

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

Nguyễn Thị Thanh Bình*, Đặng Ngọc Anh, Trần Mai Anh, Nguyễn Thanh Hải

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

Nhận ngày 30 tháng 10 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 14 tháng 11 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 06 tháng 12 năm 2017

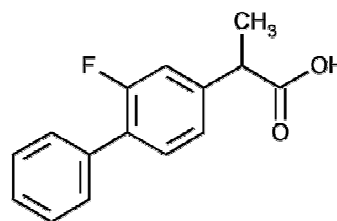
Tóm tắt: Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng flurbiprofen trong viên nén bao phim 100 mg bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò diode-array theo hướng dẫn của Cơ quan quản lý thuốc châu Âu và Hội nghị quốc tế về hài hoà hoá các yêu cầu kỹ thuật để đăng ký dược phẩm sử dụng trên người. 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 với tỷ lệ 65 : 32,5 : 2,5, tốc độ dòng 1 ml/phút. Mẫu được tiêm với thể tích 10 µl, thời gian sắc ký 8 phút, bước sóng phát hiện 247 nm. Thời gian lưu của flurbiprofen là 3,73 phút. Kết quả thực nghiệm cho thấy trong khoảng nồng độ từ 2 - 20 µg/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic y (mAU.min) và nồng độ dung dịch x (µg/ml) theo phương trình $y = 0,680x$ với hệ số xác định $R^2 = 0,9993$. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 0,05 và 0,15 µg/ml. Phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu với flurbiprofen, có độ đúng và độ chính xác tốt với tỷ lệ phục hồi $\leq 100 \pm 2\%$, độ lệch chuẩn tương đối của độ lặp lại $\leq 1,71\%$, độ lệch chuẩn tương đối của độ chính xác trung gian $\leq 2,34\%$.

Từ khóa: Flurbiprofen, định lượng, sắc ký lỏng hiệu năng cao, đầu dò diode-array.

1. Đặt vấn đề

Flurbiprofen là dẫn xuất của axit propionic thuộc nhóm thuốc chống viêm không steroid (NSAID) với tác dụng giảm đau, hạ sốt. Flurbiprofen được sử dụng bằng đường uống để điều trị tấn công trong các bệnh viêm gân cấp tính, viêm xương khớp cấp tính, đau thắt lưng. Viên nén và gel dùng ngoài chứa flurbiprofen có tác dụng điều trị triệu chứng của bệnh viêm khớp dạng thấp, viêm xương khớp và viêm cột sống dính khớp. Thuốc nhỏ mắt flurbiprofen được sử dụng tại chỗ trước các phẫu thuật nhãn

khoa nhằm ngăn ngừa và làm giảm co đồng tử trong lúc mổ [1-5]. Một tính chất đáng lưu ý của flurbiprofen là rất kém tan trong nước, chính vì vậy, việc bào chế các hệ dẫn thuốc kích thước nano có cấu trúc lipid như nanolipid rắn, nhũ tương nano,... là hướng nghiên cứu đang được quan tâm trên thế giới [6-9].



Hình 1. Công thức cấu tạo flurbiprofen.

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-1687768293.

Email: binhnguyen@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4085>

Hiện nay flurbiprofen được sử dụng rộng rãi ở nhiều nước, đặc biệt là các nước châu Âu và Bắc Mỹ dưới nhiều tên thương mại khác nhau như Antadys, Flufen, Maprofen, Ocufer, Zentofen,... Tuy nhiên, các thuốc này lại chưa phổ biến ở Việt Nam, trong dược điển Việt Nam IV cũng không có chuyên luận về flurbiprofen. Cho đến thời điểm hiện tại, trong nước chưa có nghiên cứu nào về flurbiprofen được công bố. Như vậy, phát triển các nghiên cứu về flurbiprofen là một hướng mới tại Việt Nam, tạo điều kiện cho bệnh nhân có thêm một lựa chọn thuốc trong điều trị. Xây dựng phương pháp định lượng flurbiprofen theo tiêu chuẩn quốc tế là công việc hết sức cần thiết nhằm kiểm soát chất lượng thuốc đồng thời 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.

