



Xây dựng quy trình định lượng flurbiprofen trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò huỳnh quang

Nguyễn Thị Thanh Bình*, Trần Mai Anh, Dương Hải Thuận,
Nguyễn Hữu Tùng, Bùi Thanh Tùng

Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 14 tháng 8 năm 2018

Chỉnh sửa ngày 26 tháng 9 năm 2018; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 12 năm 2018

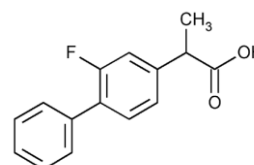
Tóm tắt: Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng flurbiprofen trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò huỳnh quang. Pha tĩnh được sử dụng là cột silica gel pha đảo C₈ (5 μm, 120 Å, 4,6×150 mm), pha động là hỗn hợp acetonitril : nước : acid acetic băng (65 : 32,5 : 2,5; v/v/v). Tốc độ dòng 1 ml/phút, thời gian sắc ký 8 phút. Bước sóng kích thích và bước sóng phát xạ lần lượt là 247 nm và 312 nm. Nhiệt độ của buồng đo được giữ ở 45°C, độ nhạy của đầu dò ở mức 5. Thời gian lưu của flurbiprofen là 3,78 phút. Trong khoảng nồng độ từ 5 - 100 ng/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa điện tích pic và nồng độ dung dịch. Phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu với flurbiprofen, có độ đúng và độ chính xác tốt với tỷ lệ phục hồi ≤ 100 ± 2%, độ lệch chuẩn tương đối của độ lặp lại ≤ 2,08%, độ lệch chuẩn tương đối của độ chính xác trung gian ≤ 2,96%. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,010 và 0,025 ng/ml.

Từ khóa: flurbiprofen, định lượng, sắc ký lỏng hiệu năng cao, đầu dò huỳnh quang.

1. Đặt vấn đề

Flurbiprofen là thuốc kháng viêm không steroid được sử dụng khá phổ biến trên thế giới, đặc biệt là tại châu Âu và Bắc Mỹ. Nhờ tác dụng ức chế không chọn lọc enzyme cyclooxygenase, flurbiprofen ngăn cản quá trình tổng hợp prostaglandin G₂ và H₂ từ axit arachidonic, từ đó giúp cải thiện tình trạng

viêm, đau, sưng và sốt [1]. Bên cạnh đó, flurbiprofen còn thể hiện khả năng ức chế kết tập tiểu cầu rất mạnh [2], đồng thời làm giảm nguy cơ và trì hoãn sự xuất hiện của bệnh Alzheimer [3-5].



Hình 1. Công thức cấu tạo của flurbiprofen.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-1687768293.

Email: binhnguyen@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4121>

Flurbiprofen có độ tan trong nước kém. Nồng độ bão hòa của của chất này trong nước ở 22°C là 8 mg/L, các chỉ số LogP và LogS lần lượt là 4,16 và - 4,49 [6]. Từ đó, việc bào chế các hệ dẫn thuốc nano có cấu trúc lipid như nano lipid rắn, nhũ tương nano,... là hướng nghiên cứu đang được quan tâm trên thế giới [5], [7-9]. Xây dựng phương pháp định lượng flurbiprofen theo tiêu chuẩn quốc tế, đảm bảo tính đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác là công việc hết sức cần thiết nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo như bào chế, đánh giá tương đương sinh học, theo dõi dược động học của thuốc.

Một số phương pháp định lượng flurbiprofen trong dược phẩm và trong dịch sinh học đã được công bố như chuẩn độ [10], đo độ hấp thụ quang, đo độ phát xạ huỳnh quang [11], sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò chuỗi diode (HPLC - DAD) [12], sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ (LC - MS) [13-15], sắc ký khí ghép đầu dò khối phổ (GC - MS) [16]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình định lượng flurbiprofen trong dạng bào chế thông dụng nhất hiện nay là viên nén bằng phương pháp HPLC ghép đầu dò huỳnh quang (FLD). Nghiên cứu được tiến hành theo hướng dẫn của Cơ quan quản lý thuốc châu Âu (European Medicines Agency - EMA) [17] và Hội nghị quốc tế về hài hoà hoá các yêu cầu kỹ thuật để đăng ký dược phẩm sử dụng trên người (International conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use - ICH) [18].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất, dung môi

Flurbiprofen đạt tiêu chuẩn chất chuẩn theo dược điển châu Âu (code: EPF0285200), natri hydroxid (NaOH), axít clohydric (HCl), axít acetic (CH_3COOH), hydro peroxid (H_2O_2) đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích, acetonitrile (ACN) đạt tiêu chuẩn HPLC được mua từ nhà sản xuất Merck KGaA, Đức. Nước (H_2O) được

tinh chế bằng thiết bị Thermo Scientific GenPure UV - TOC đạt điện trở suất 18,2 M Ω .m. Mẫu dược phẩm được định lượng là viên nén bao phim Antadys 100 mg (Theramex, Pháp; lot: 1M620 012014).

