

Bảng 1. Thời gian lưu và diện tích pic của mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu giả dược

Mẫu		MP	PP	MS	ND
Chuẩn	Rt (min)	4,046	6,379	7,402	15,574
	S (mAu)	9296882	1815927	10229068	6035605
Thử	Rt (min)	4,047	6,374	7,397	15,558
	S (mAu)	9372620	1562283	10021145	5872812
Giả dược	Rt (min)	-	-	-	-
	S (mAu)	-	-	-	-

Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp (a), mẫu thử (b) và mẫu giả dược (c)

3.2. Tính tương thích hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp được chuẩn bị ở mục 3.1. **Tính đặc hiệu.** Kết quả trung bình và độ lệch chuẩn tương đối của các thông số HPLC được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Thông số	MP	PP	MS	ND
Thời gian lưu (phút)	4,038	6,353	7,371	15,512
RSD* (%)	0,238	0,308	0,298	0,306
Diện tích pic (mAU.s)	9290288	1813592	10205162	6029185
RSD (%)	0,254	0,572	0,234	0,208
Chiều cao pic (mAU.s)	833573	124336	552073	203042
RSD (%)	0,172	0,286	0,176	0,215
Hệ số đối xứng	1,554	1,477	1,961	1,530
Số đĩa lý thuyết	3202,303	4533,186	4312,915	6695,560
Hệ số phân giải	-	6,988	2,563	13,486

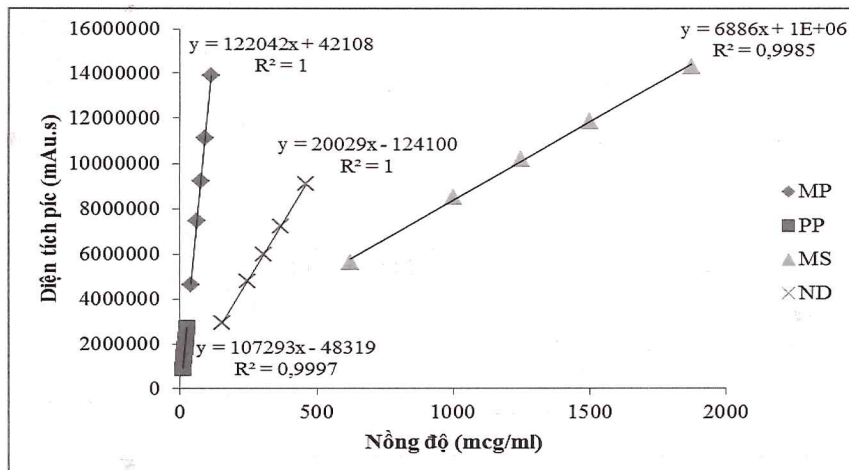
*RSD: độ lệch chuẩn tương đối

3.3. Tính tuyến tính

Chuẩn bị 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp tương tự ở mục 3.1. **Tính đặc hiệu** có nồng độ các chất thành phần từ 50 – 150% nồng độ định lượng của mẫu thử. Tiến hành sắc ký, xây dựng phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc diện tích pic vào nồng độ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

MP		PP		MS		ND	
Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
37,8189	4642684	8,7061	889014	624,9900	5646530	153,4693	2960059
60,5103	7464572	13,9298	1444179	999,9840	8503552	245,5509	4793670
75,6378	9250182	17,4122	1804984	1249,9800	10215423	306,9386	6011709
90,7654	11119519	20,8946	2212381	1499,9760	11860715	368,3263	7240108
113,4567	13888685	26,1183	2748841	1874,9700	14288221	460,4079	9112925
PT hồi quy: $y = 122042,3487x + 42108,3310$		PT hồi quy: $y = 107292,5507x - 48318,5793$		PT hồi quy: $y = 6886,0110x + 1495512,1655$		PT hồi quy: $y = 20029,3940x - 124099,9379$	
Hệ số R: 1,0000		Hệ số R: 0,9998		Hệ số R: 0,9992		Hệ số R: 1,0000	



Hình 2. Đường hồi quy tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích

3.4. Độ đúng

Mẫu chuẩn: sử dụng mẫu chuẩn ở mục 3.1. Tính đặc hiệu

Mẫu thử: tiến hành trên 09 mẫu thử, mỗi mức nồng độ thực hiện trên 03 mẫu.

