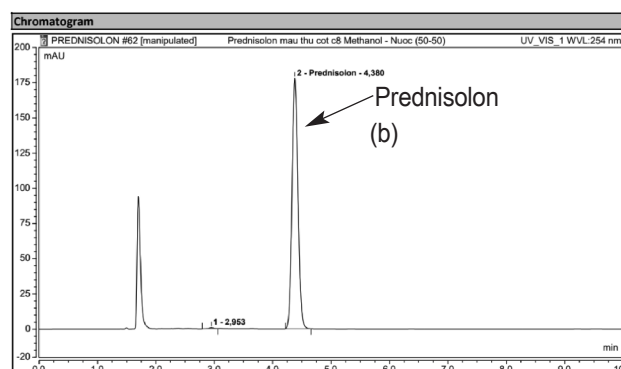
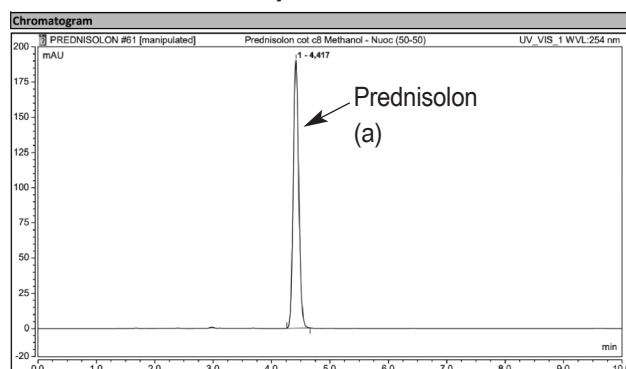
Hình 1 minh họa sắc ký đồ của mẫu đối chiếu và mẫu thử với hai cột khảo sát:

Kết quả khảo sát cho thấy, với cùng hệ dung môi và tỷ lệ pha động thì cột C8 cho thời gian phân tích (t_R) ngắn hơn, hệ số đối xứng của prednisolon phân tích trên cột C8 đối xứng hơn ($A_s = 1,1$) và số đĩa lý thuyết của Prednisolon trên cột C8 cao hơn ($N > 10.000$) so với cột C18 ($t_R = 5,323$; $A_s = 1,3$ và $N = 3.580$). Kết quả chứng minh cột C8 với hệ dung

Bảng 1. Kết quả khảo sát cột sắc ký

Mẫu	Cột	Thời gian (phút)	Hệ số đối xứng (A_s)	Số đĩa lý thuyết (N)
Mẫu đối chiếu	C8	4,417	1,1	10405
	C18	5,323	1,3	3580
Mẫu thử	C8	4,380	1,1	10335
	C18	5,323	1,3	3194

Hình 1: Sắc ký đồ mẫu chất đối chiếu (a) và mẫu thử (b) với cột Phenomenex C8 (100 x 4,6 mm; 5 µm)



môi đang khảo sát phù hợp hơn khi sử dụng để phân tích Prednisolon so với cột C18. Như vậy, cột C8 được chọn để khảo sát các yếu tố về dung môi và tỷ lệ dung môi.

3.1.2. Tỷ lệ dung môi

Từ kết quả khảo sát cột sắc ký và các kết quả khảo sát ban đầu về tỷ lệ dung môi, các hệ dung môi pha động sau đây đã được lựa chọn để khảo sát. Hệ dung môi (1) bao gồm methanol và nước (50:50), hệ dung môi (2) bao gồm methanol và nước (65:35). Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 2 và Hình 2.

Hình 2 minh họa SKĐ của mẫu đối chiếu và mẫu thử với 2 hệ dung môi khảo sát.

Kết quả khảo sát cho thấy, hệ dung môi (1) mặc dù cho thời gian phân tích dài $t_R = 4,417$ nhưng hệ số bất đối $A_s = 1,1$ vẫn nằm trong khoảng $0,8 \leq A_s \leq 1,2$ và khi phân tích trên nền mẫu thử thì prednisolon tách hoàn toàn với tạp có trong nền mẫu với độ phân giải $R_s = 9,2$. Trong khi hệ dung môi (2) cho thời gian phân tích ngắn hơn nhưng trong nền mẫu thử Prednisolon chưa tách hoàn toàn với tạp có trong nền mẫu ($R_s = 1,4$).