Các phương pháp định lượng flurbiprofen trong dược phẩm và trong dịch sinh học đã được công bố bao gồm chuẩn độ [10], quang phổ [11], sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [12-16], sắc ký khí [17]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình định lượng hoạt chất trong dạng bào chế thông dụng nhất hiện nay của flurbiprofen là viên nén bao phim 100 mg bằng phương pháp HPLC ghép đầu dò diode-array (DAD) theo hướng dẫn của Cơ quan quản lý thuốc châu Âu (European Medicines Agency - EMA) [18] 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) [19].

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), acid clorhydric (HCl), acid acetic (CH_3COOH), hydro peroxid (H_2O_2) đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích, acetonitril

(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 $\Omega\cdot\text{m}$. Mẫu dược phẩm được định lượng là viên nén bao phim Anadys 100 mg (Theramex, Pháp; lot: 2M653 05 2015).

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 phận tiêm mẫu tự động. Đầu dò DAD 3000 Dionex sử dụng đèn Deuterium cho khoảng UV và tungsten cho khoảng VIS. Cột silica gel pha đảo Thermo Scientific Acclaim 120 C_{18} và C_8 có cùng 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:

Sử dụng dung dịch chuẩn flurbiprofen nồng độ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ để khảo sát. Quét phổ hấp thụ của dung dịch trên trong khoảng 190 - 800 nm để tìm bước sóng hấp thụ cực đại. Khảo sát các điều kiện sắc ký khác nhau như: pha tĩnh: cột silica gel pha đảo C_{18} và C_8 ; pha động: hỗn hợp các dung môi ACN, H_2O và CH_3COOH với các tỷ lệ khác nhau; thể tích tiêm mẫu: 5, 10, 15, 20, 40 μl . Duy trì tốc độ dòng 1 ml/phút. Xác định điều kiện sắc ký cho pic đạt độ đối xứng tốt, tỷ lệ diện tích pic trên nồng độ và chiều cao pic trên nồng độ lớn nhất.

Xác định tính đặc hiệu của phương pháp

Để xác định tính đặc hiệu của phương pháp, flurbiprofen được xử lý với các yếu tố khác nhau như acid, base, oxy hoá, nhiệt độ và ánh sáng nhằm làm phân huỷ mẫu. Cụ thể như sau:

- **Acid hoặc base:** Lấy 0,5 ml dung dịch flurbiprofen 1000 $\mu\text{g/ml}$ cho vào ống nghiệm. Thêm 2 ml dung dịch HCl 5 M hoặc 2 ml dung dịch NaOH 5 M, đun nóng ở nhiệt độ $80 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 3 giờ, để nguội về nhiệt độ phòng, rồi trung hoà hỗn hợp bằng lượng acid hoặc base tương ứng.

- **Oxi hoá:** Lấy 0,5 ml dung dịch flurbiprofen 1000 $\mu\text{g/ml}$ cho vào ống nghiệm. Thêm 2 ml dung dịch H_2O_2 6%, đun nóng ở nhiệt độ $80 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 3 giờ.

- **Nhiệt độ:** Lấy 0,5 ml dung dịch flurbiprofen 1000 $\mu\text{g/ml}$ cho vào ống nghiệm. Thêm 2 ml dung dịch pha động, đun nóng ở nhiệt độ $80 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 3 giờ.

- **Ánh sáng:** Lấy 0,5 ml dung dịch flurbiprofen 1000 $\mu\text{g/ml}$ cho vào ống nghiệm, cho tiếp xúc với ánh sáng mặt trời trong 5 giờ.

Hỗn hợp sau phản ứng được pha loãng thành 25 ml trong pha động, lọc qua màng cellulose tái sinh 0,45 μm (Minisart[®] RC, Sartorius, Đức) rồi tiến hành sắc ký. Dựa vào thời gian lưu và độ tinh khiết của pic để xác định khả năng phân tách của flurbiprofen khỏi sản phẩm phân hủy (nếu có).

