

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO PHÂN TÍCH ĐỒNG THỜI 6 CORTICOID TRỘN TRONG CHẾ PHẨM TỪ DƯỢC LIỆU

ThS. TRẦN THỊ DIỆU OANH
ThS. NGÔ VĂN TUYÊN, TS. TÔ MINH HÙNG
Viện KN-NC dược và TTBYT Quân đội
PGS.TS. TRỊNH NAM TRUNG - Học viện Quân y
Phản biện khoa học: TS. PHẠM XUÂN CHUNG
Trưởng phòng Dược, Cục Quân y

TÓM TẮT: *Mục tiêu:* Xây dựng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, phân tích đồng thời 6 corticoid (methyl prednisolon, prednisolon, betamethason, hydrocortison acetat, triamcinolon acetonid và dexamethason acetat) trộn trong chế phẩm từ dược liệu. *Phương pháp nghiên cứu:* Khảo sát các điều kiện sắc ký để tách riêng 6 chất nghiên cứu trên sắc ký đồ, thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của USP.

Kết quả: Xây dựng được phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, phân tích đồng thời 6 corticoid trộn trong chế phẩm từ dược liệu với các điều kiện: cột sắc ký RP18 (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m); pha động acetonitril-nước (40:60), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, detector DAD ở 240 nm. Kết quả thẩm định phương pháp trên hai chế phẩm từ dược liệu cho thấy độ chọn lọc tốt, độ đúng 103,87-112,86%, độ lặp lại 0,50-5,06%, khoảng tuyến tính 0,5-166 μ g/ml; giới hạn phát hiện 0,04-0,15 μ g/ml, giới hạn định lượng 0,12-0,50 μ g/ml.

Từ khóa: Corticoid, dược liệu, HPLC, thẩm định phương pháp.

ABSTRACT: Objectives: To develop HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method for simultaneous analysis of 6 corticoids (methyl prednisolone, prednisolone, betamethasone, hydrocortisone acetate, triamcinolone acetonide and dexamethasone acetate) in the herbal products. **Methods:** Investigating the chromatographic conditions to separate the 6 substances in the chromatogram, validating the analytical method according to the guidelines of the USP.

Results: The method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was established for simultaneous analysis of 6 corticoids in the herbal products with conditions: chromatographic column RP18 (150 mm x 4.6 mm; 5 μ m); mobile phase acetonitrile-water (40:60); flow speed (1.0 ml/min), DAD detector at 240 nm. The results of validation of the two herbal products showed that the selection was good; the accuracy of 103.87-112.86%; the repetition of 0.50-5.06%; range of linearity of 0.5-166 μ g/ml; Limit of Detection (LOD) of 0.04-0.15 μ g/ml; Limit of Quantity (LOQ) of 0.12-0.50 μ g/ml.

Keywords: Corticoids, herbal products, HPLC, validate a method.

Chịu trách nhiệm nội dung: ThS. Trần Thị Diệu Oanh, Email: tranthidieuoanh1980@gmail.com

Nhận bài ngày: 21/01/2018; mời phản biện khoa học: 01/02/2018; chấp nhận đăng: 26/02/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Trên thị trường hiện nay, các corticoid như dexamethason, betamethason, methyl prednisolon và muối của chúng có tác dụng chống viêm nhanh, mạnh, nhưng giá thành rẻ, dễ mua, nên hay bị trộn trái phép trong các chế phẩm thuốc hoặc thực phẩm chức năng từ dược liệu chữa thấp khớp, làm tăng cân, kích thích ăn ngon miệng...[2]. Việc trộn trái phép corticoid vào các chế phẩm từ dược liệu gây nguy hiểm cho người sử dụng vì họ không biết về sự có mặt của corticoid trong chế phẩm để phòng ngừa các tác dụng không mong muốn của corticoid. Người sử dụng có thể bị các tác dụng không mong muốn của corticoid như gây loãng xương, suy giảm miễn

dịch, loét đường tiêu hóa... Sự nguy hại đối với người sử dụng càng lớn khi họ dùng chế phẩm liều cao, thời gian kéo dài và không kiểm soát liều trình chặt chẽ.