Từ kết quả khảo sát, hệ dung môi (1) gồm methanol và nước (50:50) được chọn để tiếp tục khảo sát dung môi pha động.

3.1.3. Dung môi pha động

Hệ dung môi (3) bao gồm methanol và nước (50:50), hệ dung môi (4) bao gồm Acetonitril và nước (50:50). Tiến hành khảo sát dung môi sử dụng để làm pha động, kết quả khảo sát được thể hiện trong Bảng 3 và Hình 3.

Hình 3 minh họa SKĐ của mẫu đối chiếu và mẫu thử với 2 hệ dung môi khảo sát.

Kết quả khảo sát cho thấy, 2 hệ dung môi khảo sát đều cho hệ số bất đối của prednisolon nằm trong khoảng $0,8 \leq A_s \leq 1,2$. Với hệ dung môi (3) ta thấy thời gian lưu (tR) prednisolon dài hơn nhưng khi phân tích trên nền mẫu thử, Prednisolon tách hoàn toàn với tạp có trong nền mẫu $R_s = 9,2$ trong khi hệ dung môi (4) tuy thời gian phân tích ngắn hơn nhưng khi phân tích trong nền mẫu thử prednisolon không tách hoàn toàn khỏi tạp ($R_s = 1,4$). Vì vậy, dung môi methanol được lựa chọn.

Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để phân tích prednisolon như sau: cột Phenomenex C8 (100 x 4,6 mm; 5 μ m); Pha động: MeOH – H₂O (50 : 50); Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; Bước sóng phát hiện: 254 nm; Thể tích tiêm: 10 μ l; Nhiệt độ cột: 40°C.

3.2. Thẩm định quy trình

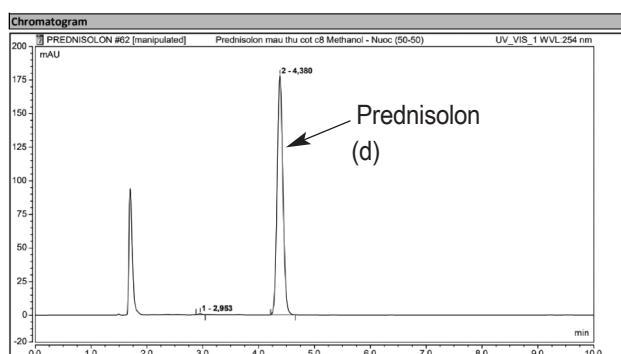
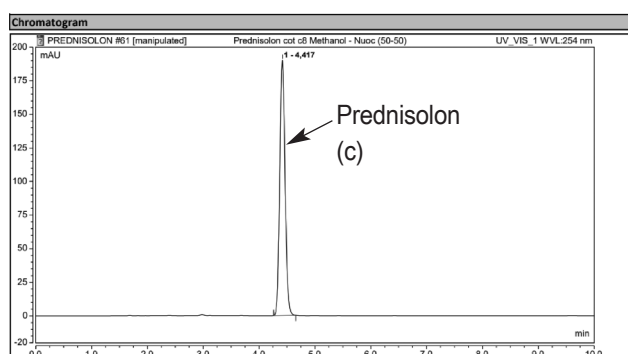
3.2.1. Tính phù hợp của hệ thống

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy, khi phân

Bảng 2. Kết quả khảo sát tỷ lệ dung môi pha động

Mẫu	Hệ dung môi	Thời gian (phút)	Hệ số đối xứng (A_s)	Hệ số phân giải (R_s)
Mẫu đối chiếu	(1)	4,417	1,1	-
	(2)	2,227	1,3	-
Mẫu thử	(1)	4,380	1,1	9,2
	(2)	2,220	1,3	1,4