Xác định tính tuyến tính và miền giá trị

Từ chất chuẩn flurbiprofen ban đầu, pha dung dịch có nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$ trong acetonitrile. Pha loãng dung dịch trên trong pha động để tạo thành dãy gồm 6 dung dịch chuẩn có nồng độ 2, 4, 8, 12, 16, 20 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn để xây dựng phương trình hồi quy giữa diện tích pic tín hiệu y (mAU.min) và nồng độ chất phân tích x ($\mu\text{g/ml}$). Xác định giá trị R^2 . Sử dụng trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa 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) của phương pháp 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 2, 8, 20 $\mu\text{g/ml}$, 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 2, 8, 20 $\mu\text{g/ml}$, 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 bao phim 100 mg

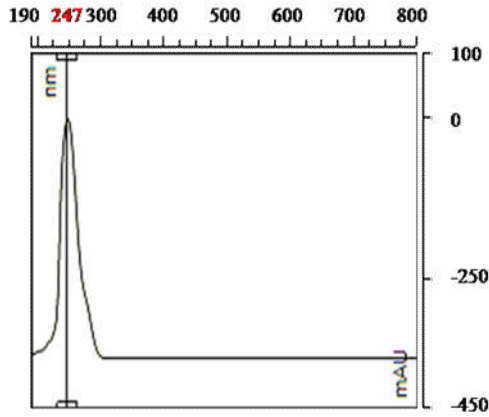
Cân 10 viên chế phẩm, tính khối lượng trung bình viên đã loại bỏ lớp bao phim rồi nghiền mịn trong cối sứ. Cân lượng bột thuốc tương đương với 50 mg flurbiprofen cho vào bình định mức 50 ml, thêm pha động sắc ký đến vạch, siêu âm 15 phút và lọc qua giấy lọc giấy lọc Whatman[®] 40. Pha loãng 1 ml dung dịch 100 lần trong pha động, lọc qua màng cellulose tái sinh 0,45 μm . Tiến hành định lượng flurbiprofen theo phương pháp đã được thẩm định. Dựa vào phương trình hồi quy để xác định nồng độ C $\mu\text{g/ml}$ của dung dịch định lượng. Hàm lượng phân trăm flurbiprofen so với hàm lượng ghi trên nhãn được tính bằng công thức $100(C/10)$. 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

Trên phổ hấp thụ UV-VIS của flurbiprofen trong khoảng 190 - 800 nm có một cực đại tại

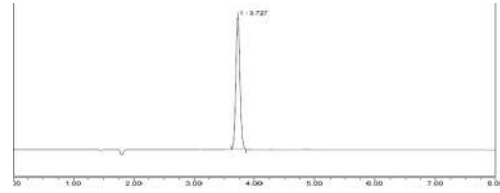
247 nm (hình 2). Bước sóng này được chọn làm bước sóng phát hiện.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV-VIS của flurbiprofen trong khoảng 190 - 800 nm.

Trong quá trình khảo sát, khi sử dụng pha tĩnh là silica gel C_{18} và pha động là hỗn hợp ACN : H_2O với các tỷ lệ tăng dần từ 60 : 40 đến 80 : 20, thời gian lưu của flurbiprofen giảm dần từ 5,13 xuống 2,65 phút. Tuy nhiên, pic có hình dạng không cân xứng với hệ số bất đối $As = 0,69 - 2,02$. Việc thêm 2,5% CH_3COOH vào pha động có tác dụng chuyển flurbiprofen về dạng không ion hóa, và do đó tình trạng kéo đuôi của pic được cải thiện nhưng không hoàn toàn mất hẳn. Thêm CH_3COOH vào pha động đồng thời thay pha tĩnh bằng silica gel C_8 đã giúp giải quyết được tình trạng này. Qua khảo sát cũng đã xác định được thể tích tiêm mẫu cho tỷ lệ diện tích pic trên nồng độ và chiều cao pic trên nồng độ lớn nhất là 10 μl .

Từ thực nghiệm đã chọn được điều kiện sắc ký tối ưu như sau: Pha tĩnh là silica gel C_8 5 μm , 120 Å trong cột 4,6 mm x 150 mm, pha động ACN : H_2O : CH_3COOH tỷ lệ 65 : 32,5 : 2,5, thể tích tiêm mẫu 10 μl , tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò ghi nhận tín hiệu tại bước sóng 247 nm, thời gian sắc ký 8 phút. Flurbiprofen có thời gian lưu 3,73 phút, pic cân xứng ($As = 1,08$), số đĩa lý thuyết là 3491. Sắc ký đồ được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Sắc ký đồ của flurbiprofen tại điều kiện tối ưu.