2.2. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị được sử dụng là hệ thống HPLC Ultimate 3000 - Dionex (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) trang bị bốn bơm cao áp và bộ tiêm mẫu tự động. Đầu dò FLD - 3100 Dionex sử dụng đèn Xenon, khoảng bước sóng đo được 200 – 880 nm. Cột silica gel pha đảo Thermo Scientific Acclaim C₈ có kích thước hạt 5 μm , 120 Å, đường kính 4,6 mm, chiều dài 150 mm. Thiết bị xử lý tín hiệu là hệ thống máy vi tính với hệ điều hành Microsoft Windows 7 trang bị phần mềm điều khiển Chromeleon Dionex phiên bản 7.1.2.1478.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Trong suốt quá trình thực nghiệm, tất cả các mẫu đều được phân tích 3 lần, lấy giá trị trung bình. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2007.

Tối ưu hoá điều kiện sắc ký

Từ nghiên cứu định lượng flurbiprofen bằng phương pháp HPLC – DAD đã được công bố của nhóm tác giả [12], các điều kiện phân tích ban đầu được xác định như sau: Pha tĩnh là silica gel C₈ 5 μm , 120 Å trong cột 4,6×150 mm; pha động ACN : H₂O : CH₃COOH tỷ lệ 65 : 32,5 : 2,5 (v/v/v), thể tích tiêm mẫu 10 μl , tốc độ dòng 1 ml/phút, thời gian sắc ký 8 phút.

Khi sử dụng đầu dò huỳnh quang, nhiệt độ buồng đo được giữ ở 45°C, cao hơn nhiệt độ phòng khoảng 15°C. Độ nhạy của đầu dò được cài đặt ở mức 5, đây là mức trung bình, sử dụng cho những dung dịch không quá khó phát hiện.

Sử dụng dung dịch flurbiprofen chuẩn nồng độ 50 ng/ml để tối ưu hóa bước sóng phát xạ và bước sóng kích thích. Tiến hành như sau: Cài đặt bước sóng kích thích λ_{EX} ở 247 nm, bằng bước sóng hấp thụ cực đại λ_{MAX} của flurbiprofen. Quét phổ phát xạ trong dải 270 - 400 nm với tốc độ quét trung bình nhằm xác định bước

sóng λ_{Em} mà tại đó flurbiprofen có độ phát xạ cực đại. Tiếp đó, sử dụng bước sóng phát xạ λ_{Em} vừa xác định được, quét phổ kích thích trong dải 200 – 300 nm, tốc độ quét trung bình để xác định bước sóng kích thích λ_{Ex} tối ưu.

Xác định tính đặc hiệu của phương pháp

FLD không có chức năng kiểm tra độ tinh khiết của pic thông qua sự trùng phổ hấp thụ. Vì vậy, để xác định khả năng phân tách của flurbiprofen khỏi sản phẩm phân hủy, chúng tôi kết hợp FLD với DAD trên cùng một hệ thống HPLC. Flurbiprofen được xử lý với các yếu tố khác nhau như axit (HCl), bazơ (NaOH), oxy hoá (H_2O_2), nhiệt độ và ánh sáng nhằm tạo sản phẩm phân hủy theo phương pháp đã được báo cáo [12]. Các mẫu được phân tích bằng HPLC – DAD để xác định xem flurbiprofen có tách hoàn toàn khỏi sản phẩm phân hủy (nếu có) hay không. Những mẫu xuất hiện sản phẩm phân hủy được pha loãng đến nồng độ khoảng 50 ng/ml rồi tiếp tục phân tích bằng HPLC – FLD để đánh giá khả năng phát xạ của các chất.

