

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG PARACETAMOL, THIICOLCHICOSID VÀ TẠP 4-AMINOPHENOL TRONG CHẾ PHẨM ĐA THÀNH PHẦN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Bá Thuận¹, Phan Thanh Dũng¹

TÓM TẮT

Mở đầu: Với nhu cầu ngày càng gia tăng trong việc điều trị các triệu chứng đau cơ xương khớp đặc biệt là bệnh đau thắt lưng, các công ty dược đã tiến hành bào chế nhiều sản phẩm có sự kết hợp hai hoạt chất paracetamol và thiocolchicosid. Tuy nhiên, các Dược điển hiện nay chưa có quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất này trong cùng một chế phẩm và tạp 4-aminophenol với nhiều độc tính cần phải kiểm soát chặt chẽ trong các chế phẩm chứa paracetamol. Các công trình đã công bố ở Việt Nam và trên thế giới cho đến nay chưa có quy trình định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol trong chế phẩm thuốc. Vì vậy, đề tài được thực hiện nhằm góp phần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chế phẩm thuốc chứa hai hoạt chất paracetamol và thiocolchicosid trong nước.

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol trong chế phẩm đa thành phần bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là chế phẩm viên nén của Phòng nghiên cứu phát triển – Công ty cổ phần dược phẩm Boston Việt Nam. Mỗi viên nén chứa 500 mg paracetamol và 2 mg thiocolchicosid. Phương pháp nghiên cứu: Dựa vào cấu trúc hóa học của các chất cần định lượng, đồng thời tham khảo chuyên luận của từng dược chất trong các Dược điển và một số công trình đã công bố thì kỹ thuật sắc ký pha đảo với đầu dò PDA được lựa chọn để khảo sát điều kiện sắc ký cho việc định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol trong chế phẩm, bao gồm khảo sát tỷ lệ pha động, dung môi pha động, pH pha động và chương trình pha động. Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, quy trình sẽ được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và theo Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, phụ lục 8.

Kết quả: Đã xác định được điều kiện sắc ký để định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol: Cột Sunfire® C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm), đầu dò PDA bước sóng phát hiện 230 nm. Pha động gồm methanol và đệm phosphat pH 7,0, chương trình gradient, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl, nhiệt độ cột 30 °C. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình đạt các yêu cầu về tính phù hợp hệ thống, có tính đặc hiệu, tính tuyến tính với khoảng xác định rộng, độ đúng, độ chính xác cao, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp.

Kết luận: Đã xây dựng thành công quy trình định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol. Quy trình này có thể được áp dụng để định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol trong chế phẩm đa thành phần.

Từ khóa: paracetamol, thiocolchicosid; 4-aminophenol, HPLC

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: PGS.TS. Phan Thanh Dũng ĐT: 0943957158

Email: dungphan@ump.edu.vn

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF PARACETAMOL, THIOCOLCHICOSIDE AND 4-AMINOPHENOL IMPURITY IN MULTI-COMPONENTS PHARMACEUTICALS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Ba Thuan, Phan Thanh Dung

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 2 - 2021: 107 - 118

Introduction: With an increased demand for treating musculoskeletal pain symptoms, especially lower back pain, pharmaceutical companies have developed a variety of products that combine the two active ingredients, paracetamol and thicolchicoside. However, the Pharmacopoeia currently does not have a process to simultaneously quantify these two active ingredients in dosage forms. Besides, 4-aminophenol impurity needs to be strictly controlled in. There have not been published studies on quantitative determination of paracetamol, thicolchicoside and 4-aminophenol in dosage forms so far. Therefore, the topic was conducted to contribute to develop quality standards for domestic products containing two active ingredients paracetamol and thicolchicoside.

Objectives: Development and validation of an analytical method for determination of impurity paracetamol, thicolchicoside and 4-aminophenol in multi-components pharmaceuticals by high performance liquid chromatography.

Materials and methods: The subject of this study was the tablet from Research and Development Department – Boston Pharmaceutical Joint Stock Company. Each tablet contains 500 mg of paracetamol and 2 mg of thicolchicoside. Methods: Basing on the chemical structure of the substances need to be quantified, the monograph of each drug substance in the Pharmacopoeia and some scientific articles, reverse phase chromatography with PDA detector was selected. The chromatographic conditions for quantification of paracetamol, thicolchicosid and 4-aminophenol impurity in the preparation were investigated including mobile phase and mobile phase program. After finding out the suitable chromatographic conditions, the procedure was validated according to the ICH guidelines.

Results: The chromatographic conditions for quantitation of paracetamol, thicolchicoside and 4-aminophenol impurity are Sunfire® C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm), PDA of detector with wavelength at 230 nm, the mobile phase consisting of methanol and phosphate buffer pH 7.0 in gradient mode, flow rate of 1.0 ml/min, injection volume of 10 μl, column temperature at 30 °C. The validation results showed that the procedure meets the requirements of system suitability, specificity, linearity with a wide range of concentration, high precision, accuracy and low of limit of detection and limit of quantitation.

Conclusion: The method was successfully developed for determination of paracetamol, thicolchicoside and 4-aminophenol. This procedure can be used for quatitation of paracetamol, thicolchicoside and 4-aminophenol inclusions in multi-component preparations.