3.2. Tính đặc hiệu

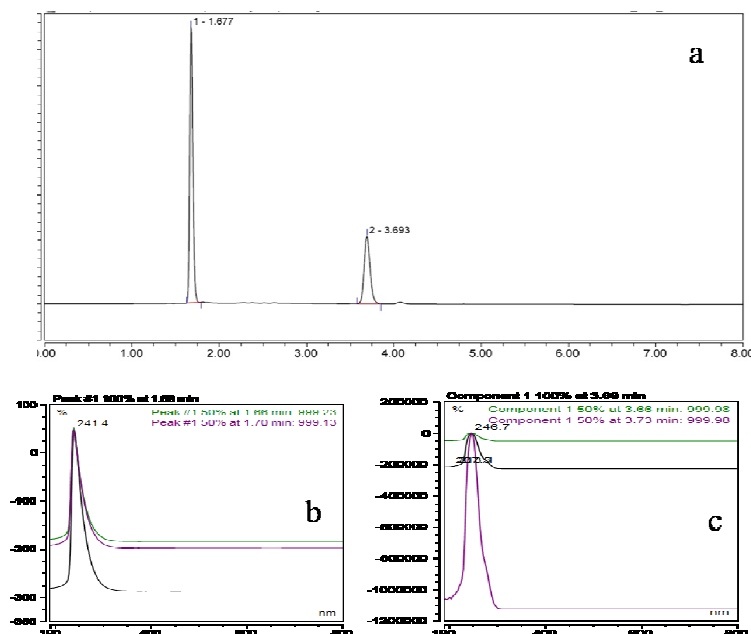
Khi xử lý mẫu với acid, base, chất oxy hoá, nhiệt độ và ánh sáng trong các điều kiện như đã mô tả, flurbiprofen chỉ bị phân huỷ dưới tác động của tác nhân oxy hóa H_2O_2 . Trên sắc ký đồ xuất hiện thêm một pic mới có thời gian lưu 1,68 phút, tách ra hoàn toàn khỏi pic flurbiprofen. Độ phân giải của hai pic này là 10,75. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết thông qua sự trùng phổ hấp thụ theo thời gian lưu cho thấy cả hai pic đều tinh khiết với độ tương xứng đạt trên 999 (hình 4). 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 ($t = 0,23 < t_{0,05}(28) = 2,048$). Các kết quả trên cho phép khẳng định tính đặc hiệu của phương pháp phân tích.

3.3. Tính tuyến tính và miền giá trị

Phân tích mối tương quan giữa diện tích pic y (mAU.min) và nồng độ dung dịch flurbiprofen x ($\mu g/ml$) trong khoảng 2 - 20 $\mu g/ml$ thu được phương trình $y = 0,680x + 0,022$ với hệ số xác định $R^2 = 0,9993$, độ lệch chuẩn $S = 0,00885$ (bảng 1).

Qua trắc nghiệm Fischer, phương trình được chứng minh là có tính tương thích ($F = 5907,328 > F_{0,05} = 10,13$). Qua trắc nghiệm Student, hệ số $a = 0,68$ có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 76,86 > t_{0,05} = 2,132$), hệ số $b = 0,022$ không có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 0,85 < t_{0,05} = 2,132$). Từ đó, phương trình hồi quy được đưa về dạng $y = 0,680x$.

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. Độ lệch của các giá trị thực nghiệm so với giá trị hồi quy rất gần với 0 chứng tỏ khoảng tin cậy của phương trình hồi quy hẹp.



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu xử lý với hydro peroxid (a) và độ trùng phổ hấp thụ theo thời gian lưu của các pic: sản phẩm phân hủy (b), flurbiprofen (c).

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

Nồng độ flurbiprofen x (µg/ml)	Diện tích pic y (mAU.min)
2,00	1,38
4,00	2,73
8,00	5,53
12,00	8,24
16,00	10,68
20,00	13,76
Khoảng định lượng	2 - 20 µg/ml
Phương trình hồi quy	$y = 0,680x + 0,022$
Độ lệch chuẩn S	0,00885
Hệ số xác định R ²	0,9993

3.4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Bằng phương pháp pha loãng đã xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp LOD = 0,05 µg/ml và giới hạn định lượng của phương pháp LOQ = 0,15 µg/ml.

3.5. Độ đúng

Tỷ lệ phục hồi của dãy dung dịch flurbiprofen có nồng độ trong khoảng tuyến tính đã phân tích 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 $\leq 100 \pm 2\%$.

