

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG DICLOFENAC DIETHYLAMIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Huỳnh Thị Như Quỳnh, Lê Trung Khoản, Hoàng Thị Thu Huyền,
Hoàng Thuý Bình, Trần Lưu Phúc, Huỳnh Văn Chung*

Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

*Email: hvchung@bmtuvietnam.com

Ngày nhận bài: 3/02/2023; ngày hoàn thành phản biện: 8/02/2023; ngày duyệt đăng: 4/12/2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích xây dựng quy trình định lượng diclofenac diethylamin (DDEA) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò PDA. Quá trình phân tích được thực hiện trên cột sắc ký Reliant C18 5 μ m (4.6x250 mm), sử dụng pha động là hỗn hợp acid formic 0,1% : acetonitril (35 : 65, v/v) với tốc độ dòng là 1,0 ml/ phút và được phát hiện tại bước sóng 276 nm. Quy trình định lượng đã được thẩm định đáp ứng các yêu cầu của hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (ICH) với khoảng tuyến tính 0,2-50 μ g/ml, giới hạn phát hiện (LOD) 0,05 μ g/ml, giới hạn định lượng (LOQ) 0,15 μ g/ml. Phương pháp đạt được độ đúng với độ thu hồi nằm trong khoảng 99,19 – 102, 53 %, độ lặp lại cao với RSD là 0,170 % đối với diện tích peak và 0,279 % đối với thời gian lưu. Nghiên cứu đã sử dụng quy trình trên để kiểm nghiệm 3 loại thuốc gel chứa diclofenac diethylamin đang lưu hành trên thị và kết quả cho thấy cả 3 mẫu thuốc đều có hàm lượng diclofenac diethylamin đạt theo quy định của Dược điển Việt Nam V

Từ khóa: diclofenac diethylamin, gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

1. MỞ ĐẦU

Diclofenac diethylamin là một trong những thuốc giảm đau, hạ sốt, chống viêm không steroid. Diclofenac được sử dụng rộng rãi để điều trị viêm xương khớp, viêm cột sống, chấn thương cơ xương và giảm đau sau phẫu thuật ở người và thú y [1]. Tuy nhiên việc sử dụng thuốc không steroid (NSAIDs) lâu dài bằng đường uống có thể bị hạn chế bởi tác dụng phụ như độc tính với dạ dày, gan, thận và có nguy cơ dẫn tới một số bệnh tim mạch và biến chứng mạch máu não [2].

So với thuốc dạng uống, dạng thuốc dùng ngoài da có một số ưu điểm: hiệu quả giảm đau tương đương nhưng ít gây tác dụng phụ trên dạ dày, cũng như các biến chứng về tim mạch, gan, thận [3]. Thuốc dùng ngoài da được bào chế dưới nhiều dạng khác nhau như dạng thuốc mỡ, kem, thuốc dán,... phổ biến nhất là các dạng thuốc mỡ hoặc kem bôi da. Có hai dạng muối diclofenac thường được sử dụng bào chế các chế phẩm dưới dạng bôi ngoài da là: diclofenac natri và diclofenac diethylamin. Trong đó, diclofenac diethylamin là dạng muối được cho là hấp thu tốt hơn khi dùng ngoài da [4]. Sản phẩm chứa diclofenac diethylamin trên thị trường thường được bào chế dưới dạng emulgel và gel. Hiện nay, Dược điển Việt Nam V chỉ có chuyên luận định lượng diclofenac diethylamin bằng phương pháp chuẩn độ đo điện thế với đối tượng áp dụng là gel mà chưa có phương pháp HPLC [5]. Hơn thế nữa cũng chưa có nhiều công bố về định lượng diclofenac diethylamin trong gel và emulgel bằng phương pháp HPLC. Vì vậy mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng diclofenac dimethylamin bằng phương pháp HPLC nhằm cung cấp dữ liệu cho việc áp dụng quy trình phân tích này tại các cơ sở sản xuất dược phẩm trong nước cũng như góp phần phong phú phương pháp kiểm nghiệm dược phẩm để kiểm soát chất lượng sản phẩm được tốt hơn.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Voltaren Emulgel của nhà sản xuất Novartis Consumer Health S.A – Thụy Sĩ, Diclofenac Stella Gel của Stellapharm – Việt Nam, D – Emulgel của Công ty dược phẩm VCP – Việt Nam