Keywords: paracetamol, thicolchicosid; 4-aminophenol, HPLC

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đau cột sống thắt lưng - một vấn đề sức khỏe gây phiền toái rất phổ biến ở dân số trung niên, có khoảng 65 - 80% những người trưởng thành trong cộng đồng mắc đau cột sống thắt lưng cấp tính hoặc từng đợt một vài lần trong cuộc đời và khoảng 10% số này bị

chuyển thành đau mạn tính⁽¹⁾. Đây là một vấn đề sức khỏe và kinh tế xã hội lớn liên quan đến chi phí cao cho việc chăm sóc sức khỏe, nghỉ việc sớm và tàn tật⁽²⁾. Paracetamol là một trong những thuốc giảm đau được chỉ định phổ biến nhất (trên thế giới và ở Việt Nam) cho các cơn đau như đau đầu, đau răng,

đau do cảm cúm... Thiocolchicosid đã được sử dụng trong lâm sàng từ hơn 45 năm để điều trị đau cơ và co thắt cơ ở những bệnh nhân có các chấn thương chỉnh hình, thấp khớp hoặc các vấn đề về cơ xương khớp⁽³⁾. Viên phối hợp paracetamol và thiocolchicosid có tác động giãn cơ và được sử dụng ở người lớn, thanh thiếu niên từ 16 tuổi như một phương pháp điều trị hỗ trợ cho các cơn đau do co thắt cơ bắp như đau thắt lưng. Thuốc cũng được sử dụng cho các đợt cấp tính liên quan đến cột sống⁽⁴⁾. Tuy nhiên, Dược điển Việt Nam V, USP 41 chưa có chuyên luận về hoạt chất thiocolchicosid, trong khi đó BP 2019, EP 10.0 chỉ có chuyên luận của nguyên liệu thiocolchicosid còn Dược điển Ấn Độ 2018 chỉ có chuyên luận định lượng thiocolchicosid trong chế phẩm đơn thành phần chưa có chuyên luận cho chế phẩm phối hợp. Mặt khác, paracetamol với tạp chất 4-aminophenol được quan tâm vì tạp chất này có nhiều độc tính trên cơ thể^(5,6). Theo USP 41⁽⁷⁾ hàm lượng tạp chất 4-aminophenol trong nguyên liệu paracetamol không được quá 0,005% và trong các chế phẩm chứa paracetamol không được quá 0,15% còn theo DĐVN V⁽⁸⁾ đối với các chế phẩm chứa paracetamol thì pic tương ứng với 4-aminophenol trong dung dịch thử không được có diện tích lớn hơn pic tương ứng với 4-aminophenol trong dung dịch đối chiếu (0,1%). Chính vì thế việc kiểm soát tạp chất 4-aminophenol là yêu cầu tiên quyết khi sản xuất và lưu hành các chế phẩm chứa hoạt chất paracetamol trên thị trường. Hiện nay, vẫn chưa có tác giả nào công bố quy trình định lượng paracetamol, thiocolchicosid và tạp chất 4-aminophenol trong chế phẩm thuốc. Patel C. M. và cộng sự (2013)⁽⁹⁾ đã xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích để định lượng đồng thời paracetamol và thiocolchicosid bằng phương pháp HPLC pha đảo trong nguyên liệu và chế phẩm thuốc, còn Rao R. và cộng sự (2006)⁽¹⁰⁾ đã xây dựng một phương pháp tách

và định lượng nhanh chóng các tạp chất liên quan của paracetamol bằng phương pháp HPLC pha đảo với đầu dò PDA. Nhằm đáp ứng nhu cầu ngày càng gia tăng trong việc điều trị các triệu chứng đau cơ xương khớp đặc biệt là bệnh đau thắt lưng, các công ty dược đã tiến hành bào chế nhiều sản phẩm có sự kết hợp hai hoạt chất paracetamol và thiocolchicosid. Do đó việc xây dựng quy trình định lượng hai hoạt chất này và tạp chất 4-aminophenol của paracetamol trong chế phẩm thuốc là cần thiết, góp phần quan trọng vào việc kiểm tra chất lượng thuốc một cách nhanh chóng, chính xác, giảm được thời gian và công sức khi tiến hành định lượng từng thành phần riêng rẽ.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm viên nén của Phòng nghiên cứu phát triển – Công ty cổ phần dược phẩm Boston Việt Nam. Mỗi viên nén chứa: Paracetamol 500 mg, thiocolchicosid 2 mg, tá dược (Magie stearat, hydroxypropyl cellulose, natri starch glycollat, talc, starch maize) vừa đủ 1 viên.

Chất đối chiếu

Paracetamol (99,5%), 4-aminophenol (99,4%) được cung cấp bởi Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh, thiocolchicosid (99,6%) được cung cấp bởi công ty Hangzhou Dingyan Chem Co.,Ltd (Trung Quốc) với hàm lượng tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Dung môi, hóa chất

Hóa chất đạt tiêu chuẩn phân tích: Methanol, dinatri hydrophosphat, acid phosphoric đậm đặc (Merck), đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng: Methanol, acetonitril (J.T.Baker).

Trang thiết bị

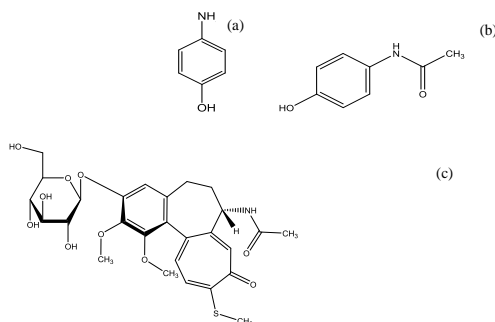
Hệ thống HPLC Waters Alliance e2695 với đầu dò PDA Waters 2996 (Mỹ), cột sắc ký Sunfire® C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) Waters (Mỹ), máy đo pH Metler Toledo S20 (Mỹ), bể siêu âm Elmasonic S900H (Mỹ), tủ sấy

Memmert WM 500CO (Đức), cân phân tích với độ nhạy 0,1 mg Sartorius CPA225D (Nhật), cân phân tích với độ nhạy 0,01 mg Mettler AE 240 (Mỹ). Và các dụng cụ thủy tinh loại A đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Dựa vào cấu trúc hóa học của các chất cần định lượng thì đây đều là những chất phân cực, hấp thu ánh sáng trong vùng tử ngoại, đồng thời tham khảo chuyên luận của từng dược chất trong các Dược điển và một số công trình đã công bố⁽⁹⁻¹¹⁾ thì kỹ thuật sắc ký pha đảo với đầu dò PDA và hệ dung môi phân cực có tính acid làm pha động đã được lựa chọn. Điều kiện sắc ký ban đầu: Cột Sunfire® C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) Waters, đầu dò PDA bước sóng phát hiện 230 nm, tốc độ

dòng 1,0 ml/phút, nhiệt độ cột 30 °C, pha động: Methanol – nước – acid acetic (50:50:0,1, tt/tt/tt). Tiến hành khảo sát tỷ lệ pha động, dung môi pha động, pH pha động, chương trình pha động với mục tiêu sao cho pic của các chất cần cần định lượng tinh khiết, tách hoàn toàn nhau (độ phân giải ≥ 1,5), hệ số bất đối nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và số đĩa lý thuyết biểu kiến ≥ 2000. Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp quy trình sẽ được thẩm định theo hướng dẫn của ICH ban hành vào tháng 11 năm 2005⁽¹²⁾ và theo Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, phụ lục 8⁽¹³⁾ bao gồm khảo sát tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, tính tuyến tính và khoảng xác định, độ chính xác và độ đúng.