3.6. Độ chính xác

Độ lặp lại

Khi tiến hành sắc ký 3 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 20, 8, 2 µg/ml, mỗi dung dịch 3 lần trong cùng một ngày, giá trị RSD giữa các lần đo đều nhỏ hơn 1,71% (bảng 3).

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

Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ thực nghiệm ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)
2,00	2,03	101,47
4,00	4,01	100,37
8,00	8,13	101,65
12,00	12,12	100,98
16,00	15,71	98,16
20,00	20,24	101,18

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

Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.min)	Diện tích pic trung bình (mAU.min)	SD	RSD (%)
2,00	1,38	1,35	0,02	1,71
	1,34			
	1,34			
8,00	5,55	5,53	0,03	0,46
	5,53			
	5,50			
20,00	13,78	14,00	0,22	1,57
	14,22			
	13,99			

Độ chính xác trung gian

Tiến hành sắc ký 3 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 20, 8, 2 $\mu\text{g/ml}$, trong 3 ngày khác nhau, giá trị RSD giữa các ngày đều nhỏ hơn 2,34% (bảng 4).

Bảng 5 thể hiện độ chính xác của một số phương pháp định lượng flurbiprofen đã được báo cáo như đo độ hấp thụ quang [11], đo độ

phát xạ huỳnh quang [11], sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ hai lần liên tiếp (LC-MS/MS) [13], sắc ký khí ghép đầu dò khối phổ (GC-MS) [17]. So với các phương pháp này, giá trị RSD của phương pháp được xây dựng thấp hơn, điều này cho phép khẳng định đây là phương pháp có độ chính xác cao.

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

Nồng độ dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Ngày	Diện tích pic (mAU.min)	Diện tích pic trung bình (mAU.min)	SD	RSD (%)
2,00	1	1,34	1,38	0,03	2,34
	2	1,40			
	3	1,39			
8,00	1	5,53	5,55	0,10	1,73
	2	5,46			
	3	5,65			

20,00	1	14,00	13,89	0,15	1,06
	2	13,72			
	3	13,94			

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	RSD \leq 3,10 %	RSD \leq 3,20%
Đo độ phát xạ huỳnh quang	RSD \leq 2,05%	RSD \leq 3,80%
LC-MS/MS	RSD \leq 2,20%	RSD \leq 3,40%
GC-MS	RSD \leq 2,65%	RSD \leq 3,64%
Phương pháp được xây dựng	RSD \leq 1,71%	RSD \leq 2,34%

3.7. Định lượng flurbiprofen trong viên nén bao phim 100 mg

Áp dụng phương pháp được xây dựng để định lượng flurbiprofen trong viên nén bao phim Anadys 100 mg (Theramex, Pháp). USP 40-NF 35 quy định viên nén flurbiprofen phải chứa 90 - 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn [12]. Theo tài liệu này, flurbiprofen trong viên nén được chiết bằng pha động sắc ký là hỗn hợp ACN và đệm phosphate pH 3,0 (43: 57). Sử dụng 25 ml pha động cho mỗi lượng bột thuốc tương đương 75 mg flurbiprofen, sau đó pha loãng một phần dung dịch thu được 20 lần trong pha động rồi tiến hành sắc ký.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng tỷ lệ dung môi chiết cao gấp 3 lần: 50 ml pha động cho lượng bột thuốc chứa tương đương 50 mg flurbiprofen. Sau đó pha loãng 1ml dung dịch 100 lần với pha động để thu được dung dịch có nồng độ lý thuyết 10 μ g/ml. Tiến hành sắc ký 3 lần, lấy diện tích pic trung bình để tính nồng độ C μ g/ml của dung dịch định lượng. Lặp lại thí nghiệm 3 lần, kết quả được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng flurbiprofen trong viên nén bao phim Anadys 100 mg (Theramex, Pháp; lot: 2M653 05 2015)

Lần	Diện tích pic trung bình (mAU.min)	Nồng độ C (μ g/ml)	Hàm lượng (%)
1	6,33	9,31	93,1
2	6,48	9,53	95,3
3	6,37	9,37	93,7