2.2. Hóa chất, dung môi

Chất chuẩn diclofenac diethylamine (99,7% của Sigma-Aldrich), acetonitril (HPLC grade, Fisher), acid formic (LC/MS grade, Fisher), nước cất (Merk), ethanol (96% của Merk grade, Fisher), acid phosphoric (Merk).

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị được sử dụng là hệ thống HPLC Waters e2695 (Hoa kỳ) trang bị bộ bơm cao áp và bộ tiêm mẫu tự động. Đầu dò PDA với khoảng bước sóng từ 190-1100 nm, cột sắc ký Reliant C18 5 μ m (4.6x250 mm).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Điều kiện sắc ký

Qua tham khảo quy trình định lượng theo tài liệu [6-8]; chúng tôi cố định điều kiện sắc ký ban đầu như sau: cột sắc ký Reliant C18 5 μ m (4.6x250 mm), sử dụng dung

môi pha động là hỗn hợp dung môi (50:50, v/v) với tốc độ dòng là 1,0 ml/ phút và được phát hiện tại bước sóng 276 nm. Sau đó tiến hành khảo sát lần lượt từng yếu tố: loại dung môi H_3PO_4 0,1% : acetonitril: (50:50, v/v), H_2O : acetonitril: (50:50, v/v), HCOOH 0,1% : acetonitril: (50:50, v/v); tỷ lệ dung môi (20:80, 35:65, 50:50) và tốc độ dòng (0,6; 1,0; 1,5 ml/phút).

Chuẩn bị mẫu thử

Hòa tan một lượng gel tương ứng 0,01 g DDEA trong 100 ml nước cất, sau đó lấy 1 ml dung dịch trên pha vừa đủ với 10 ml ethanol 96% để thu được dung dịch có nồng độ DDEA 10 $\mu\text{g/ml}$.

Chuẩn bị mẫu chuẩn

Cân chính xác 0,01 g DDEA chuẩn trong 100 ml nước cất để thu được dung dịch để thu được dung dịch có nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$. Sau đó tỉ lệ 0,01 g DDEA chuẩn trong 100 ml nước cất để thu được dung dịch để thu được dung dịch có nồng độ c

Thẩm định quy trình định lượng

Thẩm định quy trình theo ICH [9] gồm: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ đúng của phương pháp HPLC.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát điều kiện sắc ký

Theo các tài liệu [6,7] khi định lượng diclofenac tốc độ dòng lớn và dung môi sử dụng chứa dung dịch đệm sẽ làm cho hệ thống sắc ký chịu áp suất cao và dễ bị ăn mòn, thời gian rửa cột và hệ thống sắc ký dài gây lãng phí dung môi và thời gian. Theo tài liệu số [8] thì thời gian lưu tương đối dài dẫn đến lượng dung môi sử dụng tương đối nhiều. Do vậy chúng tôi tiến hành khảo sát loại dung môi, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng đã trình bày ở mục 2.4 để chọn ra điều kiện sắc ký phù hợp nhất. Kết quả cho thấy:

Dung môi

+ H_3PO_4 0,1% : acetonitril: (50:50, v/v) và H_2O : acetonitril: (50:50, v/v) thời gian lưu của DDEA dài với thời gian lưu tương ứng là 10,5 và 12 phút.

+ HCOOH 0,1% : acetonitril: (50:50, v/v) thời gian lưu tương ứng là 9,5 phút.