Khả năng phân tách của flurbiprofen khỏi tá dược được đánh giá như sau: Chuẩn bị mẫu trắng là một hỗn hợp gồm các tá dược với thành phần tương tự như trong mẫu viên nén cân định lượng. Cân 50 mg hỗn hợp cho vào bình định mức 50 ml, thêm pha động sắc ký đến vạch, siêu âm khoảng 15 phút rồi lọc qua giấy lọc Whatman® 40. Hút 1 ml dung dịch thu được, lọc qua đầu lọc cellulose tái sinh Minisart® 0,45 μ m. Tiến hành sắc ký dung dịch này với đầu dò FLD, xác định xem tại thời điểm tương ứng với thời gian lưu của Flurbiprofen có xuất hiện pic hay không.

Xác định tính tuyến tính và miền giá trị

Từ chất chuẩn flurbiprofen ban đầu, pha dung dịch có nồng độ 1000 ng/ml trong acetonitrile. Pha loãng dung dịch trên trong pha động để tạo thành dãy gồm 5 dung dịch chuẩn có nồng độ 100, 50, 25, 10, 5 ng/ml. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn để xây dựng phương trình hồi quy giữa diện tích pic tín hiệu y (counts.min) và nồng độ chất phân tích x (ng/ml). Xác định giá trị R . Sử dụng trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số a , b ;

trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình.

Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng phương pháp pha loãng dung dịch chuẩn. LOD là nồng độ flurbiprofen thấp nhất cho pic có chiều cao gấp 2 - 3 lần đường nền ở tất cả 3 lần sắc ký. LOQ là nồng độ cho pic có chiều cao gấp 10 lần đường nền ở tất cả 3 lần sắc ký.

Thẩm định độ đúng

Độ đúng của phương pháp được thẩm định bằng cách đánh giá tỷ lệ phục hồi của dãy dung dịch chuẩn trong khoảng tuyến tính đã phân tích. Tỷ lệ phục hồi được tính bằng tỷ lệ phần trăm giữa nồng độ xác định được từ thực nghiệm so với nồng độ dung dịch chuẩn.

Thẩm định độ chính xác

Độ lặp lại: tiến hành định lượng 3 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 100, 25, 5 ng/ml, mỗi dung dịch 3 lần trong cùng một ngày. Xác định độ lệch chuẩn tương đối (RSD) giữa các lần đo.

Độ chính xác trung gian: tiến hành định lượng 3 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 100, 25, 5 ng/ml, mỗi dung dịch 3 lần, lặp lại thí nghiệm trong 3 ngày khác nhau. Xác định giá trị RSD giữa các lần đo ở 3 ngày.

Định lượng flurbiprofen trong viên nén

Lấy 20 viên nén flurbiprofen trong vỉ, tính khối lượng trung bình viên. Cạo lớp bao film và nghiền mịn trong cối sứ. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 10 mg flurbiprofen cho vào bình định mức 50 ml, thêm pha động sắc ký đến vạch, siêu âm khoảng 15 phút và lọc qua giấy lọc Whatman® 40. Hút 1 ml dịch lọc cho vào bình định mức 250 ml, thêm pha động sắc ký đến vạch. Hút 625 μ l dung dịch này cho vào bình định mức 10 ml, thêm pha động sắc ký đến vạch, thu được dung dịch có nồng độ lý thuyết 50 ng/ml, lọc qua đầu lọc cellulose tái sinh Minisart® 0,45 μ m.

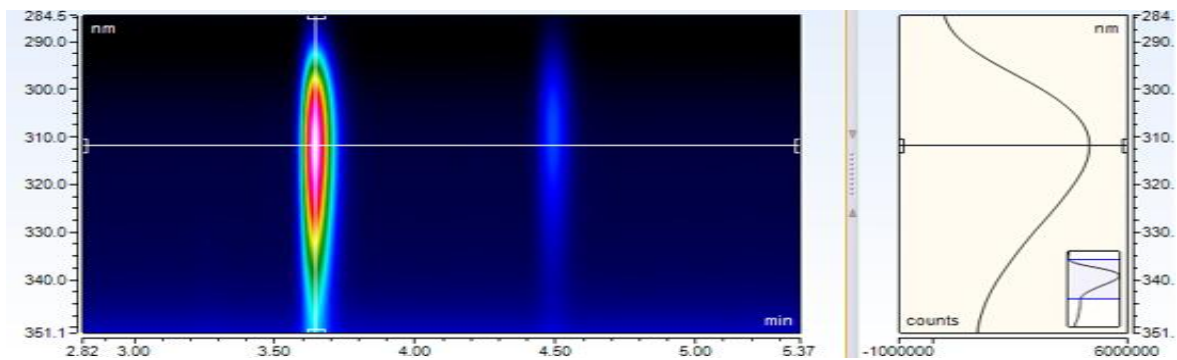
Tiến hành định lượng flurbiprofen theo phương pháp đã được thẩm định. Dựa vào phương trình hồi quy để xác định nồng độ C ng/ml của dung dịch định lượng. Hàm lượng

phần trăm flurbiprofen so với hàm lượng ghi trên nhãn được tính bằng công thức $100 \times (C/50)$. Lặp lại thí nghiệm 3 lần, lấy kết quả trung bình.