Hình 1. Công thức cấu tạo của 4-aminophenol (a), paracetamol (b) và thiocolchicosid (c)

Chuẩn bị mẫu

Dung môi pha mẫu

Methanol – nước (50:50, tt/tt).

Mẫu trắng

Dung môi pha mẫu.

Dung dịch đối chiếu (1)

Cân chính xác 50 mg chuẩn paracetamol, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, siêu âm và lắc kỹ cho tan hoàn toàn, để nguội. Thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ paracetamol khoảng 1000 μg/ml.

Dung dịch chuẩn paracetamol

Lấy chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn đối chiếu (1), cho vào bình định mức 50 ml. Thêm

dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ paracetamol khoảng 200 μg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 μm, siêu âm đuổi khí.

Dung dịch đối chiếu (2)

Cân chính xác 40 mg chuẩn thiocolchicosid, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, siêu âm và lắc kỹ cho tan hoàn toàn, để nguội. Thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ thiocolchicosid khoảng 800 μg/ml.

Dung dịch chuẩn thiocolchicosid

Lấy chính xác 1,0 ml dung dịch đối chiếu (2), cho vào bình định mức 50 ml. Thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch

có nồng độ thiocolchicosid khoảng 16 µg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí.

Dung dịch đối chiếu (3)

Cân chính xác 10 mg chuẩn tạp 4-aminophenol, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, siêu âm và lắc kỹ cho tan hoàn toàn, để nguội. Thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ tạp 4-aminophenol khoảng 200 µg/ml. Bọc kín bình định mức và bảo quản trong tủ lạnh. Trước khi dùng được để ổn định ở nhiệt độ phòng trong khoảng 20 phút.

Dung dịch đối chiếu (4)

Lấy chính xác 10,0 ml dung dịch đối chiếu (1), lấy chính xác 1,0 ml dung dịch đối chiếu (2) và lấy chính xác 1,0 ml dung dịch đối chiếu (3) cho vào bình định mức 50 ml, thêm dung môi pha mẫu vừa đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ paracetamol khoảng 200 µg/ml, thiocolchicosid khoảng 16 µg/ml và 4-aminophenol khoảng 4 µg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử (1)

Lấy 20 viên thuốc chế phẩm, cân chính xác khối lượng của từng viên và tính khối lượng trung bình của một viên, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 200 mg paracetamol cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml dung môi pha mẫu, lắc kỹ và siêu âm khoảng 15 phút. Thêm dung môi pha mẫu vừa đến vạch, lắc đều, lọc qua giấy

lọc, bỏ 10 – 15 ml dịch lọc đầu thu được dung dịch có nồng độ paracetamol khoảng 4000 µg/ml và nồng độ thiocolchicosid khoảng 16 µg/ml. Dung dịch thử (1) được dùng để định lượng thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí.

Dung dịch thử (2)

Lấy chính xác 1,0 ml dịch lọc dung dịch thử (1) cho vào bình định mức 20 ml, thêm dung môi pha mẫu vừa đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ paracetamol khoảng 200 µg/ml. Dung dịch thử (2) được dùng để định lượng paracetamol. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, siêu âm đuổi khí.

Dung dịch giả dược

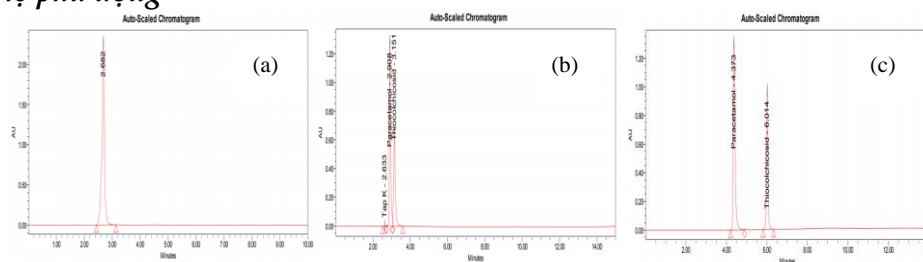
Cân chính xác một lượng bột giả dược tương ứng với khoảng 2/5 khối lượng trung bình viên. Tiến hành chuẩn bị giống dung dịch thử (1) và (2).

Do phạm vi áp dụng của quy trình là định lượng đồng thời paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol cho việc theo dõi độ ổn định của hai hoạt chất này trong quá trình xây dựng công thức bào chế và thành phẩm nên để chứng minh tính chọn lọc cao của quy trình, mẫu thử đã được khảo sát dưới các điều kiện khắc nghiệt như: phân hủy ánh sáng, UV, nhiệt độ cao (80 °C), phân hủy trong môi trường acid (HCl 0,5 N), base (NaOH 0,5 N) và sử dụng tác nhân oxy hóa (H₂O₂ 3%).

KẾT QUẢ

Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát tỷ lệ pha động



Hình 2. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn với tỷ lệ pha động methanol – nước – acid acetic;
 (a) 80:20:0,1, tt/tt/tt (b) 50:50:0,1, tt/tt/tt (c) 20:80:0,1, tt/tt/tt

Nhận xét: Khi tăng tỷ lệ nước tức là tăng độ phân cực của pha động thì các pic hoạt chất từ không tách đến có dấu hiệu tách và cuối cùng là tách hoàn toàn. Do đó, vẫn giữ tỉ lệ 20:80:0,1 và tiếp tục thực hiện khảo sát với mục tiêu xuất hiện pic 4-aminophenol trên sắc ký đồ và các pic tách hoàn toàn.