Như vậy dung môi sử dụng phù hợp sẽ là HCOOH 0,1% : acetonitril: (50:50, v/v)

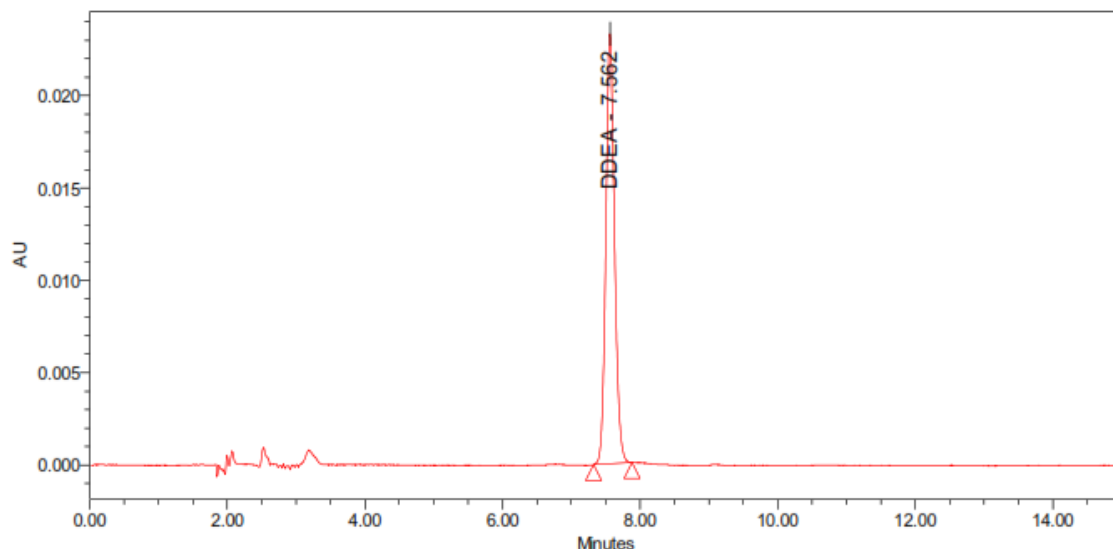
Tỷ lệ dung môi

- + Với tỉ lệ dung môi 50:50 thời gian lưu 9,5 phút, peak cân đối
- + Với tỉ lệ dung môi 35:65 thời gian lưu 7,5 phút, peak cân đối
- + Với tỉ lệ dung môi 20:80 thời gian lưu ngắn nhất 5 phút tuy nhiên tại tỉ lệ này peak không cân đối

Vì vậy tỉ lệ dung môi 35:65 được chọn cho các khảo sát tiếp theo

Tốc độ dòng: tại tốc độ dòng 0,6 ml/ phút áp suất cột nhỏ nhất tuy nhiên thời gian lưu lớn nhất; với tốc độ dòng 1,5 ml/phút thì thời gian lưu ngắn nhất nhưng áp suất cột quá cao; tại tốc độ dòng 1,0 ml/phút thời gian lưu có dài hơn so với 1,5 ml/phút nhưng áp suất lại không cao. Do vậy, tốc độ dòng 1,0 ml/phút được chọn.

Do vậy điều kiện sắc ký được chọn như sau: cột sắc ký Reliant C18 5 μ m (4.6x250 mm), sử dụng dung môi pha động là hỗn hợp acid formic 0,1% : acetonitril (35:65,v/v) với tốc độ dòng là 1,0 ml/ phút và được phát hiện tại bước sóng 276 nm.