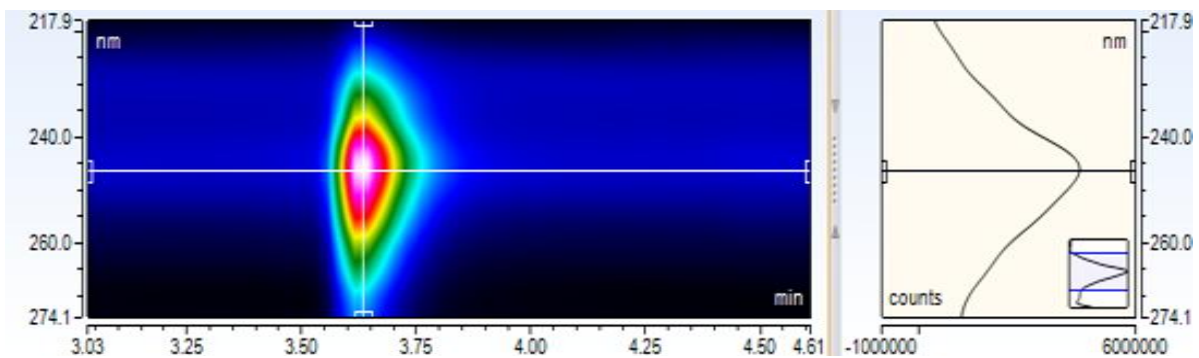
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tối ưu hoá điều kiện sắc ký

Kết quả khảo sát cho thấy khi được kích thích bằng ánh sáng có bước sóng 247 nm, flurbiprofen phát xạ ánh sáng có dải bước sóng khoảng 280 - 350 nm. Trên phổ phát xạ này có một cực đại tại 312 nm (hình 2) .



Hình 2. Phổ phát xạ của flurbiprofen tại bước sóng kích thích 247 nm.

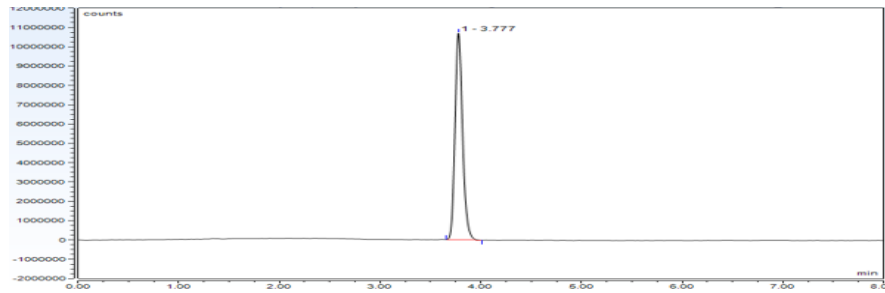


Hình 3. Phổ kích thích của flurbiprofen tại bước sóng phát xạ 312 nm.

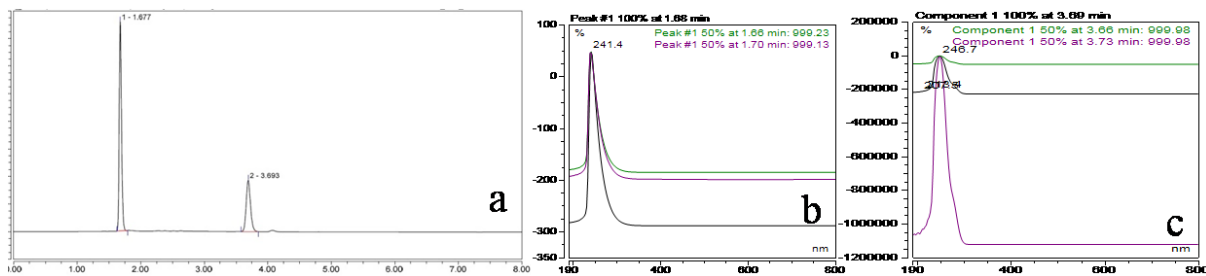
Tiếp tục quét phổ kích thích của flurbiprofen tại $\lambda_{Em} = 312$ nm. Kết quả cho thấy flurbiprofen được kích thích mạnh nhất ở bước sóng $\lambda_{Ex} = 247$ nm (hình 3), đúng bằng bước sóng hấp thụ cực đại λ_{max} .