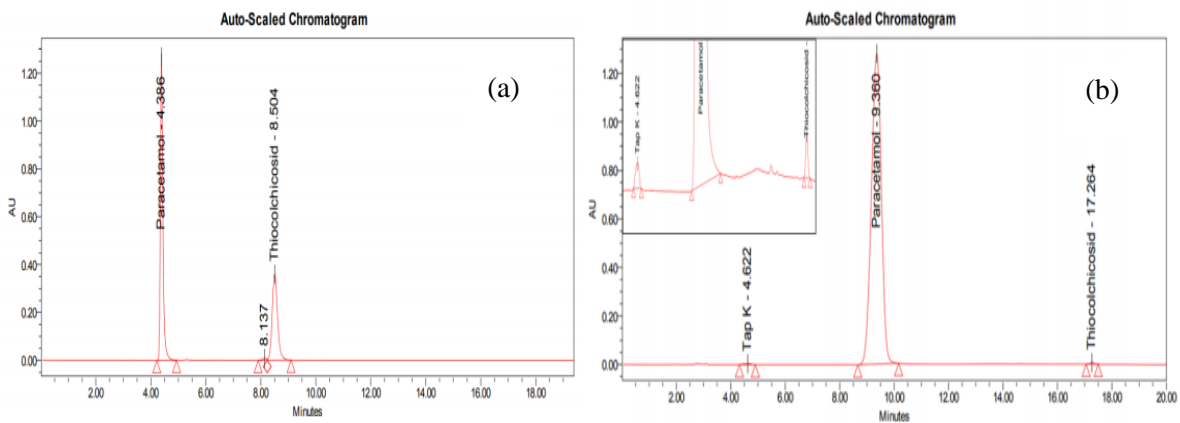
Khảo sát dung môi pha động

Khi thay methanol bằng acetonitril thì sắc ký đồ không có sự cải thiện đáng kể. Khi thay nước bằng đệm phosphat pH 5,0 và giữ nguyên tỉ lệ 20:80, sắc ký đồ có sự cải thiện rõ rệt và pic 4-aminophenol đã xuất hiện. Do đó, giữ nguyên tỉ lệ pha động methanol – đệm phosphat (20:80, tt/tt) và tiếp tục khảo sát để lựa chọn pH thích hợp nhất với mục tiêu cải thiện các thông số sắc ký, đặc biệt là số đĩa lý thuyết đối với 4-aminophenol và paracetamol,

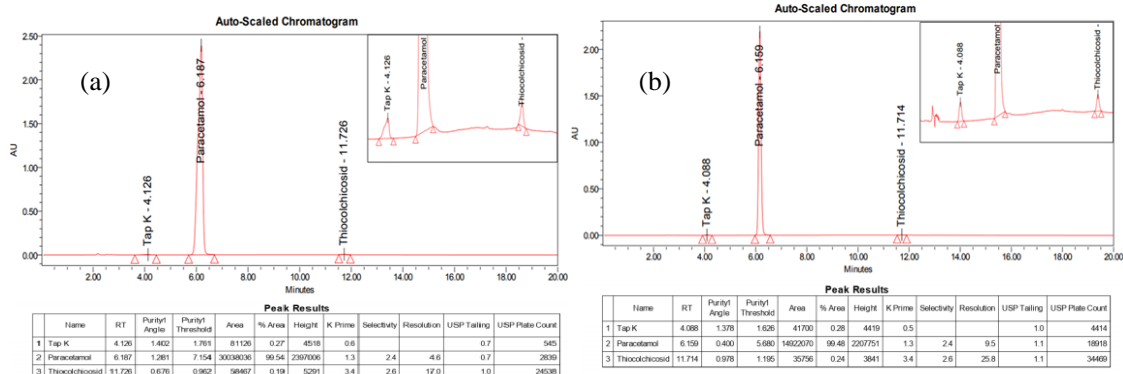
cải thiện về mặt thời gian lưu đối với thiocolchicosid (Hình 3).

Khảo sát pH pha động

Khi thay thế bằng đệm phosphat pH 7,0 cho thấy một sự cải thiện rõ rệt về thông số sắc ký đối với tất cả các pic đặc biệt là pic 4-aminophenol và pic paracetamol so với đệm phosphat pH 6,0. Như vậy đệm phosphat pH 7,0 được xem là thích hợp cho quy trình phân tích. Bên cạnh đó, mặc dù pic 4-aminophenol đã tách hoàn toàn so với pic dung môi nhưng hệ số dung lượng k' và số đĩa lý thuyết vẫn còn tương đối thấp lần lượt là 0,5 và 4414. Vì vậy giữ nguyên tỉ lệ methanol – đệm phosphat pH 7,0 (20:80, tt/tt) và tiếp tục khảo sát các chương trình gradient và khảo sát thời gian triển khai sắc ký với mục tiêu cải thiện các thông số sắc ký cho pic 4-aminophenol.

