

Xác định hàm lượng Betamethason trong thuốc mỡ bôi da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Nguyễn Thị Thu Thảo

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
nguyentthao@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu ứng dụng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng hoạt chất Betamethason trong kem mỡ bôi da. Kết quả nghiên cứu đạt được tối ưu điều kiện sắc kí với tốc độ dòng 1,5 ml/phút, làm giảm thời gian chạy mẫu, sắc kí đồ của peak đáp ứng hệ số đối xứng và tối ưu qui trình xử lí mẫu với nền mẫu có hàm lượng béo cao, nên kết hợp kĩ thuật chiết siêu âm và làm lạnh làm, tỉ lệ hiệu suất thu hồi tăng từ 62,27% đến 99,66%. Việc xác định thực hiện trên cột sắc kí pha đảo RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), thành phần pha động gồm đệm pH=7.0 và methanol theo tỉ lệ (30:70; v/v). Dung dịch mẫu sau khi rửa giải được phát hiện ở bước sóng 240 nm. Khoảng tuyến tính của Betamethason 4,01 - 16,05 μ g/ml với $r^2=0,9991$. Độ lặp lại, hàm lượng và độ lệch chuẩn tương đối của mẫu theo thứ tự 99,73% \pm 1,41%. Độ đúng của phương pháp trong khoảng 99,05 \div 100,91% và %RSD = 0,77.

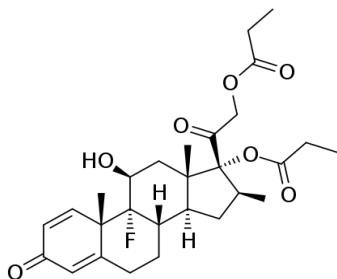
Nhận 14.06.2020
Được duyệt 26.05.2020
Công bố 29.06.2020

Từ khóa
định lượng
Betamethason,
thuốc mỡ bôi da,
phương pháp HPLC

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Betamethason dipropionat là một glucocorticoid có công dụng chống viêm, chống thấp khớp và chống dị ứng rất hiệu quả. Ở liều cao, thuốc còn có thể ức chế miễn dịch. Sử dụng Betamethason dipropionat đúng cách giúp giảm nhanh các triệu chứng của một số bệnh về cơ xương, da và mắt như viêm khớp dạng thấp, vẩy nến, viêm loét giác mạc. Thuốc có thể uống qua đường miệng, tiêm vào cơ bắp, hoặc bôi dưới dạng kem [1]. Betamethason dipropionat (tên hóa học 9-fluoro-11 β -hydroxy-16 β -methyl-3,20-dioxopregna-1,4-dien-17,21-diyli dipropionat), công thức thực nghiệm $C_{28}H_{37}FO_7$ và khối lượng phân tử 504,6 $g \cdot mol^{-1}$. Betamethason dipropionat là bột kết tinh trắng hoặc gần như trắng, thực tế không tan trong nước, dễ tan trong acetone và trong methylen clorid.



Hình 1 Công thức cấu tạo của Betamethason dipropionat

Một số công bố dùng phương pháp sắc kí và quang phổ phân tích Betamethason dipropionat thường xác định đồng thời hai hợp chất trở lên [2,3,4]. Ưu điểm của phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) là nhanh, chính xác, độ tin cậy cao. Nghiên cứu này thực hiện xác định riêng phần Betamethason dipropionat trong thuốc mỡ bôi da bằng phương pháp HPLC.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

Dung môi: Acetonitrile, methanol, dung dịch ammoniac 25%, amoni dihydrophosphat (tất cả dung môi trên đều là Merck), nước cất. Chất chuẩn Betamethason dipropionat, hàm lượng nguyên trạng là 98,27% (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương).

Thiết bị

Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao (Hitachi), cân phân tích Shimadzu với độ chính xác 0,0001 g. Bộ lọc rút chân không của hãng Agilent. Bể siêu âm (Shimadzu). Cột sắc kí RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), 5 μ m.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện tối ưu cho hệ thống sắc kí HPLC

2.2.1.1 Khảo sát tốc độ dòng của điều kiện sắc kí

Tốc độ dòng pha động là một yếu tố quan trọng trong quá trình sắc kí vì nó ảnh hưởng đến quá trình thiết lập cân bằng

của chất phân tích giữa pha tĩnh và pha động. Tốc độ dòng quá nhỏ sẽ gây ra hiện tượng doãng peak, thời gian rửa giải lâu hơn. Tuy nhiên nếu tốc độ dòng quá lớn có thể làm cho các chất trong hỗn hợp không tách khỏi nhau hoàn toàn, nghĩa là gây ra hiện tượng chồng chéo peak lên nhau [5]. Vì vậy, cần phải khảo sát để tìm ra tốc độ dòng phù hợp với các điều kiện sắc kí. Giá trị khảo sát tốc độ dòng gồm 1,0; 1,2; 1,3; 1,5 ml/phút.

Dung dịch chuẩn gốc Betamethason: Cân chính xác một lượng chuẩn Betamethason dipropionat tương ứng với 20 mg Betamethason vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Hút chính xác 5 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch tới bằng ethanol 96%. Dung dịch chuẩn Betamethason có nồng độ khoảng 0,01 mg/ml.

Dung dịch đệm pH = 7.0: Hòa tan 2g amoni dihydrophosphat trong 300 ml nước, dùng dung dịch ammoniac 25% điều chỉnh về pH = 7.0 ± 0.05.