Như vậy, kết hợp với nghiên cứu đã được công bố trước [12], điều kiện sắc ký tối ưu được xác định như sau: pha tĩnh là cột silica gel pha đảo C₈ (5 μ m, 120 Å, 4,6 \times 150 mm), pha động là hỗn hợp acetonitril : nước : acid acetic băng

với tỷ lệ 65 : 32,5 : 2,5 (v/v/v), tốc độ dòng 1 ml/phút. Mẫu được tiêm với thể tích 10 μ l, thời gian sắc ký 8 phút. Hệ thống sử dụng đầu dò huỳnh quang với bước sóng kích thích $\lambda_{Ex} = 247$ nm và bước sóng phát xạ $\lambda_{Em} = 312$ nm, nhiệt độ của buồng đo là 45°C, độ nhạy của đầu dò = 5. Tại đây flurbiprofen có thời gian lưu 3,78 phút, pic cân xứng (hệ số bất đối As = 1,19), số đĩa lý thuyết 1866,24. Sắc ký đồ được thể hiện trong hình 4.



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC - FLD của flurbiprofen tại điều kiện tối ưu.



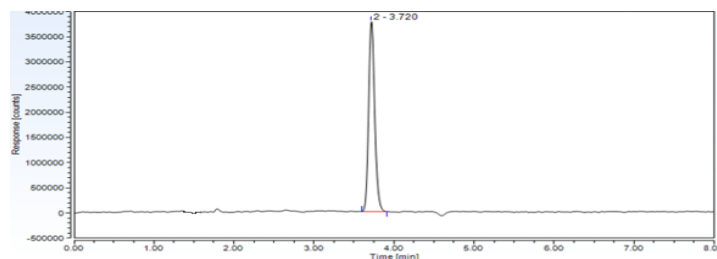
Hình 5. Sắc ký đồ HPLC – DAD của mẫu xử lý với hydro peroxid (a) và độ trùng phổ hấp thụ của pic sản phẩm phân hủy (b) và pic flurbiprofen (c).

3.2. Tính đặc hiệu

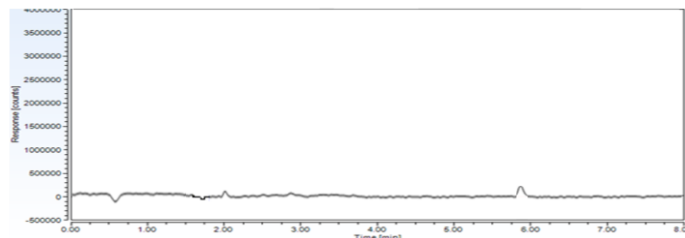
Khả năng phân tách của flurbiprofen khỏi sản phẩm phân hủy được xác định bằng cách kết hợp với đầu dò DAD trên cùng một hệ thống HPLC. Kết quả phân tích bằng HPLC - DAD cho thấy trong các mẫu được xử lý bằng axit, bazơ, chất oxy hoá, nhiệt độ và ánh sáng, flurbiprofen chỉ bị phân hủy dưới tác động của tác nhân oxy hóa H_2O_2 . Trên sắc ký đồ xuất hiện pic mới có thời gian lưu 1,68 phút, tách hoàn toàn khỏi pic flurbiprofen. Độ phân giải của hai pic này là 10,75. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết thông qua sự trùng phổ hấp thụ

cho thấy cả hai pic đều tinh khiết với độ tương xứng đạt trên 999 (hình 5). Phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt về thời gian lưu của flurbiprofen trong các mẫu được xử lý và trong mẫu chuẩn ($t = 0,23 < t_{0,05}(28) = 2,048$) [12].

Mẫu bị phân hủy dưới tác động của H_2O_2 được pha loãng đến nồng độ khoảng 50 ng/ml và tiến hành sắc ký với đầu dò FLD. Tại vị trí tương ứng với thời gian lưu của sản phẩm phân hủy không thấy có pic (hình 6). Điều đó chứng tỏ trong điều kiện phân tích được sử dụng, sản phẩm phân hủy không phát huỳnh quang



Hình 6. Sắc ký đồ HPLC - FLD của mẫu xử lý với hydro peroxid.