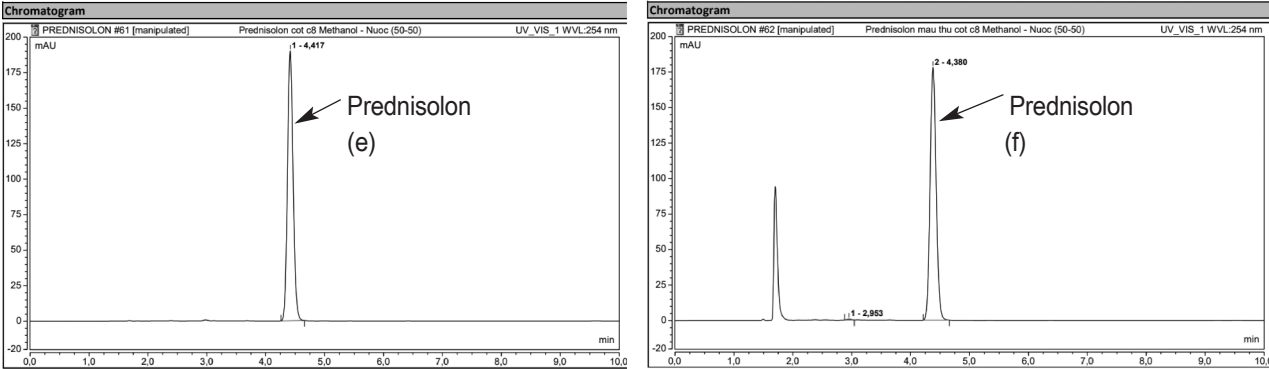
Hình 2: Sắc ký đồ mẫu đối chiếu (c) và mẫu thử (d) với hệ dung môi (1)



Bảng 3. Kết quả khảo sát dung môi pha động

Mẫu	Hệ dung môi	Thời gian (phút)	Hệ số đối xứng (A_s)	Hệ số phân giải (R_s)
Mẫu đối chiếu	(3)	4,417	1,1	-
	(4)	1,867	1,1	-
Mẫu thử	(3)	4,380	1,1	9,2
	(4)	1,860	0,9	1,4

Hình 3: SKĐ mẫu đối chiếu (e), mẫu thử (f) với hệ dung (3)



Bảng 4. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên dung dịch đối chiếu 50 µg/mL (n = 6)

Lần	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU*min)	Hệ số bất đối (A_s)	Số đĩa lý thuyết biểu kiến (N)
1	4,350	19,409	1,2	8546
2	4,357	19,390	1,2	8467
3	4,387	19,304	1,1	8354
4	4,370	19,266	1,2	8417
5	4,377	19,261	1,2	8395
6	4,393	19,274	1,1	8445
Trung bình	4,372	19,317	-	8437
RSD %	0,38	0,34	-	Đạt

tích prednisolon trên cột C8 cho số đĩa lý thuyết biểu kiến $N > 2000$; giá trị RSD% của thời gian lưu và diện tích pic của prednisolon không quá 0,38%. Hệ số bất đối $0,8 \leq A_s \leq 1,2$. Như vậy, quy trình đạt tính phù hợp của hệ thống.

3.2.2. Tính đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy, trong cùng điều kiện phân tích: SKĐ mẫu trắng không xuất hiện pic tại khoảng thời gian lưu tương ứng với prednisolon đối chiếu; SKĐ mẫu thử, mẫu thử thêm chất đối chiếu xuất hiện pic có thời gian lưu tương