Bảng 1 Các điều kiện sắc kí cố định

Cột sắc kí	Cột RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Nhiệt độ lò cột	40 ⁰ C
Thể tích tiêm	20 µl
Bước sóng phát hiện	240 nm
Dung dịch chuẩn	Nồng độ 0,01 mg.ml ⁻¹
Pha động	Methanol: dung dịch đệm pH = 7.0 theo tỉ lệ (70:30; v/v)

2.2.1.2 Khảo sát qui trình xử lí mẫu

Qui trình xử lí mẫu dùng phương pháp chiết siêu âm. Phương pháp này nhờ vào năng lượng sóng siêu âm để chiết hợp chất chất phân tích ra khỏi nền mẫu thử [6]. Trong kem mỡ bôi da, thành phần gồm Betamethason dipropionate, acid salicylic, cetyl alcohol, glycerin monostearat, sáp ong, mỡ trăn...) nên chứa hàm lượng béo cao. Đồng thời, hoạt chất Betamethason dipropionat có trong mẫu thử là hợp chất có độ phân cực yếu (logP = 4.07) [7]. Vì vậy, nếu hàm lượng béo không được loại bỏ trong qui trình xử lí mẫu sẽ chiết đồng thời cùng chất phân tích. Từ đó, sẽ ảnh hưởng đến hiệu suất thu hồi của phương pháp xử lí mẫu trong qui trình phân tích. Một trong những cách loại béo là mẫu sau khi được chiết siêu âm, đem đặt mẫu vào trong bể nhiệt độ thấp khoảng 10⁰C để chuyển chất béo thành dạng rắn (đông tụ). Sau đó, tiến hành lọc để loại bỏ phần chất béo [8,9].

Dung dịch chuẩn Betamethason có nồng độ 200 µg./ml: Cân chính xác một lượng chuẩn Betamethason dipropionat tương ứng với 20 mg Betamethason vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%.

Chuẩn bị mẫu placebo: chuẩn bị mẫu giả dược, thành phần tương tự một tuýp kem nhưng không có hoạt chất Betamethason. Cân chính xác một lượng kem (giả dược) tương ứng khoảng 1 mg Betamethason (khoảng 2,000 g mẫu placebo) vào cốc 100 ml. (lưu ý: 1 tuýp kem có khối lượng 10 g, trong đó Betamethason 5mg, phần còn lại là tá dược).

Phương pháp chiết siêu âm: Lấy chính xác 5 ml dung dịch chuẩn có nồng độ 200 µg./ml vào cốc 100 ml đã chứa sẵn khoảng 2,000 g mẫu trắng (placebo), thêm 70 ml ethanol 96% vào cốc 100 ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50⁰C) trong 30 phút, thỉnh thoảng lắc đều. Lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%, lọc dung dịch qua màng lọc 0,45 µm [10].

Kết hợp chiết siêu âm và làm lạnh: Lấy chính xác 5 ml dung dịch chuẩn có nồng độ 200 µg.ml⁻¹ vào cốc 100 ml đã chứa sẵn khoảng 2,000 g mẫu trắng (placebo), thêm 70 ml ethanol 96% vào cốc 100 ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50⁰C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần. Lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Dung dịch cho ra cốc và làm lạnh trong nước đá, duy trì nhiệt độ khoảng 10⁰C trong 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch này qua màng lọc 0,45 µm. Các dung dịch mẫu tiêm vào hệ thống máy HPLC.

2.2.2 Xây dựng phương pháp định lượng

Một phương pháp định lượng HPLC muốn đưa vào sử dụng chính thức như một qui trình phân tích trong sản xuất dược phẩm thì cần phải được thẩm định phương pháp đó phù hợp với đối tượng mẫu và điều kiện phòng thí nghiệm. Qui trình thẩm định phương pháp phân tích gồm tính tương thích của hệ thống sắc kí, tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng [11,12].

2.2.2.1 Tính tương thích của hệ thống sắc kí

Dung dịch chuẩn Betamethason: Cân 25,8 mg chuẩn Betamethason dipropionat vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Tiếp tục, lấy chính xác 5,0 ml dung dịch chuẩn này vào bình định mức 100 ml và định mức tới vạch bằng ethanol 96%.

Yêu cầu đạt được gồm số đĩa lí thuyết lớn hơn 1500, hệ số kéo đuôi của peak Betamethason không lớn hơn 2,0, %RSD trong các lần tiêm lặp lại không quá 2,0%.

2.2.2.2 Tính tuyến tính

Mục đích khảo sát là tìm khoảng làm việc tuyến tính của chất phân tích có độ tin cậy cao đối với qui trình phân tích. Thực hiện trên dãy mẫu chuẩn có nồng độ khác nhau 50%, 80%, 100%, 120% và 150% (so với nồng độ lí thuyết) của Betamethason để xác định khoảng nồng độ tuyến tính.

Dung dịch chuẩn gốc Betamethason: Cân chính xác một lượng chuẩn Betamethason dipropionat tương ứng với 20 mg Betamethason vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Dung dịch chuẩn gốc Betamethason có nồng độ 200 µg/ml.