Như vậy hàm lượng flurbiprofen trong chế phẩm bằng 94,0% hàm lượng ghi trên nhãn, đạt tiêu chuẩn USP 40–NF 35.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng được quy trình định lượng flurbiprofen trong dạng bào chế thông dụng nhất hiện nay là viên nén bao phim 100 mg theo các hướng dẫn của ICH và EMA. Phương pháp HPLC - DAD sử dụng pha tĩnh là cột silica gel C₈ 5 μ m, 120 Å, kích thước 4,6 \times 150 mm, pha động là hỗn hợp ACN : H₂O : CH₃COOH với tỷ lệ 65 : 32,5 : 2,5, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μ l, thời gian sắc ký 8 phút, bước sóng phát hiện 247 nm. Bằng cách xử lý mẫu với nhiều yếu tố khác nhau để tạo sản phẩm phân hủy đã chứng minh được tính đặc hiệu của phương pháp. Trong khoảng nồng độ 2 - 20 μ g/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch theo phương trình $y = 0,680x$ với hệ số xác định $R^2 = 0,9993$. Sử dụng phương pháp pha loãng mẫu đã xác định được LOD và LOQ lần lượt là 0,05 và 0,15 μ g/ml. So sánh với một số nghiên cứu định lượng flurbiprofen khác đã được công bố cho thấy phương pháp được xây dựng có độ đúng và độ chính xác tốt với tỷ lệ phục hồi $\leq 100 \pm 2\%$, độ lệch chuẩn tương đối của độ lặp lại $\leq 1,71\%$ và độ lệch chuẩn tương đối của độ chính xác trung gian $\leq 2,34\%$.

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] Calapai G, Imbesi S, Cafeo V, Ventura SE, Minciullo PL, *et al.* Fatal hypersensitivity reaction to an oral spray of flurbiprofen: a case report. *J Clin Pharm Ther.* 2013; 38(4): 337-338.
- [2] Geerts H. Drug evaluation: (R)-flurbiprofen--an enantiomer of flurbiprofen for the treatment of Alzheimer's disease. *Idrugs.* 2007; 10 (2): 121-133.
- [3] Mironov GG, Logie J, Okhonin V, Renaud JB, Mayer PM, Berezovski MV. Comparative study of three methods for affinity measurements: capillary electrophoresis coupled with UV detection and mass spectrometry, and direct infusion mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2012; 23 (7): 1232-120.
- [4] Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr Med Chem.* 2009; 16 (27): 3480-3675.
- [5] Drugbank. <http://www.drugbank.ca>. Flurbiprofen. Consulted jun 20th 2017.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [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 Spectrofluorometric and UV Spectrofluorometric Methods for the Determination of Flurbiprofen in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2015; 4 (4): 1-8
- [12] United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia 40-NF 35.* 2017
- [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] Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, Langley GJ, Li L, Naito Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* 2013; 85: 1515-1609.
- [16] 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.
- [17] Yilmaz B, Emrah A. Determination of flurbiprofen in pharmaceutical preparations by GC-MS. *Arabian Journal of Chemistry.* 2015; accepted.
- [18] European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation.* 2011; 9-10.
- [19] 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.

Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method with diod array detection for the Quantification of Flurbiprofen in 100 mg Film-coated Tablet

Nguyen Thi Thanh Binh, Dang Ngoc Anh, Tran Mai Anh, Nguyen Thanh Hai

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

Abstract: A high-performance liquid chromatographic method was developed for the quantification of flurbiprofen in 100 mg film-coated tablet in accordance with the direction of the European Medicines Agency and the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 10 μ l of flurbiprofen solution was injected onto a C₈ reverse phase column (5 μ m, 120 Å, 4.6 \times 150 mm). The mobile phase employed was acetonitrile : water : glacial acetic acid (65 : 32.5 : 2.5, v/v/v) at a flow rate of 1 ml/min. The column effluent was monitored within 8 minutes by diot array detection at 247 nm. The retention time of flurbiprofen was found to be 3.73 minutes. In the concentration range of 2 - 20 μ g/ml, there was a tight linear correlation between peak area y (mAU.min) and sample concentration x (μ g/ml) according to the equation $y = 0,680x$ as the squared correlation coefficient R^2 was 0.9993. The limit of detection and limite of quantification were respectively 0.05 and 0.15 μ g/ml. The method was specific to flurbiprofen with good precision and accuracy. The percentage recovery was $\leq 100 \pm 2\%$, the relative standard deviation of the repeatability was $\leq 1.71\%$ and the relative standard deviation of the intermediate precision was $\leq 2.34\%$.

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