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu thử ở điều kiện sắc ký đã chọn

3.2 Thẩm định quy trình định lượng

Tính tương thích hệ thống

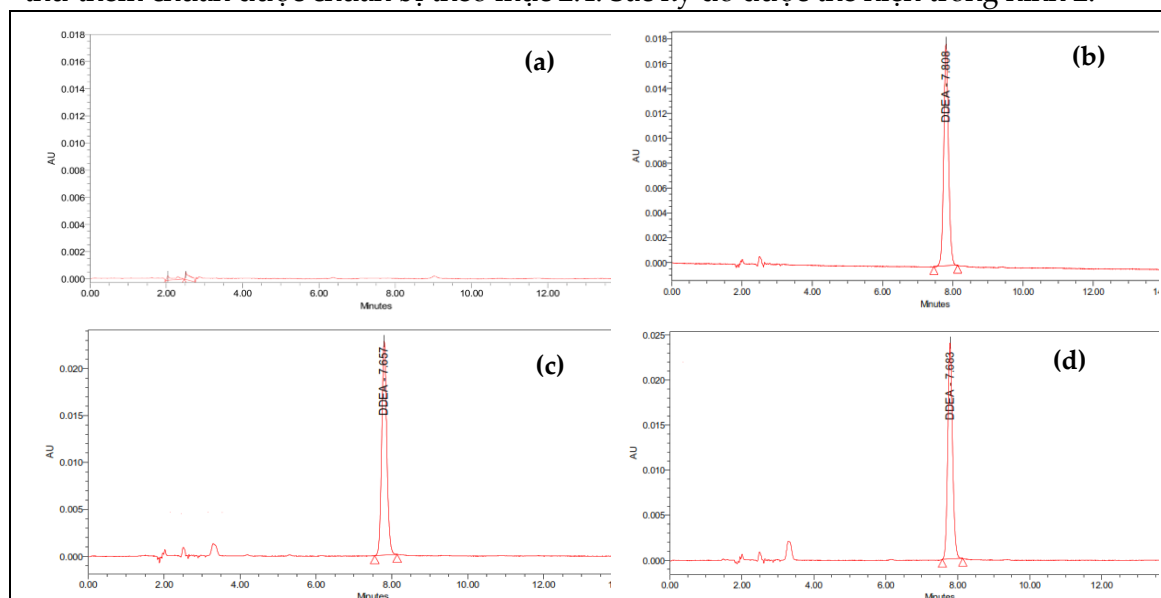
Tiến hành tiêm mẫu DDEA chuẩn 6 lần vào hệ thống với điều kiện sắc ký đã chọn và ghi nhận sắc ký đồ. Kết quả bảng 1 cho thấy thời gian lưu, diện tích peak đều có RSD < 2%; từ đó cho thấy quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tính tương thích của hệ thống

Lần đo	Thời gian lưu t_R (phút)	Diện tích peak (mAU*min)
1	7,868	220484
2	7,861	219626
3	7,867	217415
4	7,853	216535
5	7,842	216077
6	7,819	216445
RSD (%)	0,138	0,888

Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng (ethanol 96 %), mẫu DDEA chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn được chuẩn bị theo mục 2.4. Sắc ký đồ được thể hiện trong hình 2.