Bảng 2 Dãy pha các dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ 50%, 80%, 100%, 120% và 150%

Bình	1	2	3	4	5
Tỉ lệ (%)	50	80	100	120	150
V _{chuẩn} (ml)	2	4	5	6	8
Bình định mức (ml)	100	100	100	100	100
Nồng độ (µg/ml)	4	8	10	12	16

Tiến hành tiêm các dung dịch mẫu vào hệ thống máy HPLC: 3 mũi tiêm/mẫu, tính giá trị trung bình diện tích peak của 3 mũi tiêm. Xây dựng đường chuẩn $y=ax + b$ dựa vào phần mềm Excel với trục [x] biểu thị nồng độ Betamethason và trục [y] là diện tích peak trung bình của mỗi mẫu chuẩn. Xác định hệ số tương quan (r). Khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích peak) và x (nồng độ), kết quả cho thấy hệ số tương quan $r=...$ Yêu cầu $r^2 \geq 0,99$.

2.2.2.3 Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu hay tính chọn lọc của một qui trình phân tích là khả năng cho phép xác định chính xác và đặc hiệu chất cần phân tích mà không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của chất khác (tạp chất, sản phẩm phân hủy,...) có trong mẫu thử.

Để đảm bảo tính đặc hiệu của mẫu thử, cần khẳng định bằng kết quả dương tính với mẫu thử bằng cách so sánh thời gian lưu của chất chuẩn so với chất phân tích (mẫu thử) và kết quả âm tính đối với mẫu không có chất thử.

Chuẩn bị pha dung dịch chuẩn Betamethason có nồng độ khoảng 0,01 mg/ml.

Tiến hành pha 6 mẫu chứa thành phần tá dược (placebo): Trộn đều mẫu kem gồm 10 tuýp, cân chính xác một lượng kem tương ứng khoảng 1 mg Betamethason (khoảng 2,000 g mẫu placebo) vào cốc 100 ml, thêm khoảng 70 ml ethanol 96% vào cốc 100 ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50°C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần, lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Sau đó, đổ dung dịch ra cốc và làm lạnh trong nước đá 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch này qua màng lọc 0,45 µm.

Tiến hành pha 6 mẫu thử: Trộn đều mẫu kem gồm 10 tuýp, cân chính xác một lượng kem tương ứng khoảng 1 mg Betamethason vào cốc 100 ml, thêm khoảng 70 ml ethanol 96% vào cốc 100 ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50°C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần, lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Đổ dung dịch ra cốc và làm lạnh trong nước đá 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch

này qua màng lọc 0,45 µm. Tiêm riêng biệt 20 µl mỗi dung dịch trên vào hệ thống sắc kí. Ghi nhận các sắc kí đồ.

Yêu cầu đạt được: phương pháp có tính chọn lọc khi sắc kí đồ HPLC của dung dịch mẫu placebo, không có peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chuẩn Betamethason dipropionat trong dung dịch mẫu chuẩn. Sắc kí đồ HPLC của hỗn hợp mẫu placebo và chuẩn Betamethason, có 1 peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak Betamethason trong dung dịch mẫu chuẩn Betamethason. Sắc kí đồ HPLC của dung dịch mẫu thử, có 1 peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak Betamethason trong dung dịch mẫu chuẩn.

2.2.2.4 Độ lặp lại

Tiến hành pha 6 dung dịch mẫu thử và tiêm vào hệ thống HPLC (theo qui trình định lượng) để xác định hàm lượng Betamethason trong mẫu thử của tuýp kem bôi da.

Yêu cầu về hàm lượng hoạt chất khoảng 90% ÷ 110%. Độ lệch chuẩn tương đối hàm lượng hoạt chất không quá 2% và hệ số này càng nhỏ thì qui trình định lượng càng chính xác.

$$\text{Giá trị trung bình: } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{6}$$

Độ lệch chuẩn (Standard Deviation):

$$SD = S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{5}}$$

Độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation) hay hệ số phân tán (Coefficient of Variation):

$$RSD = CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

Hàm lượng % Dexamethason trong chế phẩm so với hàm lượng ghi trên nhãn, tính theo công thức:

$$\%HL = \frac{S_T}{S_C} \times m_C \times \frac{P}{100} \times \frac{\text{ĐPL}_T}{\text{ĐPL}_C} \times \frac{m_{TB}}{m_T} \times \frac{100}{HLN} \\ \times \frac{392,462}{504,6}$$

Trong đó:

S_C, S_T : diện tích đỉnh của mẫu chuẩn, thử.

m_{TB} : khối lượng trung bình của 10 tuýp kem, mỗi tuýp có khối lượng khoảng 10 (g).

m_C, m_T : khối lượng cân của mẫu chuẩn, thử (mg).

P: % hàm lượng của Dexamethason dipropionat chuẩn

$\text{ĐPL}_C, \text{ĐPL}_T$: độ pha loãng lần lượt của mẫu chuẩn, thử.

392,462: khối lượng phân tử của Dexamethason (g/mol).

504,6: khối lượng phân tử của Dexamethason dipropionat (g/mol).

HLN: hàm lượng nhãn của Dexamethason trong tuýp là 5 (mg).

2.2.2.5 Độ đúng

Thêm dung dịch chuẩn vào mẫu placebo và xác định lại nồng độ của chất chuẩn có trong mẫu.



Thực hiện trên 3 nồng độ Betamethason dipropionat là 80%, 100% và 120% (so với nồng độ lí thuyết). Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu tương tự.