Hình 7. Sắc ký đồ HPLC - FLD của mẫu trắng.

Trên sắc ký đồ HPLC - FLD của mẫu trắng không có pic nào xuất hiện tại thời điểm tương ứng với thời gian lưu của flurbiprofen (hình 7). Như vậy phương pháp được xây dựng đảm bảo tính đặc hiệu với flurbiprofen.

3.3. Tính tuyến tính và miền giá trị

Phân tích mối tương quan giữa diện tích pic y (Counts.min) và nồng độ dung dịch flurbiprofen x (ng/ml) trong khoảng 5 – 100 ng/ml thu được phương trình $y = 15098x + 165896$ với hệ số tương quan $R = 0,9999$, độ lệch chuẩn $S = 80,6506$ (bảng 1).

Bảng 1: Phân tích hồi quy tương quan giữa diện tích pic và nồng độ flurbiprofen

Nồng độ flurbiprofen x (ng/ml)	Diện tích pic y (Counts.min)
100	1672096,03
50	930183,38
25	539559,79
10	316275,01
5	240012,08
Khoảng định lượng	5 – 100 ng/ml
Phương trình hồi quy	$y = 15098x + 165896$
Độ lệch chuẩn S	80,6506
Hệ số tương quan R	0,9999

Qua trắc nghiệm Fischer, phương trình được chứng minh là có tính tương thích ($F = 35044,83 > F_{0,05} = 10,13$). Qua trắc nghiệm Student, hệ số a có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 187,20 > t_{0,05} = 2,353$), hệ số b có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 2056,97 > t_{0,05} = 2,353$). Như vậy, trong khoảng nồng độ được khảo sát, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ flurbiprofen, phương trình hồi quy có dạng $y = 15098x + 165896$.

3.4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Bằng phương pháp pha loãng dung dịch chuẩn đã xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp $LOD = 0,010$ ng/ml và giới hạn định lượng $LOQ = 0,025$ ng/ml. Như vậy, khi tiến hành phân tích trên cùng một hệ thống HPLC, đầu dò FLD có LOD thấp hơn 5000 lần và LOQ thấp hơn 6000 lần so với đầu dò DAD ($LOD = 0,05$ μg , $LOQ = 0,15$ $\mu\text{g/ml}$ [12]).

3.5. Độ đúng

Tỷ lệ phục hồi của dãy dung dịch flurbiprofen có nồng độ trong khoảng tuyến tính được trình bày trong bảng 2. Kết quả thu được cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng với các giá trị của độ phục hồi đều nằm trong khoảng $\leq 100 \pm 2\%$.

Bảng 2. Tỷ lệ phục hồi của dãy dung dịch flurbiprofen trong khoảng tuyến tính

Nồng độ dung dịch chuẩn (ng/ml)	Nồng độ thực nghiệm (ng/ml)	Tỷ lệ phục hồi (%)
100,00	99,76	99,76
50,00	50,62	101,24
25,00	24,75	99,00
10,00	9,96	99,60
5,00	4,91	98,18

Bảng 3. Độ lệch chuẩn giữa các lần đo trong cùng một ngày

Nồng độ dung dịch chuẩn (ng/ml)	Diện tích pic (Counts.min)	Diện tích pic trung bình (Counts.min)	SD	RSD (%)
100,00	1672096,03	1653902,11	29255,9102	1,77
	1620154,71			
	1669455,60			
25,00	539559,89	541246,83	3413,7542	0,63
	545175,66			
	539005,03			
5,00	240012,08	242178,37	5041,1741	2,08
	247940,60			
	238582,43			

3.6. Độ chính xác

Độ lặp lại
 Khi tiến hành sắc ký 3 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 100, 25, 5 ng/ml, mỗi dung dịch 3 lần trong cùng một ngày, giá trị RSD giữa các lần đo đều nhỏ hơn 2,08% (bảng 3).

Độ chính xác trung gian
 Tiến hành sắc ký 3 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 100, 25, 5 ng/ml, trong 3 ngày khác nhau, giá trị RSD giữa các ngày đều nhỏ hơn 2,96% (bảng 4).