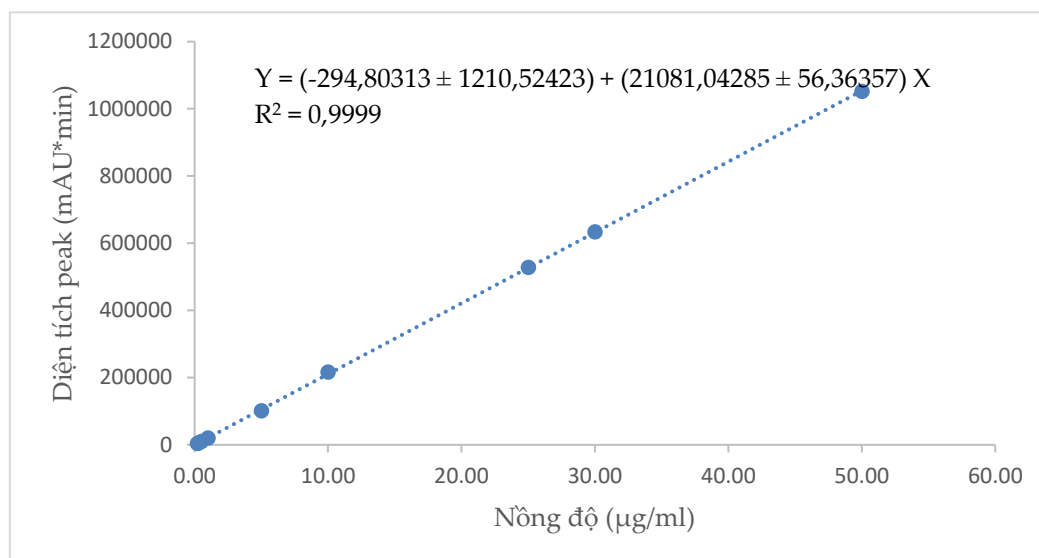


Hình 2. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), mẫu DDEA chuẩn (b), mẫu thử (c) và mẫu thử thêm chuẩn (d)

Kết quả cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng (a) không xuất hiện peak nào tại thời điểm 7-8 phút, vậy mẫu trắng không ảnh hưởng tới kết quả của phép đo. Mẫu chuẩn (b) và mẫu thử (c) đều có peak DDEA có thời gian lưu $t_R \approx 7,8$ phút. Đối với mẫu thử thêm chuẩn (d), có sự gia tăng về diện tích peak tại thời gian lưu $t_R \approx 7,8$ phút và không xuất hiện peak mới nào. Điều đó chứng tỏ phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

Tính tuyến tính

Xây dựng đường chuẩn: tiến hành phân tích với 9 mẫu chuẩn DDEA khoảng nồng độ từ 0,2 - 50 µg/ml . Kết quả được thể hiện ở hình 3



Hình 3. Đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa diện tích peak và nồng độ của dung dịch DDEA

Nhận xét: Kết quả cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích peak tại bước sóng 276 nm và nồng độ DDEA trong khoảng khảo sát từ 0,2-50 µg/ml với giá trị $R^2 = 0,9999$ chứng tỏ trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ DDEA trong mẫu chuẩn với diện tích peak. Khoảng tuyến tính này phù hợp để định lượng DDEA trong các mẫu thử.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Chuẩn bị và tiến hành phân tích các mẫu chứa DDEA có nồng độ giảm dần, giá trị giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng tỷ số tín hiệu/nhiều nền (S/N). Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ mà tại đó $S/N = 3$; giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ mà tại đó $S/N = 10$. Kết quả đã xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp $LOD = 0,05 \mu\text{g/ml}$ với tỉ số $S/N = 3,4$ và giới hạn định lượng của phương pháp $LOQ = 0,15 \mu\text{g/ml}$ với tỉ số $S/N = 10,1$.

Độ lặp lại

Tiêm 6 mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình 2.4 và tiêm vào hệ thống HPLC. Kết quả khảo sát độ lặp lại được trình bày trong bảng 2

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp

STT	Thời gian lưu tr (phút)	Diện tích peak (mAU*min)
1	7,645	247799

2	7,635	248277
3	7,628	248475
4	7,615	248373
5	7,599	248237
6	7,590	249098
RSD (%)	0,279	0,170

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD là 0,170 % với diện tích peak và thời gian lưu là 0,279 % đối với thời gian lưu.