Độ đúng 80%: Cân chính xác một lượng chuẩn Betamethason dipropionat tương ứng với 20 mg Betamethason vào bình định mức 100ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Hút chính xác 4 ml dung dịch chuẩn này vào cốc 100ml đã chứa sẵn khoảng 2,000 g mẫu placebo, thêm 70 ml ethanol 96% vào cốc 100 ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50⁰C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần. Lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Sau đó, đổ dung dịch ra cốc và làm lạnh trong nước đá 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch này qua màng lọc 0,45 μm. Tiến hành 3 mẫu theo cùng cách.

Độ đúng 100%: Cân chính xác một lượng chuẩn Betamethason dipropionat tương ứng với 20 mg Betamethason vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Hút chính xác 5 ml dung dịch này vào cốc 100 ml đã chứa sẵn khoảng 2,000 g mẫu placebo, thêm 70 ml ethanol 96% vào cốc 100ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50⁰C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần. Lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Đổ dung dịch ra cốc và làm lạnh trong nước đá 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch này qua màng lọc 0,45 μm. Tiến hành 3 mẫu theo cùng cách.

Độ đúng 120%: Cân chính xác một lượng chuẩn Betamethason dipropionat tương ứng với 20 mg Betamethason vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Hút chính xác 6 ml dung dịch này vào cốc 100 ml đã chứa sẵn khoảng 2,000 g mẫu placebo, thêm 70ml ethanol 96% vào cốc 100 ml, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50⁰C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần. Lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Đổ dung dịch ra cốc và làm lạnh trong nước đá 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch này qua màng lọc 0,45 μm. Tiến hành 3 mẫu theo cùng cách.

Tính hàm lượng của hoạt chất Betamethason thêm vào ở các nồng độ có độ đúng 80%, 100%, 120% và tính hàm lượng hoạt chất Betamethason tìm thấy ở các nồng độ có độ đúng 80%, 100%, 120%. Từ đó, tính % hiệu suất thu hồi (HSTH) của Betamethason theo công thức:

$$\%HSTH = \frac{m_{TT}}{m_{TV}} \times 100$$

Ghi chú:

m_{TT}: Nồng độ (μg.ml⁻¹) của Betamethason tìm thấy.

m_{TV}: Nồng độ (μg.ml⁻¹) của Betamethason thêm vào.

Yêu cầu % hiệu suất thu hồi phải đạt nằm trong khoảng 98,0% ÷ 102,0%, %RSD độ đúng 9 mẫu (3 nồng độ): ≤ 2,0%

3 Kết quả nghiên cứu

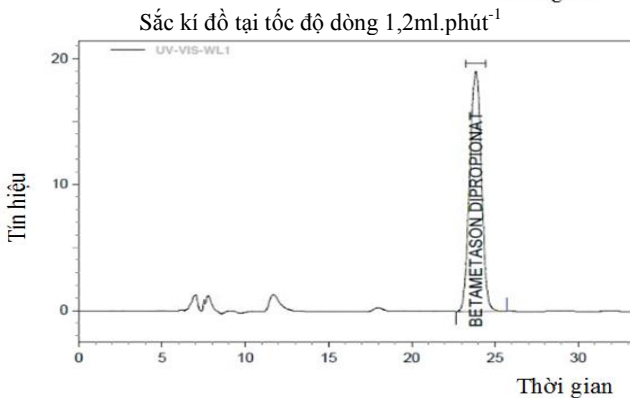
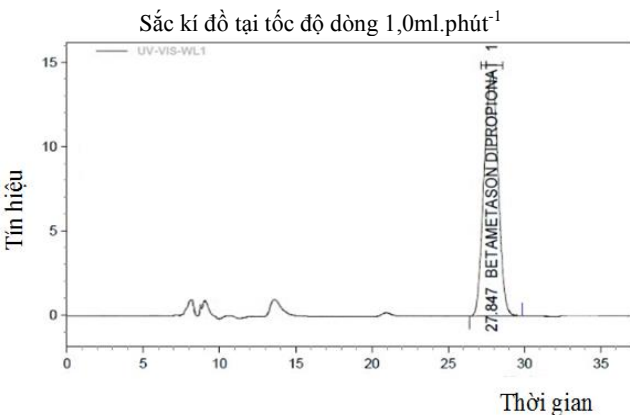
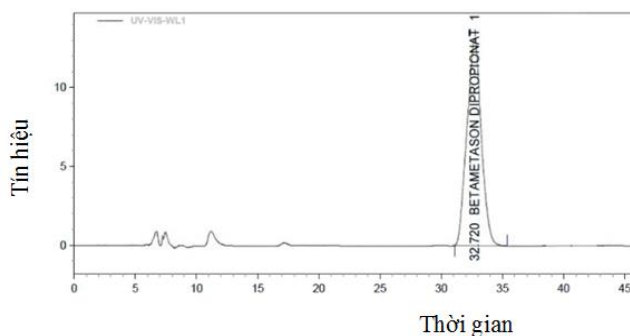
3.1 Khảo sát điều kiện phân tích sắc kí

3.1.1 Khảo sát tốc độ dòng

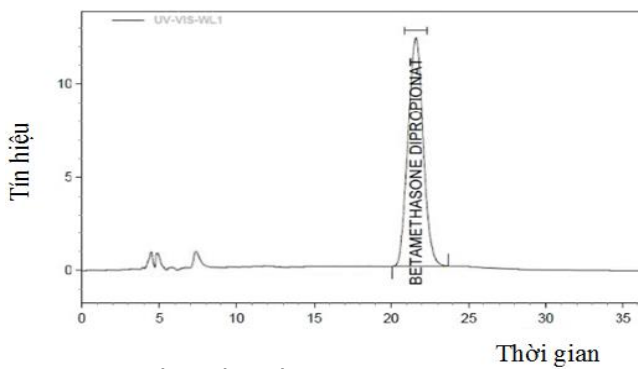
Tiến hành khảo sát theo mục 2.2.1.1. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3 Kết quả khảo sát tốc độ dòng