Việc phân tích, kiểm soát các corticoid trộn trái phép trong chế phẩm từ dược liệu gặp nhiều khó khăn do nền mẫu phức tạp và các corticoid có cấu trúc khung steroid giống nhau. Vì vậy, chúng tôi xây dựng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phân tích đồng thời 6 corticoid gồm dexamethason acetat (DEX), betamethason (BET), methyl prednisolon (MEP), prednisolon (PRE), hydrocortison acetat (HYD), triamcinolon acetonid (TRI) làm cơ sở kiểm tra, giám sát chất lượng các chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu.

2. MẪU, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Mẫu nghiên cứu:

Mẫu lựa chọn nghiên cứu là 2 chế phẩm chứa phần lớn các dược liệu điều trị viêm khớp, đau khớp hiện nay:

- Mẫu M1 (thực phẩm chức năng - viên nang cứng): thành phần gồm đương quy, đỗ trọng, tục đoạn, cẩu tích, độc hoạt, ba kích, ngưu tất, cao quy bản, thương truật, mã tiền chế, phụ liệu vừa đủ; liều dùng: 3 viên/lần x 2 lần/ngày.

- Mẫu M2 (thuốc - viên nén bao phim): thành phần gồm mã tiền chế, thương truật, hương phụ, mộc hương, địa liên, quế chi; liều dùng: người lớn uống 2-6 viên/ngày; trẻ em trên 5 tuổi dùng bằng 1/2 liều người lớn.

2.2. Nguyên vật liệu và thiết bị:

- Nguyên liệu nghiên cứu:

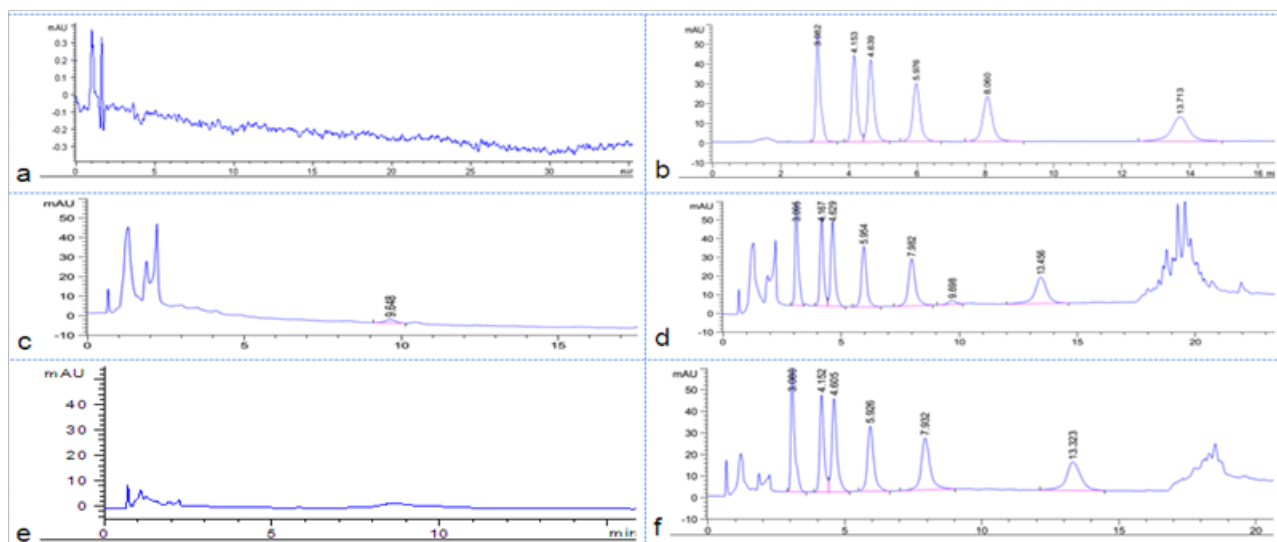
+ Chất chuẩn: Methylprednisolon, prednisolon, hydrocortison acetat - Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương; Betamethason, dexamethason acetat, triamcinolon acetonid - Viện kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.