- Lấy vào ba bình định mức 100 ml, mỗi bình 7,0 ml dung dịch chuẩn gốc MP và PP; 0,0960 g MS chuẩn; 0,0240 g ND chuẩn và 3,0000 g giả dược. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình phân tích, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều (tương ứng với 80% nồng độ định lượng).

- Lấy vào ba bình định mức 100 ml, mỗi bình

10,0 ml dung dịch chuẩn gốc MP và PP; 0,1200 g MS chuẩn; 0,0300 g ND chuẩn và 3,0000 g giả dược. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình phân tích, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều (tương ứng với 100% nồng độ định lượng).

- Lấy vào ba bình định mức 100 ml, mỗi bình 13,0 ml dung dịch chuẩn gốc MP và PP; 0,1440 g MS chuẩn; 0,0360 g ND chuẩn và 3,0000 g giả dược. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình phân tích, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều (tương ứng với 120% nồng độ định lượng).

- Tiến hành ghi sắc ký đồ, tính toán lượng các chất chuẩn tìm lại, trên cơ sở đó tính toán độ thu hồi.

Bảng 4. Kết quả phân tích độ đúng

TT	Dược chất	Tên mẫu	Khối lượng placebo (g)	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic	Lượng thu hồi (mg)	% Thu hồi
1	MP	Thu hồi 1	3,0013	5,2894	6475438	5,2668	99,57
2		Thu hồi 2	3,0121	5,2894	6484059	5,2738	99,71
3		Thu hồi 3	3,0496	5,2894	6487851	5,2769	99,76
4		Thu hồi 4	3,0335	7,5562	9259772	7,5314	99,67
5		Thu hồi 5	3,0772	7,5562	9332006	7,5902	100,45
6		Thu hồi 6	3,0214	7,5562	9266788	7,5371	99,75
7		Thu hồi 7	3,0331	9,8231	12039988	9,7927	99,69
8		Thu hồi 8	3,0212	9,8231	12016692	9,7737	99,50
9		Thu hồi 9	3,0007	9,8231	12079815	9,8251	100,02

Trung bình thu hồi (%)							99,79
RSD (%)							0,29
1	PP	Thu hồi 1	3,0013	1,2171	1263782	1,2117	99,55
2		Thu hồi 2	3,0121	1,2171	1266391	1,2142	99,75
3		Thu hồi 3	3,0496	1,2171	1266763	1,2145	99,78
4		Thu hồi 4	3,0335	1,7388	1803140	1,7288	99,42
5		Thu hồi 5	3,0772	1,7388	1825398	1,7501	100,65
6		Thu hồi 6	3,0214	1,7388	1797001	1,7229	99,09
7		Thu hồi 7	3,0331	2,2604	2420617	2,3208	102,67
8		Thu hồi 8	3,0212	2,2604	2422506	2,3226	102,75
9		Thu hồi 9	3,0007	2,2604	2435595	2,3351	103,31
Trung bình thu hồi (%)							100,77
RSD (%)							0,65
1	MS	Thu hồi 1	3,0013	99,9	8399162	103,3	103,39
2		Thu hồi 2	3,0121	105,8	8778856	108,0	102,04
3		Thu hồi 3	3,0496	101,5	8437503	103,8	102,23
4		Thu hồi 4	3,0335	123,0	10131786	124,6	101,30
5		Thu hồi 5	3,0772	121,0	10128138	124,6	102,94
6		Thu hồi 6	3,0214	124,2	10178461	125,2	100,78
7		Thu hồi 7	3,0331	147,8	11931866	146,7	99,28
8		Thu hồi 8	3,0212	146,9	11835492	145,5	99,08
9		Thu hồi 9	3,0007	147,2	11984259	147,4	100,12
Trung bình thu hồi (%)							101,24
RSD (%)							1,53
1	DN	Thu hồi 1	3,0013	25,8	5102319	26,0	100,70
2		Thu hồi 2	3,0121	24,0	4737341	24,1	100,51
3		Thu hồi 3	3,0496	26,2	5104620	26,0	99,21
4		Thu hồi 4	3,0335	31,2	6105781	31,1	99,65
5		Thu hồi 5	3,0772	29,0	5795446	29,5	101,76
6		Thu hồi 6	3,0214	30,8	6101558	31,1	100,87
7		Thu hồi 7	3,0331	38,4	7783884	39,6	103,22
8		Thu hồi 8	3,0212	36,6	7247523	36,9	100,83
9		Thu hồi 9	3,0007	37,8	7623035	38,8	102,69
Trung bình thu hồi (%)							101,05
RSD (%)							1,30