Tốc độ dòng (ml/phút)	Thời gian lưu (phút)	Hệ số kéo đuôi
1,0	32,72	1,08
1,2	27,85	1,06
1,3	23,86	1,04
1,5	21,04	1,01



Sắc kí đồ tại tốc độ dòng 1,3ml.phút⁻¹



Sắc kí đồ tại tốc độ dòng 1,5 ml/phút¹

Hình 2 Khảo sát tốc độ dòng để tối ưu điều kiện sắc kí

Từ các kết quả sắc kí đồ trong Hình 2 thấy rằng, tốc độ dòng ảnh hưởng lớn đến thời gian lưu và hệ số kéo đuôi. Tốc độ dòng tăng từ 1,0 - 1,5 ml/phút cho thấy thời gian lưu giảm dần, peak rõ và đối xứng, hệ số kéo đuôi giảm dần. Tốc độ dòng lớn sẽ làm hao tổn dung môi nhưng tốc độ quá nhỏ sẽ kéo dài thời gian phân tích và làm doãng peak sắc kí gây ra hiện tượng kéo đuôi. Do đó, chọn tốc độ dòng 1,5 ml/phút để tiến hành định lượng Betamethason có trong mẫu thử.

Các điều kiện tối ưu được đề xuất như sau: Cột RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) thành phần pha động gồm methanol:dung dịch đệm pH = 7.0 theo tỉ lệ (70:30; v/v), tốc độ dòng 1,5 ml/phút, dùng đầu dò UV-Vis phát hiện ở bước sóng λ = 240 nm, thể tích tiêm mẫu 20 μl.

3.1.2 Khảo sát điều kiện xử lý mẫu

Tiến hành khảo sát ở 2 phương pháp chiết siêu âm và kết hợp chiết siêu âm và làm lạnh trong mẫu kem bôi da và cách chuẩn bị các dung dịch được thể hiện ở mục 2.2.1.2.

Bảng 4 Kết quả %HSTH mẫu kem bôi da ở 2 phương pháp

STT	Chiết siêu âm		Chiết siêu âm và làm lạnh	
	m(g)	HSTH (%)	m(g)	HSTH (%)
1	2,0004	60,87	2,0005	99,29
2	2,0007	58,32	2,0008	100,56
3	2,0005	63,50	2,0001	99,34
4	2,0007	66,93	2,0009	98,88
5	2,0001	57,69	2,0006	98,79
6	2,0008	66,32	2,0005	101,12
TB	2,0053	62,27	2,0057	99,66
%RSD	0,013	6,35	0,014	0,96

Nhìn vào kết quả thực nghiệm, giữa hai phương pháp chiết siêu âm và kết hợp siêu âm và làm lạnh hiệu suất thu hồi tăng từ 62,27% lên 99,66%. Đồng thời, so sánh phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của chiết siêu âm có %RSD=6,35% dao động hơn so với chiết kết hợp siêu âm và làm lạnh có %RSD=0,96%. Chứng tỏ nền mẫu ảnh hưởng lớn, làm cho phép phân tích kém tin cậy. Để làm giảm ảnh hưởng của chất béo có thể chiết đồng thời cùng chất

phân tích có trong mẫu kem bôi da, tiến hành làm lạnh mẫu sau khi chiết siêu âm thông qua đánh giá hiệu suất thu hồi.

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc kí

Thẩm định tính tương thích hệ thống là nhằm xác định đảm bảo độ phân giải và độ lặp lại, độ chính xác của hệ thống máy sắc kí đủ độ tin cậy để tiến hành phân tích. Các thử nghiệm được dựa trên các yếu tố về thiết bị, thành phần cấu tạo điện tử, vận hành phân tích và các mẫu đưa vào phân tích tạo thành hệ thống tương thích với nhau. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống khi tiêm lặp 6 lần dung dịch chuẩn Betamethason có nồng độ 0,01 mg/ml vào hệ thống máy sắc kí lỏng và ghi nhận lại hình dạng và kết quả sắc kí đồ.

Bảng 5 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Số đĩa lí thuyết	Hệ số kéo đuôi	Diện tích đỉnh (mAu.s)
1	21,04	2314	1,01	3286289
2	21,05	2309	1,01	3263597
3	21,07	2279	1,00	3236529
4	21,01	2345	1,01	3312528
5	21,06	2302	1,02	3270148
6	21,02	2279	1,01	3280507
TB	21,04	2304.67	1,01	3274933
%RSD	0,1	1,07	0,63	0,77

Thời gian lưu t_R của các đỉnh %RSD = 0,10 (< 2,0%). Kết quả này đạt yêu cầu về thẩm định độ lặp lại. Hệ số kéo đuôi của các đỉnh 1,00 ÷ 1,02 (nằm trong khoảng yêu cầu 0,8 - 1,5), số đĩa lí thuyết $N = 2304$ (> 1500). Như vậy, phương pháp HPLC khảo sát đạt tính tương thích hệ thống.