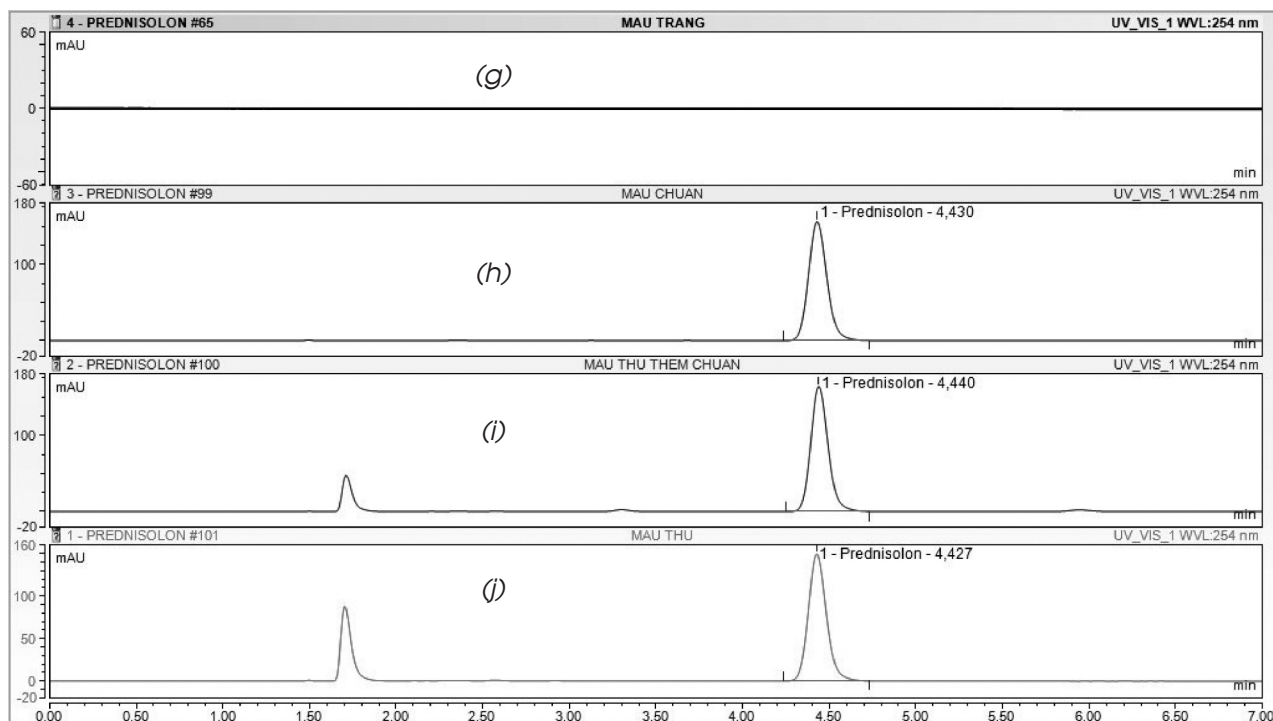
ứng với pic trong dung dịch đối chiếu. Pic của chất phân tích trong SKĐ mẫu thử và mẫu chất đối chiếu tinh khiết, phổ UV - Vis của mẫu thử tương ứng với phổ UV - Vis của mẫu đối chiếu.

Như vậy quy trình có tính đặc hiệu.

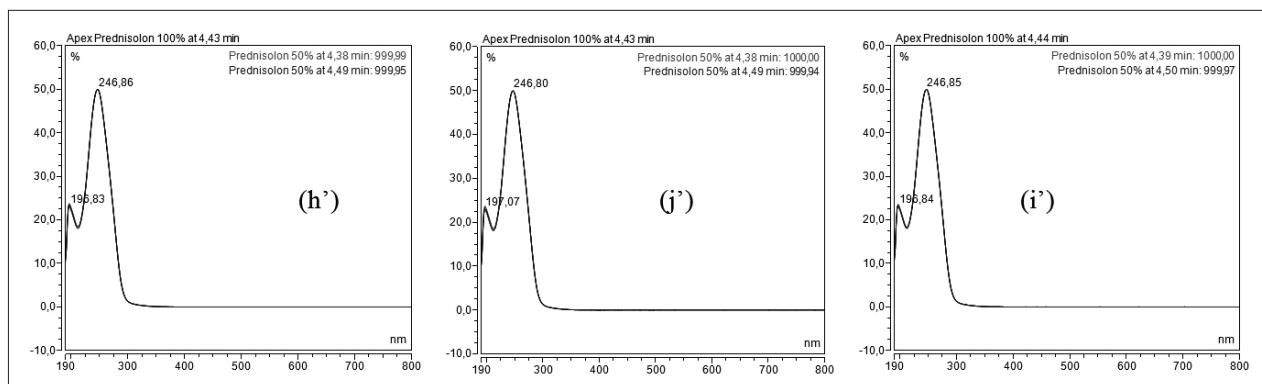
3.2.3. Tính tuyến tính, khoảng xác định, độ chính xác và độ đúng

Tính tuyến tính và khoảng xác định của Prednisolon được khảo sát trên dung dịch đối chiếu, với khoảng nồng độ từ 30-80 µg/mL. Độ chính xác bao gồm độ lặp lại và độ chính xác

Hình 4: SKĐ tính đặc hiệu của mẫu trắng (g); mẫu đối chiếu (h); mẫu thử thêm chất đối chiếu (i) và mẫu thử (j)



Hình 5: Phổ UV - Vis và độ tinh khiết của mẫu đối chiếu (h); mẫu thử (j) và mẫu thử thêm chất đối chiếu (i)



trung gian được tiến hành trên mẫu thử với nồng độ 50 µg/mL, mỗi chỉ tiêu tiến hành với 6 mẫu độc lập. Độ đúng của quy trình được đánh giá trên mẫu thử thêm chất đối chiếu tại 3 mức nồng độ 40 µg/mL; 50 µg/mL và 60 µg/mL, mỗi nồng độ được thực hiện tối thiểu 3 mẫu.