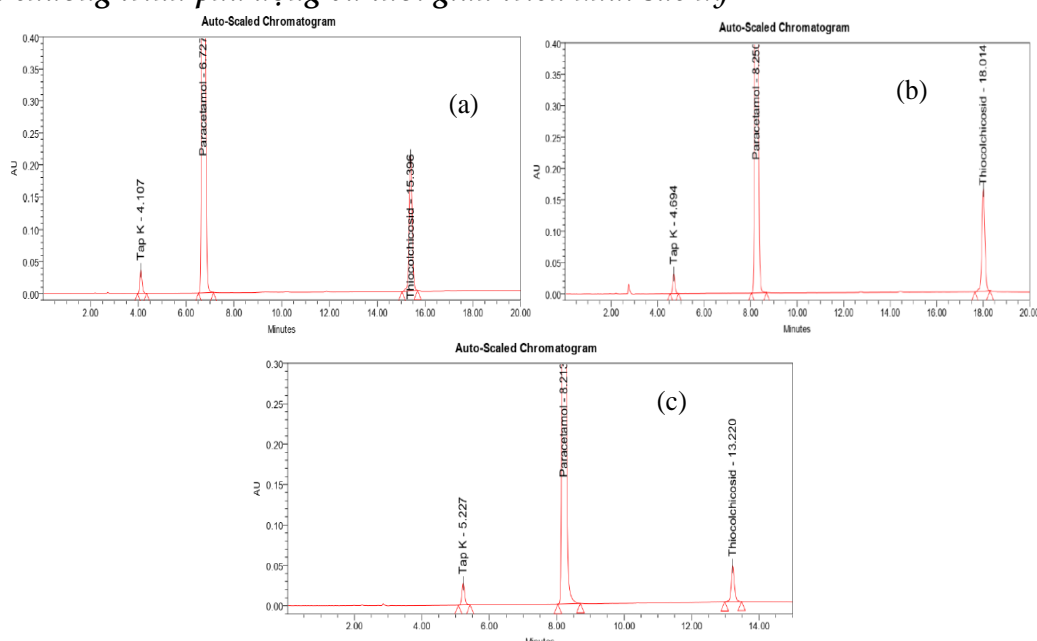


Hình 3. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn với tỷ lệ pha động (a) acetonitril – nước – acid acetic (20:80:0,1, tt/tt/tt); (b) methanol – đệm phosphat pH 5,0 (20:80, tt/tt)



Hình 4. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn với tỷ lệ pha động (a) methanol – đệm phosphat pH 6,0 (20:80, tt/tt); (b) methanol – đệm phosphat pH 7,0 (20:80, tt/tt)

Khảo sát chương trình pha động và thời gian triển khai sắc ký



Hình 5. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn với chương trình rửa giải gradient (1) (a), chương trình rửa giải gradient (2) (b) và chương trình rửa giải gradient (3) (c)

Chương trình gradient (1)

Thời gian (phút)	Methanol (% tt/tt)	Đệm phosphat pH 7,0 (% tt/tt)
0,0	20	80
7,0	40	60
15,0	40	60
20,0	20	80
25,0	20	80

Chương trình gradient (2)

Thời gian (phút)	Methanol (% tt/tt)	Đệm phosphat pH 7,0 (% tt/tt)
0,0	10	90
7,0	50	50
15,0	50	50
20,0	10	90
25,0	10	90

Chương trình gradient (3)

Thời gian (phút)	Methanol (% tt/tt)	Đệm phosphat pH 7,0 (% tt/tt)
0,0	10	90
10,0	50	50
12,0	50	50
15,0	10	90
20,0	10	90

Nhận xét: Dựa trên kết quả khảo sát của ba chương trình gradient, với chương trình

gradient (3) thì thông số sắc ký của tất cả các pic là tốt nhất và thời gian phân tích của quy trình tương đối ngắn (20 phút).

Sau khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tách cũng như tính chất đối xứng của các pic, đã chọn điều kiện sắc ký thích hợp như sau: cột sắc ký Sunfire® C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm) Waters, đầu dò PDA bước sóng phát hiện 230 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μl, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, nhiệt độ cột 30°C, pha động: methanol – đệm phosphat pH 7,0. Cách pha dung dịch đệm: cân chính xác 2,84 g dinatri hydrophosphat hòa tan trong 1000 ml nước, điều chỉnh về pH 7,0 bằng acid phosphoric đậm đặc.

Chương trình gradient của pha động

Thời gian (phút)	Methanol (% tt/tt)	Đệm phosphat pH 7,0 (% tt/tt)
0,0	10	90
10,0	50	50
12,0	50	50
15,0	10	90
20,0	10	90

Thẩm định quy trình phân tích

Tính phù hợp hệ thống

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống (n=6).

	t_R (phút)		S (μ AU x giây)		N		A_s	R_s
	TB	RSD(%)	TB	RSD(%)	TB	RSD(%)		
4-aminophenol (4-AP)	5,226	0,37	159978	0,60	18940	0,80	1,1	—
Paracetamol (PA)	8,180	0,17	5972698	0,47	50194	1,91	1,1	20,2
Thiocolchicosid (THC)	13,217	0,06	316201	0,45	99741	1,74	1,1	32,5

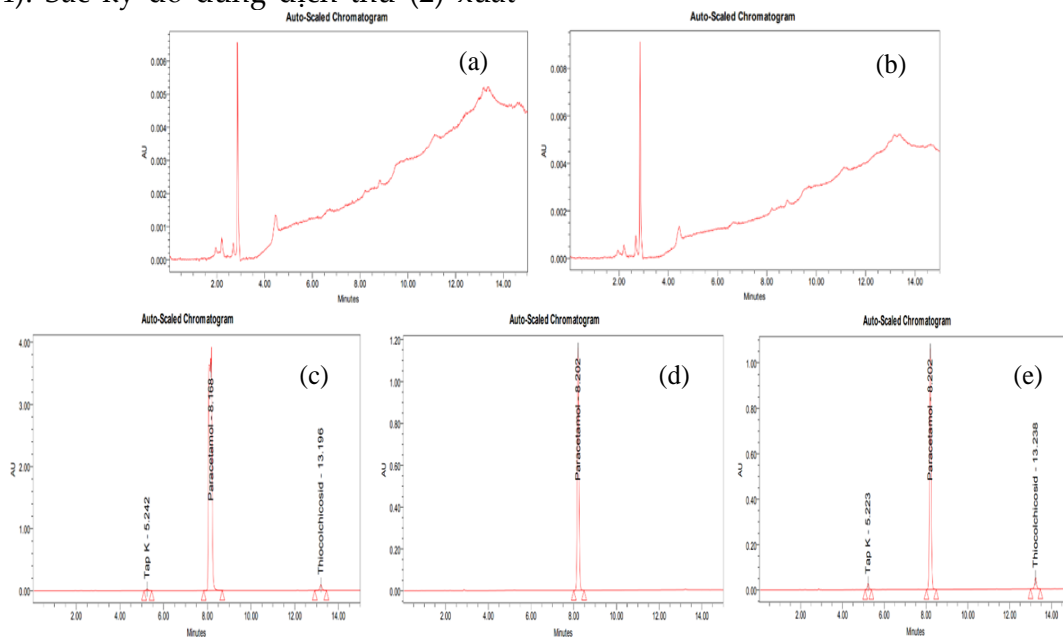
t_R : Thời gian lưu, S: Diện tích pic, A_s : Hệ số đối xứng, R_s : Độ phân giải so với pic phía trước, N: Số đĩa lý thuyết