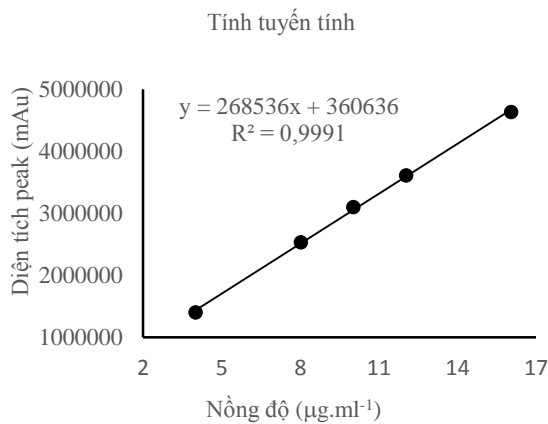
3.2.2 Xác định tính tuyến tính

Dung dịch chuẩn gốc Betamethason: Cân 25,8 mg chuẩn Betamethason dipropionat vào bình định mức 100 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng ethanol 96%.

Để khảo sát tính tuyến tính: tiến hành pha một dãy mẫu chuẩn có nồng độ khác nhau 50%, 80%, 100%, 120% và 150% (so với nồng độ lí thuyết) từ dung dịch chuẩn gốc Betamethason. Vì vậy, dãy chuẩn có nồng độ nằm trong khoảng từ 4,01-16,05 μg/ml. Tiêm vào máy sắc kí lỏng lần lượt các dung dịch chuẩn trên và ghi nhận diện tích peak tương ứng. Xác định độ đáp ứng của đại lượng đo theo từng nồng độ. Thiết lập phương trình hồi qui và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa tín hiệu đáp ứng theo nồng độ.

Bảng 6 Kết quả các dung dịch chuẩn ở các nồng độ khác nhau

Mẫu	$m_{\text{chuẩn}}$ (mg)	Độ pha loãng	Nồng độ chuẩn (μg/ml)	Diện tích đỉnh (mAu.s)
50%	25,80	5000,00	4,01	1401262
80%	25,80	2500,00	8,03	2528912
100%	25,80	2000,00	10,03	3098123
120%	25,80	1666,67	12,04	3612461
150%	25,80	1250,00	16,05	4632167



Hình 3 Đường tuyến tính của Betamethasone

Từ các kết quả thu được, sử dụng phần mềm Excel trong máy tính, tính toán phương trình hồi qui biểu diễn nồng độ theo diện tích đỉnh. Kết quả cho thấy đường biểu diễn là tuyến tính trong khoảng khảo sát theo phương trình $y = 268536x + 360636$ với $r^2 = 0,9991$. Như vậy, qui trình định lượng có tính tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát.

3.2.3 Xác định tính đặc hiệu

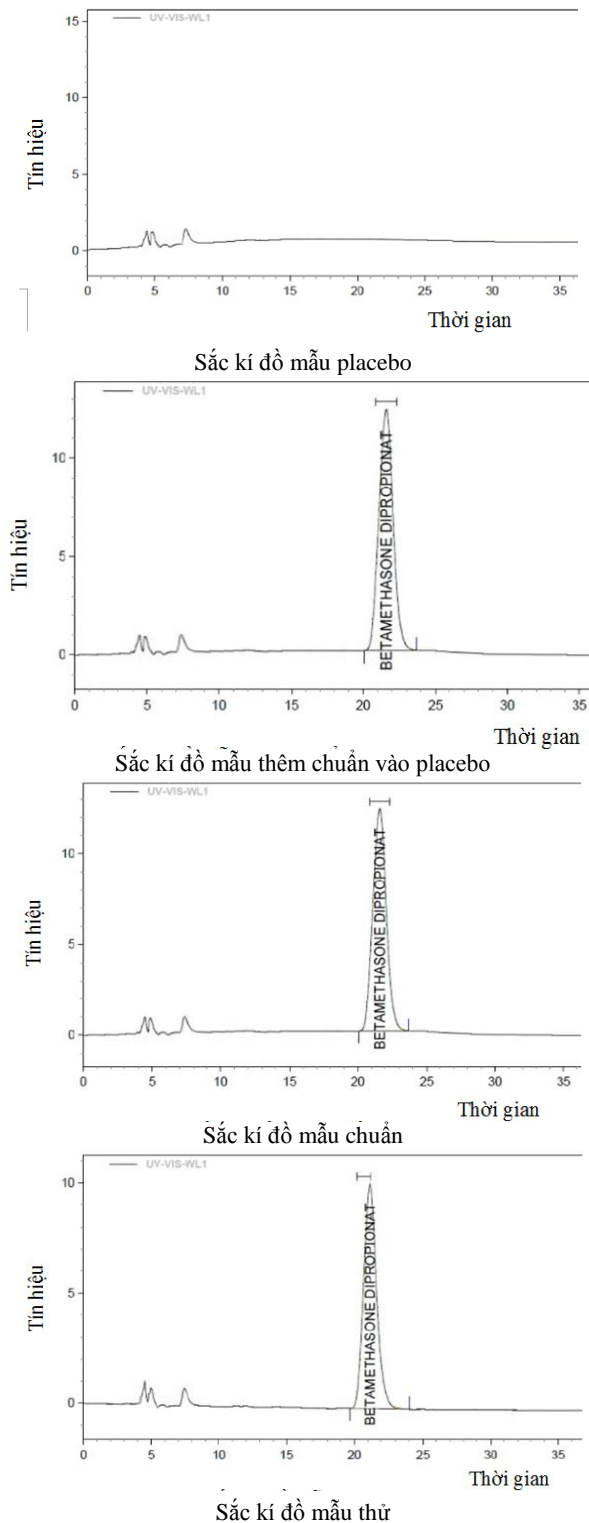
Tiêm vào hệ thống sắc kí các dung dịch với thể tích tiêm 20µl đã chuẩn bị ở mục 2.2.2.3 gồm mẫu placebo, mẫu thêm chuẩn vào placebo, mẫu chuẩn, mẫu thử.