Nhận xét: Quy trình phân tích đạt tính tuyến tính với giá trị $r^2 > 0,9998$. Tỷ lệ thu hồi của prednisolon với nồng độ khảo sát từ 40 - 60 µg/mL nằm trong khoảng 99,3% - 101,7% với giá trị RSD không quá

0,67%. Độ chính xác của phương pháp với giá trị RSD không quá 0,26% nên quy trình có độ chính xác và độ đúng cao [4].

Như vậy, quy trình phân tích prednisolon trong viên nén bằng phương pháp HPLC-PDA đạt yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống, có tính đặc hiệu, khoảng xác định rộng, độ chính xác và độ đúng cao. Quy trình có thể được ứng dụng để định tính và định lượng các viên nén chứa đơn thành phần prednisolon đang lưu hành trên thị trường.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tính tuyến tính, khoảng xác định, độ chính xác, độ đúng

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Độ đúng (n = 3)		Khoảng xác định ($\mu\text{g/mL}$)	Độ chính xác		Phương trình hồi quy	R^2	Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/mL}$)
	Tỷ lệ thu hồi (%)	RSD %		Độ lặp lại ($\text{TB} \pm \text{RSD}\%$)	Độ chính xác trung gian ($\text{TB} \pm \text{RSD}\%$)			
40	99,3 - 100,2	0,61	40 - 60	$99,4 \pm 0,36$	$99,4 \pm 0,12$	$\hat{y} = 0,3747x + 0,6772$	0,9998	30 - 80
50	101,5 - 101,7	0,08						
60	99,8 - 100,5	0,37						

3.3. Bàn luận

Dựa vào cấu trúc và tính chất lý hóa của prednisolon, kỹ thuật sắc ký pha đảo được lựa chọn, khảo sát trên cột Phenomenex C8 và C18 với dung môi pha động được khảo sát là những dung môi phân cực như acetonitril, methanol và nước. Ngoài ra, yếu tố tỷ lệ thành phần pha động cũng được khảo sát trong quá trình thực nghiệm để tìm điều kiện sắc ký thích hợp. Kết quả khảo sát cột sắc ký cho thấy, có thể sử dụng cả 2 loại cột C8 và C18 để phân tích prednisolon, tuy nhiên cột C8 cho thời gian phân tích ngắn hơn, hệ số bất đối tốt hơn so với cột C18.

Tỷ lệ pha động methanol - nước cho thấy khi độ phân cực của pha động càng tăng thì thời gian lưu của các chất phân tích càng tăng, vì vậy với mục đích rút ngắn thời gian phân tích của prednisolon nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát 2 tỷ lệ dung môi, kết quả thời gian phân tích từ trên 4 phút giảm xuống còn khoảng 2 phút (Bảng 2) nhưng khi phân tích trong nền mẫu thử, SKĐ cho thấy prednisolon không tách hoàn toàn với tạp có trong nền mẫu; vì vậy tỷ lệ methanol - nước (50:50) đã được lựa chọn để tiến hành khảo sát loại dung môi. Tiếp tục khảo sát dung môi pha động, acetonitril được lựa chọn để

thay thế cho methanol với mục tiêu thay đổi lực rửa giải của pha động, mặt khác acetonitril là dung môi hữu cơ có độ nhớt thấp làm giảm áp suất cột và hệ thống, giúp tăng tuổi thọ cho cột. Tuy nhiên, khi thay thế bằng acetonitril thì kết quả cho thấy, prednisolon rửa giải rất sớm và trong nền mẫu thử prednisolon chưa tách hoàn toàn với tạp có trong nền mẫu (Hình 5), do đó acetonitril xem như không phù hợp cho quy trình định lượng.