Nhận xét: Giá trị RSD của thời gian lưu, diện tích pic và số đĩa lý thuyết biểu kiến tương ứng với các chất phân tích đều dưới 2,0%, hệ số bất đối của các pic đều nằm trong khoảng 0,8 – 1,5, độ phân giải giữa các pic đều lớn hơn 1,5 và số đĩa lý thuyết biểu kiến đều lớn hơn 2000. Do đó, quy trình phân tích đạt tính phù hợp hệ thống.

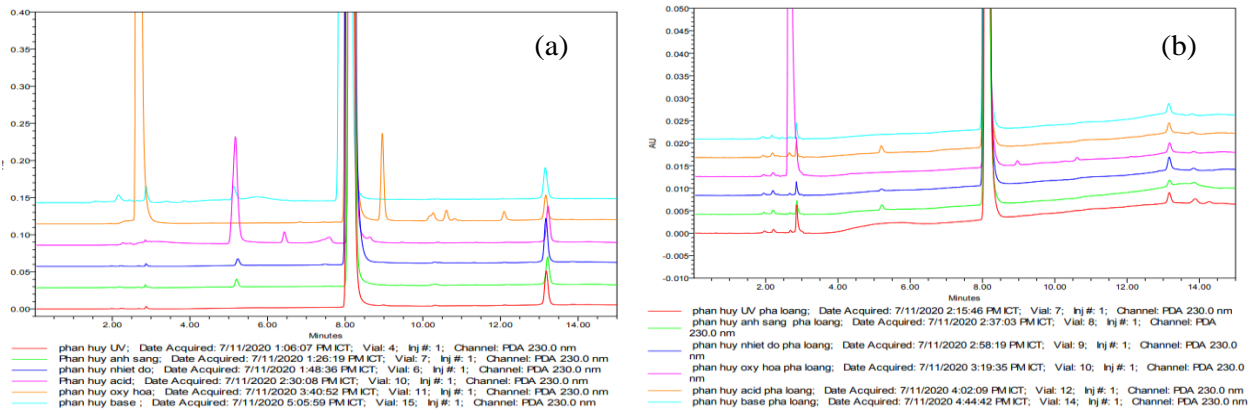
Tính đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy: Sắc ký đồ mẫu trắng, dung dịch giả được không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các pic trong dung dịch đối chiếu (4). Sắc ký đồ dung dịch thử (1) cho các pic có thời gian lưu tương ứng với các pic trong sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (4). Sắc ký đồ dung dịch thử (2) xuất

hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic paracetamol trong sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (4). Đối với các mẫu phân hủy thì sắc ký đồ mẫu phân hủy ánh sáng, phân hủy nhiệt độ và phân hủy trong môi trường acid, base thấy xuất hiện pic 4-aminophenol, trong đó môi trường acid tạp 4-aminophenol được tạo ra nhiều nhất và các pic cần định lượng tách hoàn toàn khỏi nhau và khỏi các pic tạp khác. Phổ UV – Vis tại thời gian lưu của các pic cần định lượng trong các mẫu đều giống nhau. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết cho thấy pic paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol không có thành phần khác trong tất cả các mẫu. Do đó, quy trình phân tích đạt tính đặc hiệu.



Hình 6. Sắc ký đồ mẫu trắng (a), dung dịch giả được (b), dung dịch thử (1) (c), dung dịch thử (2) (d) và dung dịch đối chiếu (4)



Hình 7. Sắc ký đồ các mẫu phân hủy (a) và các mẫu phân hủy pha loãng (b)

Bên cạnh đó, khi tiến hành sắc ký dung dịch thử (1) vì nồng độ của paracetamol trong dung dịch này rất lớn (4000 µg/ml) dẫn đến sự quá tải trên cột sắc ký (chân pic paracetamol to bị kéo đuôi, đỉnh pic bị che và bước sóng hấp thụ cực đại của bị lệch so với khi tiến hành sắc ký dung dịch thử (2) với nồng độ paracetamol thấp). Do đó, dung dịch thử (1) chỉ được dùng để định lượng thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol.

Tính tuyến tính – Khoảng xác định

Bảng 6. Kết quả khảo sát tính tuyến tính và khoảng xác định

	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r)	Khoảng xác định (µg/ml)
4-AP	$\hat{y} = 40676,8133x$	0,9999	0,51 – 10,1
PA	$\hat{y} = 28156,8325x$	0,9992	99,9 – 399,6
THC	$\hat{y} = 18604,4577x$	0,9999	8,01 – 32,0
	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r)	Khoảng xác định (µg/ml)
4-AP	$\hat{y} = 40676,8133x$	0,9999	0,51 – 10,1
PA	$\hat{y} = 28156,8325x$	0,9992	99,9 – 399,6
THC	$\hat{y} = 18604,4577x$	0,9999	8,01 – 32,0

Bảng 9. Kết quả khảo sát độ đúng tạp 4-aminophenol tại các mức nồng độ (n=3) so với giá trị LOQ

Mức nồng độ	Tỷ lệ thu hồi trung bình %	RSD (%)
110%	100,63	0,26
120%	100,66	0,45
130%	98,79	1,21

Giới hạn phát hiện (LOD) – Giới hạn định lượng (LOQ)