Độ đúng

Độ đúng được đánh giá thông qua độ thu hồi (%) khi tính toán lượng chuẩn cần thêm vào mẫu thử với các tỷ lệ lần lượt là 80%, 100%, 120% so với nồng độ mẫu thử, mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần trong cùng điều kiện khảo sát. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

STT	% thêm vào	Nồng độ mẫu thử (C1) (µg/ml)	Nồng độ thu hồi (C2) (µg/ml)	Tỷ lệ thu hồi (C2-C1)/C0*100% (%)
1	80	11,756	20,298	99,2
2		11,756	20,339	99,7
3		11,756	20,330	99,6
TB			20,323	99,5
RSD (%)			0,105	0,266
4	100	11,756	22,801	99,0
5		11,756	22,880	99,7
6		11,756	22,847	99,4
TB			22,844	99,4
RSD (%)			0,181	0,353
7	120	11,756	24,735	102,3
8		11,756	24,764	102,5
9		11,756	24,669	101,8
TB			24,722	102,2
RSD (%)			0,195	0,353
Trung bình tỷ lệ thu hồi				100,4

Kết quả cho thấy trong tất cả các lần thử đều có RSD nhỏ hơn 2% và tỷ lệ thu hồi trong các lần đo đều nằm trong giới hạn cho phép 90% - 107% [10]. Do vậy phương pháp đạt độ đúng.

3.3 Áp dụng mẫu thực tế

Sau khi thẩm định quy trình, tiến hành định lượng diclofenac diethylamin trong 03 mẫu thuốc trên thị trường bằng cách tiêm 03 mẫu thử diclofenac diethylamin được chuẩn bị theo quy trình vào hệ thống HPLC đã chọn. Kết quả được thể hiện ở bảng 4

Bảng 4. Kết quả định lượng DDEA trong của một số sản phẩm trên thị trường

Mẫu	<i>Voltaren Emulgel</i>	<i>Diclofenac Stella Gel</i>	<i>D - Emulgel</i>
Diclofenac diethylamin (C%)	1,170	1,178	1,172
Hàm lượng so với trên nhãn (%)	100,86%	101,55%	101,03%

Qua kết quả bảng 4 cho thấy các chế phẩm có hàm lượng diclofenac diethylamin nằm trong khoảng giới hạn cho phép về quy định hàm lượng cho phép của gel bôi da là 90% - 110% theo quy định của Dược điển Việt Nam V.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng diclofenac diethylamin bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA. Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp. Đã áp dụng phân tích hàm lượng của một số sản phẩm chứa diclofenac diethylamin đang lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Shiv S. B. , Subham B. , Ashoke K. G. , Pronobesh C. , Anurag V. , Amitava G. (2013). A RP-HPLC method for quantification of diclofenac sodium released from biological macromolecules. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 58, pp. 354-359.
- [2]. Pilotto A., Franceschi M., Leandro G., Di Mario F. (2003). NSAID and aspirin use by the elderly in general practice: effect on gastrointestinal symptoms and therapies, *Drugs Aging*, Vol. 20(9), pp.701-710.
- [3]. McPherson M. L., Cimino N. M. (2013). Topeakal NSAID Formulations , *Pain Medicine*, Vol. 14(1), pp. 35-39.
- [4]. Pradal J., Frappin G. V. M. C., Bariguan F. , Lombardi S. M. (2019). Importance of the formulation in the skin delivery of topeakal diclofenac: not all topeakal diclofenac formulations are the same. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, Vol.12, pp. 1149-1154.
- [5]. Bộ Y tế (2017), Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học.
- [6]. Bushra T. A. (2019). Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of diclofenac in tablets. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Vol. 27, pp. 66 -70.

- [7]. Klimes J., Sochor J., Doležal P., Kořner J. (2001). HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 217, pp. 153-160.
- [8]. Mulgund S. V., Phoujdar M. S., Londhe S. V., Mallade P. S., Kulkarni T. S., Deshpande A. S., and Jain K. S. (2009). Stability Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Mephenesin and Diclofenac Diethylamine. *Indian J Pharm Sci.*, Vol 71(1), pp. 35-40.
- [9]. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidelines for validation of analytical procedures: Q2 (R1). Text and Methodology. 2005
- [10]. AOAC International (2012). AOAC® Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF DICLOFENAC DIETHYLAMINE