Từ các kết quả khảo sát đã lựa chọn được một quy trình định lượng prednisolon bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA. Nhìn chung, quy trình định lượng có thời gian phân tích ngắn (7 phút), cách tiến hành, quy trình xử lý mẫu tương đối đơn giản. Quy trình đã được thẩm định thành công theo hướng dẫn của ICH với khoảng tuyến tính rộng, độ chính xác và độ đúng cao.

4. Kết luận

Phương pháp HPLC với đầu dò PDA đã được xây dựng thành công để phân tích prednisolon trong viên nén. Quy trình có tính đặc hiệu, tính tuyến tính với khoảng tuyến tính rộng từ 30-80 $\mu\text{g/mL}$, độ chính xác và độ đúng cao. Quy trình có thể được áp dụng vào việc kiểm soát chất lượng các viên nén prednisolon đơn thành phần trên thị trường ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế (2017). *Dược điển Việt Nam* Tập 1. Hà Nội: NXB Y học.
2. Đào Thị Cẩm Minh (2019). *Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng một số glucocorticoid và nsaid trộn lẫn trong chế phẩm đông được, thực phẩm chức năng bằng sắc ký lỏng hai lần khối phổ*. Đề tài nghiên cứu cấp cơ sở, Trường Đại học Y Dược Huế.
3. Đào Văn Đôn, Nguyễn Hồng Hải, Nguyễn Thị Thủy, Nguyễn Thị Thanh Phương (2013). Định lượng đồng thời dexamethason acetat, betamethason và prednisolon bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao để kiểm tra một số chế phẩm đông được, *Tạp chí Y - Dược học Quân sự*, 1, 18 - 25.

4. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [Online] Available at <https://www.fda.gov/media/152208/download>
5. Lưu Nguyễn Anh Thư, Dương Xuân Chữ, Nguyễn Thị Ngọc Vân, Nguyễn Thị Thu Trâm (2020). Nghiên cứu xây dựng quy trình định tính và định lượng đồng thời năm glucocorticoid trong kem bôi da bằng phương pháp HPLC-PDA. *Tạp chí Dược học*, 59, 61-65.
6. Nguyễn Thị Xuyên; Hoàng Việt Dũng; Hoàng Mỹ Hạnh, Đào Văn Đôn; Nguyễn Thị Thanh Phương (2013). Định lượng đồng thời dexamethason acetat, betamethason, prednisolon và triamcinolon trong mỹ phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y - Dược học Quân sự*, 6, 1-9.
7. Nguyễn Thị Xuyên, Hoàng Việt Dũng, Hoàng Mỹ Hạnh, Đào Văn Đôn, Nguyễn Thị Thanh Phương (2013). Định lượng đồng thời dexamethason acetat, betamethason, prednisolon và triamcinolon trong mỹ phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y - Dược học Quân sự*, 6, 1-9.
8. Ghosh, Somsubhra, et al (2011). Development and validation for prednisolone in tablet dosage form by reverse phase-HPLC. *Asian Journal of Chemistry*, 23(11), 5092- 5094.

Ngày nhận bài: 20/2/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 15/3/2023

Ngày chấp nhận đăng bài: 4/4/2023

Thông tin tác giả:

1. THẠCH THỊ BÔ PHA

2. PHAN THỊ YẾN NGỌC

3. LÂM THỊ THÚY KIỀU

Khoa Y - Dược, Trường Đại học Trà Vinh

DEVELOPING A PROCESS FOR DOSING PREDNISOLONE TABLETS BY USING THE HPLC-PDA METHOD

● **THACH THI BO PHA¹**

● **PHAN THI YEN NGOC¹**

● **LAM THI THUY KIEU¹**

¹ Faculty of Medicine - Pharmacy, Tra Vinh University

ABSTRACT:

In this study, a highly sensitive HPLC-PDA method was successfully developed for the analysis of prednisolone in tablets. This method was validated according to the guidance of ICH. The precision of this method with the RSD value is less than 0.26 percent. The validated method can be applied for the determination of the prednisolone single-component preparations which are currently distributed on the market.

Keywords: high performance liquid chromatography, prednisolone tablets, Tra Vinh University.