Nhìn vào Hình 4, sắc kí đồ HPLC của dung dịch mẫu placebo (âm tính): Không có peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chuẩn Betamethason dipropionat trong dung dịch mẫu chuẩn.

Sắc kí đồ HPLC thêm chuẩn Betamethason dipropionat vào mẫu placebo: Có 1 peak, có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak Betamethasone dipropionat trong dung dịch mẫu chuẩn Betamethasone dipropionat.

Sắc kí đồ HPLC của dung dịch mẫu thử (dương tính): Có 1 peak, có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak Betamethasone dipropionat trong dung dịch mẫu chuẩn.

Kết quả đã chỉ ra thành phần tá dược (placebo) không ảnh hưởng đến qui trình định lượng. Qui trình định lượng Betamethason dipropionat đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.



Hình 4 Sắc kí đồ minh họa tính đặc hiệu của qui trình định lượng

3.2.4 Độ lặp lại

Độ lặp lại là độ chính xác được khảo sát trong các điều kiện giống nhau (phương pháp, phòng thí nghiệm, người phân tích, dụng cụ).

Dung dịch mẫu thử: Trộn đều mẫu kem gồm 10 tuýp, cân chính xác một lượng kem tương ứng 1 mg Betamethason (khoảng 2,000 g chế phẩm) vào cốc 100 ml, thêm vào cốc 70 ml ethanol 96%, dùng đũa thủy tinh trộn đều và đậy kín. Ngâm cốc trong bể siêu âm (được gia nhiệt 50⁰C) trong 30 phút, cứ 10 phút khuấy một lần. Lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 ml, tráng cốc và định mức tới vạch bằng ethanol 96%. Dung dịch cho ra cốc và làm lạnh trong nước đá, duy trì nhiệt độ khoảng 10⁰C trong 30 phút. Sau đó, lọc dung dịch này qua màng lọc 0,45 µm. Việc xác định độ chính xác được thực hiện định lượng 6 lần với 6 mẫu thử khác nhau. Kết quả như sau:

Bảng 8 Kết quả độ lặp lại của hàm lượng mẫu thử

STT	Lượng cân mẫu (g)	Betamethason	
		Diện tích peak (mAu)	Hàm lượng (%)
1	2,0005	3326032	100,11
2	2,0007	3313352	99,72
3	2,0009	3379894	101,71
4	2,0004	3263558	98,24
5	2,0009	3342141	100,58
6	2,0001	3256044	98,02
%HL trung bình			99,73
%RSD			1,41

Độ lặp lại có hàm lượng hoạt chất Betamethason và độ lệch chuẩn tương đối trong mẫu 99,73% ± 1,41%. Đạt yêu cầu khoảng tin cậy về hàm lượng 90% ÷ 110%. Vậy phương pháp phân tích có độ lặp lại tốt có thể áp dụng để định lượng Betamethason trong nền mẫu thuốc mỡ bôi da.

3.2.5 Thẩm định độ đúng

Độ đúng là mức độ gần sát của giá trị tìm thấy so với giá trị thực, chịu ảnh hưởng của sai số hệ thống và được biểu thị bằng tỉ lệ phục hồi của giá trị tìm thấy của chất chuẩn thêm vào mẫu placebo. Thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn Betamethason dipropionat vào mẫu placebo ở 3 nồng độ khác nhau (nồng độ 80%, 100% và 120%) so với nồng độ lí thuyết), tiến hành xác định lại lượng hoạt chất Betamethason dipropionat có trong mẫu.

Bảng 7 Kết quả độ đúng 80%, 100%, 120%

STT	m _{placebo} (g)	Lượng chuẩn thêm vào (µg.ml ⁻¹)	Diện tích pic (mAu)	Lượng chuẩn tìm lại (µg.ml ⁻¹)	Độ đúng (%)
80 %	2,0001	7,89	2564408	7,86	99,60
	2,0002	7,89	2596894	7,96	100,87

100%	2,0002	7,89	2550049	7,81	99,05
	2,0004	9,86	3193189	9,78	99,22
	2,0005	9,86	3193189	9,90	100,41
	2,0004	9,86	3190747	9,78	99,14
120%	2,0003	11,83	3897003	11,94	100,91
	2,0004	11,83	3829501	11,73	99,16
	2,0004	11,83	3874831	11,87	100,33
Trung bình					99,85
%RSD					0,77

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp định lượng Betamethason có tỉ lệ phục hồi lần lượt là 99,05÷100,91%, %RSD=0,77%≤2,00% đảm bảo tốt cho việc định lượng Betamethason dipropionat trong thuốc mỡ bôi da.