3.5. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Tiến hành phân tích xác định hàm lượng các được chất trên cùng một mẫu thử ở hai thời điểm, hai kiểm nghiệm viên và 2 thiết bị phân tích khác nhau với các điều kiện sắc ký và xử lý mẫu như quy

trình phân tích. Mỗi thời điểm phân tích lặp lại trên 6 mẫu thử. Kết quả được trình bày ở Bảng 5.

Độ chính xác trung gian được đánh giá thông qua RSD% của 12 kết quả của 2 ngày thử nghiệm.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của 2 ngày thử nghiệm

Hoạt chất	Mẫu	Ngày 1 (Thiết bị Shimadzu LC20A)			Ngày 2 (Thiết bị HP1100)		
		KL cân thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)	KL cân thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)
MP	1	3,0017	9316654	0,2519	3,0787	9338428	0,2441
	2	3,1747	9837457	0,2515	3,0545	9546804	0,2515
	3	3,2017	9793862	0,2483	3,0623	9330125	0,2452
	4	3,0579	9297270	0,2468	3,0874	9564348	0,2493
	5	2,8783	8850277	0,2496	3,1014	9338105	0,2423
	6	3,0729	9359381	0,2472	3,0725	9565132	0,2505
	HLTB*(%)	0,2492			0,2471		
	RSD _{n=6}	0,87			1,53		
	RSD _{n=12}	1,26					
PP	1	3,0017	1544990	0,0493	3,0787	1800847	0,0492
	2	3,1747	1633966	0,0493	3,0545	1842870	0,0507
	3	3,2017	1625751	0,0487	3,0623	1799196	0,0494
	4	3,0579	1547687	0,0485	3,0874	1865973	0,0508
	5	2,8783	1469968	0,0490	3,1014	1797965	0,0487
	6	3,0729	1550808	0,0484	3,0725	1866124	0,0511
	HLTB*(%)	0,0489			0,0500		
	RSD _{n=6}	0,84			1,99		
	RSD _{n=12}	1,88					
Hoạt chất	Mẫu	Ngày 1 (Thiết bị Shimadzu LC20A)			Ngày 2 (Thiết bị HP1100)		
		KL cân thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng so với nhãn (%)	KL cân thử (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng so với nhãn (%)
MS	1	3,0017	9984183	101,85	3,0787	10259555	97,08
	2	3,1747	10446257	100,76	3,0545	10422393	99,40
	3	3,2017	10376404	99,24	3,0623	10290711	97,90
	4	3,0579	9982535	99,96	3,0874	10462783	98,73
	5	2,8783	9578652	101,90	3,1014	10306117	96,81
	6	3,0729	9986827	99,52	3,0725	10503451	99,59
	HLTB*(%)	100,54			98,25		
	RSD _{n=6}	1,15			1,50		
	RSD _{n=12}	1,63					
ND	1	3,0017	5877521	99,68	3,0787	6067437	99,80
	2	3,1747	6152219	98,66	3,0545	5856104	97,09
	3	3,2017	6162310	97,98	3,0623	6066018	100,31
	4	3,0579	5891377	98,08	3,0874	5837449	95,75
	5	2,8783	5555031	98,25	3,1014	6064069	99,01
	6	3,0729	5850779	96,93	3,0725	5842345	96,29
	HLTB*(%)	98,26			98,04		
	RSD _{n=6}	0,92			1,96		
	RSD _{n=12}	1,46					

*HLTB: hàm lượng trung bình

4. BÀN LUẬN

Tính đặc hiệu là khả năng đánh giá chắc chắn một chất phân tích khi có mặt các thành phần khác có thể có trong mẫu thử. Kết quả thu được ở mục 3.1. Tính đặc hiệu cho thấy trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu thử, thứ tự thời gian lưu của MP, PP, MS và ND lần lượt là khoảng 4,0 phút; 6,4 phút; 7,4 phút và 15,6 phút. Sắc ký đồ của mẫu giả được không xuất hiện pic ở các thời điểm này hoặc có xuất hiện pic nhưng đáp ứng pic rất nhỏ, thiết bị phân tích không thể định lượng. Điều này chứng tỏ phương pháp phân tích xây dựng được có tính đặc hiệu cao, các thành phần khác như tá dược, thuốc thử... không ảnh hưởng đến phép định lượng các chất cần phân tích.