Huynh Thi Nhu Quynh, Le Trung Khoang, Hoang Thi Thu Huyen,
Hoang Thuy Binh, Tran Luu Phuc, Huynh Van Chung*

Faculty of Pharmacy, Buon Ma Thuot Medical University

*Email: hvchung@bmtuvietnam.com

ABSTRACT

In this study, a procedure for quantifying diclofenac diethylamine (DDEA) in gel dosage form was established by high performance liquid chromatography (HPLC) with a PDA detector. Chromatographic separation was achieved using a symmetry C18 column (4.6 mm x 250 mm) with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid: acetonitril (35 : 65, v/v) at a flow rate of 1.0 ml/min, and monitored at 276 nm. The method was validated in accordance with International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines. The calibration curve was linear over the concentration range from 0.2 to 50 µg/ml. The limit of detection (LOD) was 0.05 µg/ml, the limit of quantitation (LOQ) was 0.15 µg/ml. The method achieved accuracy with recovery in the range of 99.19 – 102.53%, high repeatability with an RSD of 0.170 % for peak area and 0.279 % for retention time. The validated method was successfully used for quantitative analysis of three commercial gel.

Keywords: diclofenac diethylamine, gel, high performance liquid chromatography.



Lê Trung Khoáng sinh năm 1989. Ông tốt nghiệp dược sĩ đại học (bào chế - công nghiệp dược) tại trường Đại học Dược Hà Nội; nhận bằng thạc sĩ Dược, chuyên ngành Dược lý - Dược lâm sàng tại Đại học Y Dược TP. HCM. Hiện nay, ông giảng dạy và nghiên cứu tại Khoa Dược – Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột.

Lĩnh vực nghiên cứu: Dược lý - dược lâm sàng, bào chế dược liệu



Hoàng Thị Thu Huyền sinh năm 1989. Bà tốt nghiệp dược sĩ đại học (bào chế - công nghiệp dược) tại trường Đại học Dược Hà Nội; Nhận bằng thạc sĩ Dược, chuyên ngành Bào Chế tại Đại học Y Dược TP. HCM. Hiện nay, bà giảng dạy và nghiên cứu tại Khoa Dược – Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột.

Lĩnh vực nghiên cứu: Bào chế và chiết xuất dược liệu



Hoàng Thúy Bình sinh năm 1993. Bà tốt nghiệp dược sĩ đại học tại trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh; nhận bằng thạc sĩ Dược, chuyên ngành Công nghệ dược phẩm và bào chế thuốc tại Đại học Y Dược TP. HCM. Hiện nay, bà giảng dạy và nghiên cứu tại Khoa Dược – Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa Lý Dược – Bào Chế



Huỳnh Văn Chung sinh năm 1990. Ông tốt nghiệp Đại học tại trường Đại học Quy Nhơn (sư phạm hóa); nhận bằng thạc sĩ Hóa phân tích tại Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế. Hiện nay, ông giảng dạy và nghiên cứu tại Khoa Dược – Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa phân tích – Kiểm nghiệm



Huỳnh Thị Như Quỳnh sinh năm 1987. Bà tốt nghiệp đại học (công nghệ Hóa học) tại trường Đại học Lạc Hồng; nhận bằng thạc sĩ Kỹ thuật Hóa học tại Đại học Bách Khoa TP. HCM. Hiện nay, bà giảng dạy và nghiên cứu tại Khoa Dược – Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột.

Lĩnh vực nghiên cứu: Công nghệ hóa học, bào chế dược liệu



Trần Lưu Phúc sinh năm 1991. Ông tốt nghiệp ĐH tại trường ĐH Tây Nguyên (Sư phạm Hóa học); nhận bằng thạc sĩ Hóa học, chuyên ngành Hóa hữu cơ tại trường ĐH sư phạm Hà Nội. Hiện nay, ông giảng dạy và nghiên cứu khoa học tại khoa Dược - ĐH Y Dược Buôn Ma Thuột.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa hữu cơ.