Bảng 4. Độ lệch chuẩn giữa các lần đo trong 3 ngày khác nhau

Nồng độ dung dịch chuẩn (ng/ml)	Ngày	Diện tích pic (Counts.min)	Diện tích pic trung bình (Counts.min)	SD	RSD (%)
100,00	1	1653902,11	1678095,77	24097,54	1,44
	2	1702096,0333			
	3	1678289,1467			
25,00	1	541246,83	536648,54	15883,83	2,96
	2	518972,86			
	3	549725,93			
5,00	1	242178,37	244019,93	6156,00	2,52
	2	250886,53			
	3	238994,90			

Bảng 5. So sánh độ chính xác của một số phương pháp định lượng flurbiprofen

Phương pháp	Độ lặp lại	Độ chính xác trung gian
Đo độ hấp thụ quang [11]	RSD ≤ 3,10 %	RSD ≤ 3,20%
Đo độ phát xạ huỳnh quang [11]	RSD ≤ 2,05%	RSD ≤ 3,80%
HPLC – DAD [12]	RSD ≤ 1,73 %	RSD ≤ 2,34 %
LC - MS/MS [13]	RSD ≤ 2,20%	RSD ≤ 3,40%
GC - MS [16]	RSD ≤ 2,65%	RSD ≤ 3,64%
HPLC - FLD	RSD ≤ 2,08 %	RSD ≤ 2,96 %

Bảng 5 thể hiện độ chính xác của một số phương pháp định lượng flurbiprofen đã được báo cáo. So sánh các giá trị RSD trong bảng cho thấy phương pháp được xây dựng (HPLC - FLD) có độ chính xác cao.

3.7. Định lượng flurbiprofen trong viên nén

Áp dụng phương pháp được xây dựng để định lượng flurbiprofen trong viên nén bao phim Antadys 100 mg (Theramex, Pháp, lot: 1M620 012014). USP 40 - NF 35 quy định viên nén flurbiprofen phải chứa 90 - 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn [19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng tỷ lệ dung môi chiết cao gấp 15 lần so với tỷ lệ được đề xuất trong USP 40 - NF 35: 50 ml pha động cho lượng bột thuốc chứa tương đương 10 mg flurbiprofen. Sau đó pha loãng dung dịch với pha động để thu được dung dịch có nồng độ lý thuyết 50 ng/ml. Tiến hành sắc ký 3 lần, lấy diện tích pic trung bình để tính nồng độ C (ng/ml) của dung dịch định lượng. Lặp lại thí nghiệm 3 lần.

Kết quả thu được khối lượng trung bình viên là 420,7 mg, diện tích pic trung bình là 904339,18 Counts.min. Từ đó tính được nồng độ dung dịch định lượng trung bình là 48,91 ng/ml. Như vậy hàm lượng flurbiprofen trong viên nén bằng 97,82% hàm lượng ghi trên nhãn, nằm trong khoảng 90 - 110%, đạt tiêu chuẩn của USP 40 - NF 35.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng flurbiprofen trong viên nén theo các hướng dẫn của ICH và EMA. Phương pháp HPLC - FLD sử dụng pha tĩnh là cột silica gel C₈ 5 μm, 120 Å, kích thước 4,6×150 mm, pha động là hỗn hợp ACN : H₂O : CH₃COOH với tỷ lệ 65 : 32,5 : 2,5 (v/v/v), bước sóng kích thích λ_{Ex} = 247 nm và bước sóng phát xạ λ_{Em} = 312 nm. Trong khoảng nồng độ 5 - 100 ng/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch. LOD và LOQ lần lượt là 0,010 và 0,025 ng/ml. Phương pháp có tính đặc hiệu, độ đúng

và độ chính xác tốt. Kết quả nghiên cứu có thể được ứng dụng trong công tác kiểm nghiệm, đảm bảo chất lượng thuốc đồng thời là tiền đề quan trọng để phát triển các nghiên cứu tiếp theo như định lượng flurbiprofen trong các dạng bào chế khác, bào chế, đánh giá tương đương sinh học, dược động học của các thuốc giảm đau kháng viêm chứa flurbiprofen.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin cảm ơn Khoa Y Dược - Đại học Quốc gia Hà Nội đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu (đề tài mã số CS.17.01).