+ Hóa chất, dung môi: Acetonitril, methanol (HPLC) - Merck, J.T Baker; aceton, methanol (PA) - Merck.

- Thiết bị, dụng cụ: hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HP1100 có detector mảng diod (DAD) (Agilent - Đức); cột sắc ký RP18 Luna, 150 x 4,6 mm, 5 μ m và bảo vệ cột cùng loại và một số loại thiết bị, dụng cụ khác.

3.2. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích:

- Tính chọn lọc, đặc hiệu: chuẩn bị các mẫu gồm mẫu trắng (methanol), mẫu chuẩn hỗn hợp trong methanol, mẫu thử M1, M2 và mẫu thử M1, M2 thêm chuẩn. Tiến hành xử lý mẫu và chạy sắc ký theo các điều kiện sắc ký đã chọn, thu được kết quả như hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ các mẫu: mẫu trắng (a); mẫu chuẩn hỗn hợp (b); mẫu thử M1 (c); mẫu thử M1 thêm chuẩn (d); mẫu thử M2 (e); mẫu thử M2 thêm chuẩn (f).

2.3. Phương pháp nghiên cứu;

- Xác định các điều kiện sắc ký: khảo sát trên cột C18, tiến hành thay đổi thành phần, tỉ lệ pha động, tốc độ dòng... để tìm điều kiện sắc ký có thể tách riêng 6 chất nghiên cứu trên sắc ký đồ.

- Thẩm định phương pháp phân tích:

+ Phương pháp xử lý mẫu: cân chính xác một lượng bột viên đã nghiền mịn tương đương với một liều uống, thêm 50,0 ml aceton, siêu âm 20 phút, để nguội, hút 20,0 ml dịch nổi, bốc hơi tới khô trên cách thủy ở 80°C. Hòa tan cân bằng 20,0 ml methanol, lọc qua màng 0,45 μ m.

+ Thẩm định phương pháp phân tích: thực hiện theo hướng dẫn của USP với các chỉ tiêu độ chọn lọc, độ đúng và độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu:

Số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý trên phần mềm Microsoft Office Excel, biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN.

3.1. Kết quả xác định điều kiện sắc ký:

Qua khảo sát, các điều kiện sắc ký được chọn như sau: detector DAD đặt ở bước sóng 240 nm, cột RP18 Luna (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m) đặt ở nhiệt độ phòng, tốc độ dòng là 1 ml/phút, pha động là ACN-Nước (40:60). Với điều kiện sắc ký trên, sắc ký đồ cho 6 pic tách riêng biệt, cân xứng. Thứ tự rửa giải của các chất lần lượt: PRE, MEP, BET, TRI, HYD và DEX. Thời gian phân tích khoảng 20 phút.

Trên sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện các pic tương ứng với vị trí của các chất nghiên cứu như trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp. Các pic này cân đối và riêng biệt. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng và các mẫu thử, tại các vị trí tương ứng với các chất nghiên cứu không thấy xuất hiện pic, các pic phụ trên sắc ký đồ ít và tín hiệu thấp. Như vậy, quy trình xử lý mẫu và phân tích đảm bảo có tính chọn lọc đối với các mẫu M1 và M2.

- Độ tuyến tính: chuẩn bị các dung dịch chuẩn của 6 chất nghiên cứu trong methanol ở 8 nồng độ khác nhau. Tiêm các dung dịch vào hệ thống, ghi lại sắc đồ, vẽ đường hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ các chất nghiên cứu, kết quả như sau (bảng 1):

Bảng 1. Sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ các chất nghiên cứu và diện tích pic (n = 6).