4 Kết luận và đề nghị

Trong nghiên cứu này, một phương pháp HPLC đơn giản, nhạy, có tính chọn lọc và độ tin cậy cao đã được phát triển để xác định hoạt chất Betamethason trong thuốc mỡ bôi da. Với kết quả nghiên cứu đạt được, tối ưu điều kiện sắc kí với tốc độ dòng 1,5 ml/phút giảm thời gian chạy mẫu, sắc kí đồ thu được đáp ứng hệ số đối xứng. Đồng thời, tối ưu qui trình xử lí mẫu với nền mẫu có hàm lượng béo cao nên kết hợp chiết siêu âm và làm lạnh, nên % hiệu suất thu hồi tăng lên đáng kể từ 62,27% lên 99,66% và độ lệch chuẩn tương đối %RSD=0,96 (<2,00%). Các điều kiện sắc kí gồm dùng đầu dò UV-VIS bước sóng phát hiện tại 240 nm, cột sắc kí pha đảo RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), thành phần pha động gồm hỗn hợp dung dịch đệm (pH = 7.0) và methanol theo tỉ lệ (30:70; v:v), tốc độ dòng 1,5 ml/phút, nhiệt độ cột 40⁰C, thể tích tiêm 20 µl. Nghiên cứu trình bày qui trình thẩm định phương pháp phân tích định lượng Betamethason trong thuốc mỡ bôi da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả thực nghiệm thu được đáp ứng các yêu cầu về tính tương thích của hệ thống sắc kí, thời gian lưu (t_R) của các đỉnh có %RSD = 0,10 < 2,0%, hệ số kéo đuôi của các đỉnh A_s = 1,01 < 1,7. Tính đặc hiệu, phương pháp có tính chọn lọc khi trong sắc kí đồ mẫu placebo không cho peak tại vị trí tương ứng với Betamethason trong sắc kí đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn đối chiếu, khoảng tuyến tính 4,01-16,05 µg./ml với r² = 0,9991. Độ chính xác, hàm lượng mẫu trong khoảng 90% ÷ 110%, %RSD = 1,41 < 2,0%. Độ đúng của phương pháp trong khoảng 99,05 ÷ 100,91% và %RSD = 0,77. Kết quả thu được: tính tương thích hệ thống, độ lặp lại, tính tuyến tính, độ đúng, đáp ứng yêu cầu phân tích định lượng, do vậy, có thể dùng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao để xác định hàm lượng Betamethason dipropionat trong thuốc mỡ bôi da.

Tài liệu tham khảo

1. Cerner Multum (2015), *The American Society of Health-System Pharmacists*.
2. Yan-Yan LB, Huai-min ZY (2010), Chinese Hosp Pharm, *Determination of butenafine cream by HPLC*.
3. Dyderski S, Grzeskowiak E, Szalek E, Mrzyglod A (2002), Acta Pol Pharm, *Pharmaceutical availability of betamethasone dipropionate and gentamicin sulfate from cream and ointment*.
4. Stephen E. Johnston, Nicole L. Gill*, Yu-Chien Wei, Robert Markovich, and Abu M. Rustum (2010), Journal of Chromatographic Science, Vol. 48, *Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Assay of Betamethasone Dipropionate, Chlorocresol, and for the Estimation of Betamethasone Dipropionate Related Compounds in a Pharmaceutical Cream and Ointment*.
5. Bộ Y tế (2012), Hóa phân tích, phân tích công cụ tập 2, NXB Y học, tr. 126-129.
6. Z. Mester, R. Sturgeon (2003), Comprehensive Analytical Chemistry, *Sample preparation for trace element analysis*, pp. 353-357.
7. National Institutes of Health (NIH) (2006), National Center for Biotechnology Information, *PubChem Database Betamethason dipropionat*.
8. Mitchell D. Erickson, Lewis (2015), *Analytical Chemistry of PCBs*.
9. Pesticide Analytical Manual: Methods for individual residues (2015), *United States. Food and Drug Administration*, pp 377-378.
10. Hội Đồng Dược Điển (2009), *Dược điển-Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học, tr. 119-143
11. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
12. ICH (International Conference on Harmonization) (2005), *Guidance on validation of analytical procedures: text and methodology*.

The validation of qualitative and quantitative analysis of Betamethasone dipropionat in ointment by High performance liquid chromatography method (HPLC)

Nguyen Thi Thu Thao

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

nguyentthao@ntt.edu.vn

Abstract A simple, rapid, accurate and sensitive method was developed for qualitative and quantitative analysis of Betamethason dipropionat in ointment using high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. Experimental results optimize the chromatographic conditions with a flow rate of 1.5 ml/min thus reducing the running time of the samples, the chromatograms obtained meet the symmetry coefficient. At the same time, optimizing the processing of samples with a high fat sample should combine ultrasound and cooling, as the recovery efficiency increased significantly from 62.27% to 99.66% with relative standard deviation %RSD = 0.96 (< 2%). Chromatography parameters were stainless steel RP - 18 column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m particle size), at 40°C. The isocratic mobile phase was methanol:buffer solution at pH = 7.0 (70:30;...). The determinations were performed using UV-Vis detector set at 240 nm. Samples were prepared with ethanol and the volume injected was 20 μ l. The analytical curve was linear ($r^2 = 0.9991$) with the concentration range of 4.01 - 16.05 μ g/ml. The presence of components of the ointment did not interfere with the results of the analysis. The method showed adequate precision, with a relative standard deviation (%RSD) lower than 2.00%. The correctness of the method is in the range of 99.05 \div 100.91% with %RSD = 0.77.

Keywords Betamethason dipropionat, High performance liquid chromatography (HPLC), ointment