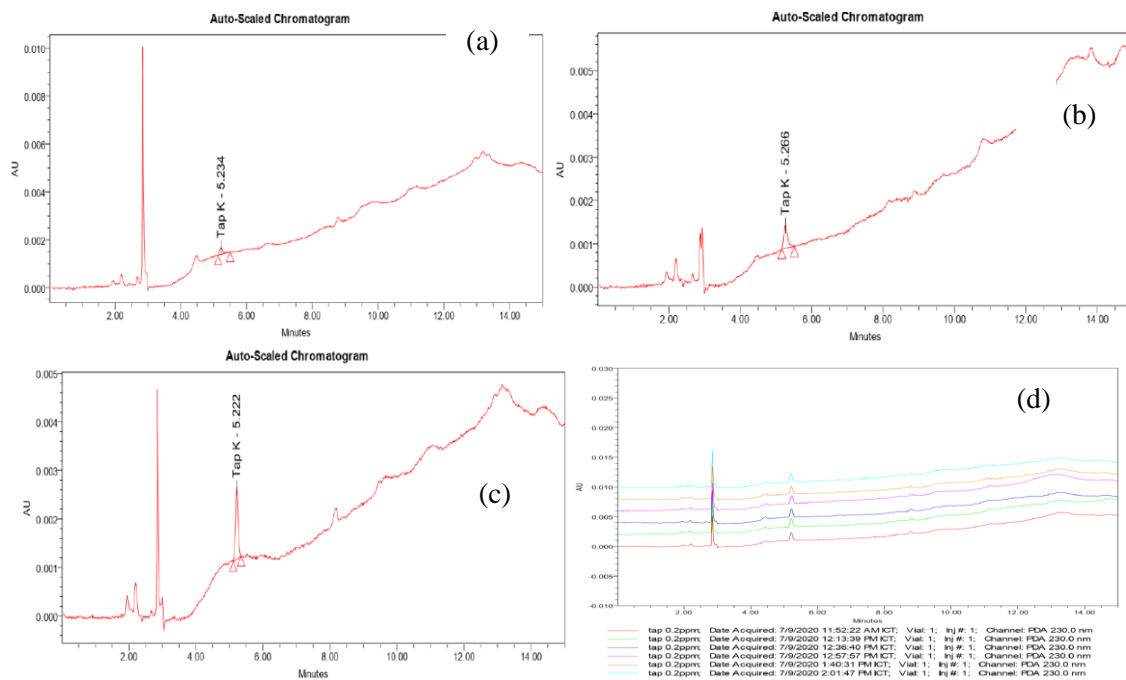
Bảng 7. Kết quả khảo sát tỷ số S/N của tạp 4-aminophenol (n=6)

Nồng độ (µg/ml)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (µAU x giây)	Tỷ số S/N
0,05	5,234	1832	3,1
0,1	5,266	3893	6,3
0,2	5,222	8329	10,6

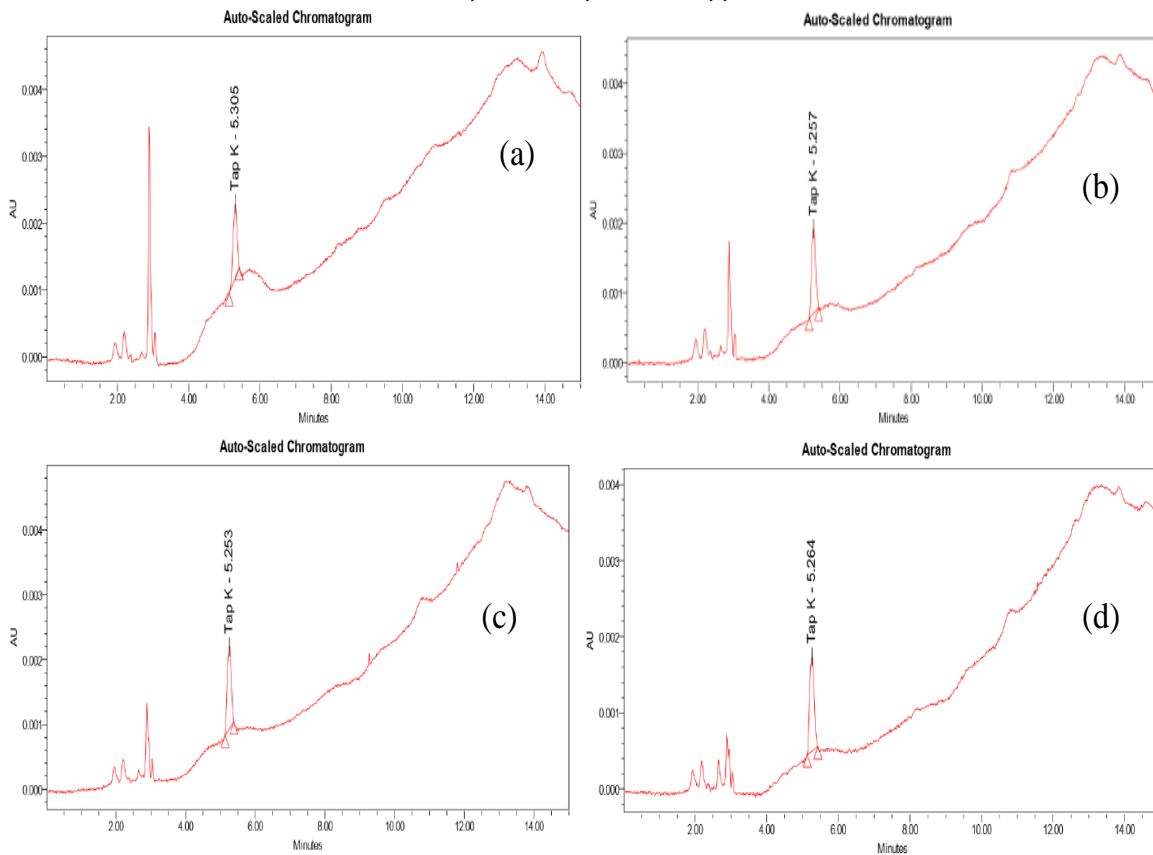
Từ kết quả khảo sát trên cho thấy tại mức nồng độ 0,05 µg/ml của tạp 4-aminophenol có tỷ số S/N là 3,1 tương ứng với giá trị LOD và tại mức nồng độ 0,2 µg/ml có tỷ số S/N là 10,6 tương ứng với giá trị LOQ của phương pháp định lượng.