Dung dịch		0	1	2	3	4	5	6	7
PRE	Nồng độ (µg/ml)	0,56	1,13	5,63	11,27	16,90	28,16	93,88	187,76
	Diện tích pic TB	28,74	54,72	279,09	545,73	809,60	1350,46	4476,76	8719,16
	Đường chuẩn TB	$y = 46,358x + 24,368; r = 0,9999$							
MEP	Nồng độ (µg/ml)	0,50	1,01	5,05	10,10	15,14	25,24	84,14	168,27
	Diện tích pic TB	24,33	47,64	241,20	475,21	705,24	1175,14	3871,07	7589,59
	Đường chuẩn TB	$y = 45,155x + 19,475; r = 0,9999$							
BET	Nồng độ (µg/ml)	0,50	1,00	5,00	9,99	14,99	24,98	83,28	166,55
	Diện tích pic TB	25,11	49,13	249,31	487,96	728,26	1210,47	4033,22	7851,00
	Đường chuẩn TB	$y = 47,257x + 20,024; r = 0,9999$							
TRI	Nồng độ (µg/ml)	0,50	1,00	4,99	9,99	14,98	24,97	83,22	166,44
	Diện tích pic TB	23,48	45,16	229,22	448,71	666,26	1107,92	3661,63	7147,29
	Đường chuẩn TB	$y = 43,013x + 20,459; r = 0,9999$							
HYD	Nồng độ (µg/ml)	0,50	1,00	5,01	10,01	15,02	25,03	83,45	166,89
	Diện tích pic TB	24,20	46,74	236,64	464,04	686,27	1144,60	3784,40	7397,71
	Đường chuẩn TB	$y = 44,396x + 19,833; r = 0,9999$							
DEX	Nồng độ (µg/ml)	0,50	1,00	5,01	10,02	15,03	25,05	83,49	166,97
	Diện tích pic TB	23,66	45,17	229,61	446,84	663,63	1104,34	3643,47	7112,45
	Đường chuẩn TB	$y = 42,663x + 21,129; r = 0,9999$							

(TB: Trung bình; đơn vị diện tích pic: µAU.s)

Trong khoảng nồng độ khảo sát có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ của diện tích pic với nồng độ các chất nghiên cứu, các hệ số tương quan r đều lớn hơn 0,999.

- Độ đúng và độ lặp lại: tiến hành thẩm định bằng phương pháp thêm chuẩn với các mẫu được chuẩn bị như sau: lấy lượng bột viên tương đương với một liều uống, thêm chính xác 500 µl dung dịch chuẩn hỗn hợp (nồng độ khoảng 1000 µg/ml trong methanol đối với mỗi chất), để khô tự nhiên trong 1-2 giờ. Xử lý mẫu và sắc ký theo phương pháp đã xây dựng, tính nồng độ tìm lại. Độ đúng là tỉ lệ thu hồi % giữa nồng độ tìm lại và nồng độ thêm vào; độ lặp lại là giá trị RSD%. Kết quả bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại với mẫu M1 (n = 6).

TT	Thuốc nghiên cứu	Diện tích pic trung bình (mAU.s)		Tỉ lệ thu hồi ($\bar{X} \pm SD$ %)	RSD%
		Chuẩn	Thử		
1	PRE	501,73	526,92	105,02 ± 5,31	5,06
2	MEP	463,60	487,97	105,05 ± 2,76	2,63
3	BET	512,63	554,26	106,17 ± 2,26	2,13
4	TRI	443,43	477,29	107,64 ± 2,48	2,30
5	HYD	460,93	520,19	112,86 ± 2,62	2,32
6	DEX	444,12	480,01	108,08 ± 3,06	2,83

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại với mẫu M2 (n = 6, HYD có n = 5).

TT	Thuốc nghiên cứu	Diện tích pic trung bình (mAU.s)		Tỉ lệ thu hồi ($\bar{X} \pm SD\%$)	RSD%
		Chuẩn	Thử		
1	PRE	501,73	534,49	106,53 $\pm$ 0,77	0,72
2	MEP	463,60	481,54	103,87 $\pm$ 0,52	0,50
3	BET	512,63	561,37	109,51 $\pm$ 1,15	1,05
4	TRI	443,43	461,82	104,15 $\pm$ 1,81	1,74
5	HYD	460,93	483,35	104,86 $\pm$ 5,53	5,27
6	DEX	444,12	473,74	106,67 $\pm$ 2,51	2,35

Khi thẩm định trên hai mẫu là M1 và M2, phương pháp có độ đúng từ 103,87% (đối với PRE trên mẫu M2) đến 112,86% (đối với HYD trên mẫu M1); độ lặp lại với RSD% từ 0,50-5,27%. Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp có thể chấp nhận được trong điều kiện phân tích thuốc có hàm lượng nhỏ, trong nền mẫu phức tạp của chế phẩm từ dược liệu.

- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

Bảng 4. LOD và LOQ của các chất nghiên cứu.

Thuốc nghiên cứu	PRE	MEP	BET	TRI	HYD	DEX
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0,06	0,04	0,04	0,04	0,08	0,15
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	0,21	0,12	0,13	0,13	0,27	0,50

Phương pháp có giới hạn phát hiện từ 0,04-0,15 $\mu\text{g/ml}$ và giới hạn định lượng từ 0,12-0,50 $\mu\text{g/ml}$. Với giới hạn này có thể phát hiện các corticoid trộn vào ở nồng độ có tác dụng dược lý.

4. BÀN LUẬN.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi không sử dụng các dược liệu để chiết xuất làm nền mẫu mà tiến hành phân tích và thẩm định ngay trên thành phẩm. Khi phân tích mẫu M1 và M2, nếu trên sắc ký đồ mẫu thử có pic trùng với một trong các pic của 6 chất nghiên cứu thì phải tiến hành định tính xác định bằng cách lấy phổ UV và thay đổi tỉ lệ pha động để so sánh thời gian lưu giữa mẫu thử và mẫu chuẩn. Nếu khẳng định đó là pic của chất nghiên cứu bị trộn thì tiến hành định lượng bằng phương pháp thêm chuẩn để hạn chế sai số do tác động của nền mẫu.

Khi phân tích không thấy sự có mặt của các chất nghiên cứu, nên tiến hành thêm chuẩn để xây dựng mô hình thẩm định phương pháp phân tích cho các mẫu này. Kết quả cho thấy, có thể áp dụng phương pháp phân tích cho các chế phẩm có thành phần tương tự như mẫu M1 và M2. Tuy nhiên, để hạn chế ảnh hưởng do thành phần tá dược, qui trình chiết xuất, bào chế khác nhau của các nhà sản xuất khác nhau thì khi phân tích định tính phải xem xét thêm phổ UV và khi định lượng phải dùng phương pháp thêm chuẩn.

5. KẾT LUẬN.

Đã xây dựng được phương pháp phân tích đồng thời sáu thuốc chống viêm corticoid (PRE, MEP, BET, HYD, TRI, DEX) có thể trộn lẫn trong các chế

phẩm thuốc hoặc thực phẩm chức năng có nguồn gốc từ dược liệu. Phương pháp có độ chọn lọc cao khi thẩm định trên hai mẫu M1 và M2; độ tuyến tính trong khoảng khảo sát từ 0,5-166 $\mu\text{g/ml}$, với hệ số tương quan $r \geq 0,9999$; độ đúng đạt từ 103,87-112,86%; độ lặp lại với RSD% từ 0,50-5,27%; giới hạn phát hiện từ 0,04-0,15 $\mu\text{g/ml}$ và giới hạn định lượng từ 0,12-0,50 $\mu\text{g/ml}$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế (2009), *Công văn số 14147/QLD-CL về việc đình chỉ lưu hành và thu hồi thuốc đông dược có trộn tân dược*.
2. Trịnh Thị Quy (2012), *Nghiên cứu phát hiện một số glucocorticoid trộn trái phép trong chế phẩm đông dược bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*, Luận văn thạc sĩ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
3. Nguyễn Đức Thanh (2014), *Xác định một số corticosteroid trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp HPLC*, Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
4. Huan Ping, Ling Xiao (2009), "Detection of glucocorticosteroid in traditional Chinese preparation by the liquid chromatography-mass spectrometry method", *Journal of Shandong University*, 47 (12), pp.138-140.
5. XiaRui, CheBaoquan2008, "RP-HPLC identification of corticosteroids in Chinese material medica preparation", *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2, pp. 316-318. □