Tính tương thích của hệ thống được đánh giá thông qua giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của các thông số HPLC như thời gian lưu, diện tích/chiều cao pic, hệ số đối xứng, hệ số phân giải của các lần tiêm lặp lại. Các giá trị này đều cho kết quả RSD (%) nhỏ hơn 2,0%, đáp ứng được yêu cầu thông thường của một phương pháp HPLC. Đặc biệt, đối với phép thử định lượng đồng thời các chất, hệ số phân giải giữa chất phân tích là một yếu tố quan trọng, chứng minh khả năng phân tách giữa các chất. Kết quả phân tích cho thấy các hệ số phân giải thu được giữa các chất đều lớn hơn 2,5 chứng tỏ phương pháp phân tích xây dựng được có khả năng phân tách tốt các chất ra khỏi nhau.

Tính tuyến tính của một quy trình phân tích diễn tả kết quả phân tích thu được tỷ lệ với nồng độ (trong khoảng nhất định) của chất phân tích trong mẫu thử. Tính tuyến tính được đánh giá thông qua hệ số tương quan R của các phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc của nồng độ chất phân tích đối với đáp pic. Trong các phương trình hồi quy xây dựng được, hệ số R đều có giá trị lớn hơn 0,999 chứng tỏ giữa nồng độ khảo sát và diện tích pic có mối quan hệ tương quan tuyến

tính chặt chẽ.

Độ đúng của một quy trình phân tích biểu diễn sự đồng nhất giữa giá trị tìm thấy với giá trị thực hoặc giá trị đối chiếu được chấp nhận. Các kết quả phân tích cho thấy phương pháp có độ đúng cao thể hiện ở tỷ lệ thu hồi trung bình lớn từ 98,0 – 102,0% và giá trị RSD % (n=9) đều nhỏ hơn 2,0%.

Độ lặp lại diễn tả độ chính xác của một quy trình phân tích trong cùng điều kiện thí nghiệm trong khoảng thời gian ngắn. Phương pháp có độ lặp lại tốt khi giá trị RSD (%) kết quả định lượng của 6 mẫu thử trong mỗi ngày định lượng đều nhỏ hơn 2,0%. Đồng thời, phương pháp cũng cho độ chính xác trung gian cao khi giá trị RSD (%) kết quả định lượng 12 mẫu thử trong 2 ngày định lượng trên 2 thiết bị HPLC khác nhau cũng đều dưới 2,0%.

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Các kết quả đạt được trong nghiên cứu cho thấy rằng đây là một phương pháp phân tích HPLC đơn giản với độ đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng cao. Phương pháp có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, đáp ứng được các yêu cầu để phân tích định lượng đồng thời các thành phần nói trên trong gel bôi da Volsamen. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng của methyl salicylat, natri diclofenac so với hàm lượng ghi trên nhãn trong gel bôi da Volsamen thuộc khoảng 96,81 – 101,90% với methyl salicylat, 95,75 – 100,31% với natri diclofenac, hàm lượng chất bảo quản trong gel bôi da Volsamen thuộc khoảng 0,2423 – 0,2519% với methylparaben, 0,0484 – 0,0511% với propylparaben, tất cả đều đạt tiêu chuẩn về tiêu chí hàm lượng theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam 4 năm 2009. Đồng thời, phương pháp không yêu cầu xử lý mẫu phức tạp trước khi phân tích, vì vậy có thể áp dụng để định lượng đồng thời các loại dược phẩm đa thành phần có chứa các thành phần tương tự.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Pharmacopoeia USP 39, 2016.
2. Pharmacopoeia BP 2017.
3. Dược điển Việt Nam 4, 2009.

4. Snyder L.R., Kirkland, J.J., Glajch J.L, Practical HPLC Method Development, 2nd ed. John Wiley & Son: New York, 1997.