Tài liệu tham khảo

- [1] Maroof K, Zafar F, Ali H, Naveed S. Flurbiprofen: A Potent Pain Reliever. *J Bioequiv Availab*. 2015; 7 (1): 056-058
- [2] Thebault JJ, Lagrue G, Blatrix CE, Cheynier L, Cluzan R. Clinical pharmacology of flurbiprofen: a novel inhibitor of platelet aggregation. *Curr Med Res Opin*. 1977; 5 (1): 130-134
- [3] Geerts H. Drug evaluation: (R)-flurbiprofen - an enantiomer of flurbiprofen for the treatment of Alzheimer's disease. *Idrugs*. 2007; 10 (2): 121-133.
- [4] McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease A review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*. 1996; 47 (2): 425-432.
- [5] Meister S, Zlatev I, Stab J, Docter D, Baches S, *et al*. Nanoparticulate flurbiprofen reduces amyloid-β 42 generation in an in vitro blood-brain barrier model. *Alzheimer's research & therapy*. 2013; 5 (6): 51-63.
- [6] Drugbank. <http://www.drugbank.ca>. Flurbiprofen. Consulted jun 20th 2017.
- [7] Bhaskar K, Anbu J, Ravichandiran V, Venkateswarlu V, Rao YM. Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Lipids in health and disease*. 2009; 8: 6-21.
- [8] Gonzalez-Mira E, Egea MA, Souto EB, Calpena AC, Garcia ML. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for

- ocular delivery. *Nanotechnology*. 2010; 22 (4): 045101.
- [9] Zhao X, Li W, Luo Q, Zhang X. Enhanced bioavailability of orally administered flurbiprofen by combined use of hydroxypropyl-cyclodextrin and poly (alkyl-cyanoacrylate) nanoparticles. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2014; 39 (1): 61-67.
- [10] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia 9th edition*. 2017.
- [11] Bilal Y, Emrah A. Spectrofluorometric and UV Spectrophotometric Methods for the Determination of Flurbiprofen in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015; 4 (4): 1-8
- [12] Nguyễn TTB, Đặng NA, Trần MA, Nguyễn TH. Xây dựng quy trình định lượng flurbiprofen trong viên nén bao phim 100 mg bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò diode-array. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Y Dược*. 2017; 33 (2): 41-49
- [13] Chenghan M, Bin L, Qiangfeng Y, Jing J, Ting X, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantification of flurbiprofen in human plasma and its application in a study of bioequivalence. *Journal of Chromatography B*. 2015; 993-994: 69-74.
- [14] Lee HI, Choi CI, Byeon CY, Lee JE, Park SY, *et al.* Simultaneous determination of flurbiprofen and its hydroxy metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical application. *Journal of chromatography B*. 2014; 971: 58-63.
- [15] Mano N, Narui T, Nikaido A, Goto J. Separation and determination of diastereomeric flurbiprofen acyl glucuronides in human urine by LC/ESI-MS with a simple column-switching technique. *Drug Metabol Pharmacokin*. 2002; 17: 142-149.
- [16] Yilmaz B, Emrah A. Determination of flurbiprofen in pharmaceutical preparations by GC-MS. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015; 59: 38-44.
- [17] European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011; 9-10.
- [18] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. 2005; 6-13.
- [19] United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia 40-NF 35*. 2017

Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method with Fluorescence Detection for the Quantification of Flurbiprofen in Tablets

Nguyen Thi Thanh Binh, Tran Mai Anh, Duong Hai Thuan,
Nguyen Huu Tung, Bui Thanh Tung

VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Abstract: In this study, a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection was developed for the quantification of flurbiprofen in tablets. A C₈ reverse phase column (5 μm, 120 Å, 4.6×150 mm) was used with a mobile phase of acetonitrile : water : glacial acetic acid (65 : 32.5 : 2.5, v/v/v) . The flow rate was 1 ml/min and the column effluent was monitored within 8 minutes. The excitation and emission wavelength were respectively 247 nm and 312 nm. The temperature of flow cell was set at 45°C and detector sensitivity was 5. The retention time of flurbiprofen was found to be 3.78 minutes. The method was validated under the concentration range of 5 - 100 ng/ml with a tight linear correlation between peak area and sample concentration (R = 0.9999). The proposed method was found to be specific to flurbiprofen, accurate and precise. The percentage recovery was ≤ 100 ± 2%, the relative standard deviation of the repeatability was ≤ 2.08% and the relative standard deviation of the intermediate precision was ≤ 2.96%. The limit of detection and limits of quantification were respectively 0.010 and 0.025 ng/ml.

Keywords: Flurbiprofen, quantification, high-performance liquid chromatography, fluorescence detection.