Bảng 8. Kết quả khảo sát độ chính xác của tạp 4-aminophenol tại giá trị LOQ (n=6)

Nồng độ (µg/ml)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (µAU x giây)	Tỷ số S/N
0,20	5,216	8357	10,8
	5,220	8416	10,3
	5,223	8333	10,4
	5,230	8373	10,7
	5,219	8385	10,5
	5,214	8362	10,7
Trung bình	5,220	8371	10,6
RSD (%)	0,11	0,34	1,86



Hình 8. Sắc ký đồ chuẩn tap 4-aminophenol 0,05 ppm (a) 0,1 ppm (b) 0,2 ppm (c) so sánh các dung dịch chuẩn tap 4-aminophenol 0,2 ppm (d)



Hình 9. Sắc ký đồ chuẩn tap 4-aminophenol ở nồng độ định lượng (a), thêm 10% (b) thêm 20% (c) và thêm 30% so với nồng độ định lượng (d)

Độ lặp lại – Độ chính xác trung gian

Bảng 10. Kết quả khảo sát độ lặp lại (n=6) và độ chính xác trung gian (n=12)

	Độ lặp lại		Độ chính xác trung gian	
	TB (%)	RSD (%)	TB (%)	RSD (%)
4-AP	0,0222	1,11	0,0228	2,53
PA	101,63	0,17	101,24	0,68
THC	99,66	0,72	99,74	0,54

Nhận xét: Giá trị RSD kết quả định lượng paracetamol, thiocolchicosid của mỗi người phân tích và của cả hai người phân tích đều ≤ 2,0%. Đồng thời, độ sai khác kết quả định lượng giữa hai người phân tích ≤ 2,0%. Đối với tạp 4-aminophenol do hàm lượng % so với paracetamol rất thấp nên giá trị RSD khó đạt dưới 2,0%. Do đó, quy trình phân tích đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Độ đúng

Bảng 11. Kết quả khảo sát độ đúng ở mỗi mức nồng độ (n=3)

Mức nồng độ	4-PA		PA		THC	
	Tỷ lệ thu hồi trung bình %	RSD (%)	Tỷ lệ thu hồi trung bình %	RSD (%)	Tỷ lệ thu hồi trung bình %	RSD (%)
80%	100,19	0,59	100,25	0,70	100,31	0,35
100%	101,76	0,66	99,67	0,48	99,98	0,42
120%	100,49	1,12	99,31	0,19	100,03	0,24

Nhận xét: Kết quả khảo sát độ đúng cho thấy tỷ lệ thu hồi trung bình của paracetamol, thiocolchicosid và tạp 4-aminophenol ở ba mức nồng độ 80, 100 và 120% so với nồng độ định lượng đều nằm trong khoảng 98 – 102% với giá trị RSD của tỷ lệ thu hồi đều không quá 2,0%. Do đó, quy trình phân tích đạt yêu cầu về độ đúng.

BÀN LUẬN

Trong kỹ thuật sắc ký pha đảo, khả năng phân tách các chất phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như tính chất của chất phân tích, tính chất pha động, loại pha tĩnh sử dụng, nhiệt độ cột, tốc độ dòng... Kết quả khảo sát tỷ lệ pha động methanol – nước – acid acetic cho thấy khi độ phân cực của pha động càng tăng thì thời

gian lưu của các chất phân tích càng tăng, các chất phân tích ban đầu không tách khỏi nhau ở tỷ lệ (50:50:0,1, tt/tt/tt) và ở tỷ lệ (80:20:0,1, tt/tt/tt) hai pic paracetamol và thiocolchicosid đã tách hoàn toàn nhau tuy nhiên không thấy xuất hiện pic 4-aminophenol. Nguyên nhân là do 4-aminophenol là phân tử có cấu trúc đơn giản và phân cực nhất nên ít tương tác với pha tĩnh C18 và được rửa giải sớm nhất dẫn đến bị trùng với pic dung môi. Tiếp tục khảo sát dung môi pha động thì acetonitril được lựa chọn để thay thế cho methanol với mục tiêu thay đổi lực rửa giải của pha động giúp phân tách 4-aminophenol mặt khác acetonitril là dung môi hữu cơ có độ nhớt thấp làm giảm áp suất cột và hệ thống giúp tăng tuổi thọ cho cột. Tuy nhiên khi thay thế methanol bằng acetonitril thì vẫn không xuất hiện pic 4-aminophenol và pic thiocolchicosid bị che ở chân trước do đó acetonitril xem như không phù hợp cho quy trình định lượng. Nhận xét nếu chỉ dùng hệ pha động đơn giản thì không thể phân tách được 4-aminophenol, nguyên nhân có thể là do pH pha động chưa phù hợp làm cho 4-aminophenol dễ dàng bị ion hóa thành dạng ion mang điện tích âm (dạng phenolat) hoặc mang điện tích dương (dạng muối amoni) hoặc ở dạng ion mang đồng thời điện tích âm và điện tích dương (zwitterion) càng làm tăng tính phân cực của chất này dẫn đến giảm tương tác với pha tĩnh và bị rửa giải quá sớm cùng với pic dung môi. Vì thế quyết định thay thế nước đã acid hóa bằng đệm phosphat với ưu điểm là khả năng đệm tốt và ngưỡng hấp thụ UV (UV cutoff) thấp⁽¹⁴⁾ để khảo sát pH thích hợp cho quy trình phân tích. 4-aminophenol là một chất lưỡng tính có tính phân cực với pKa₁ = 5,48 (đối với nhóm chức amin) và pKa₂ = 10,46 (đối với nhóm chức hydroxyl) do đó khi ở trong pha động có pH 7,0 áp dụng phương trình Henderson – Hasselbalch đối với nhóm chức hydroxyl thì dạng dạng –OH phenol gấp 2884 lần dạng ion phenolat, đối với nhóm chức amin thì dạng –NH₂ gấp 33 lần dạng ion –NH₃⁺. Vì vậy ở pH 7,0 thì 4-aminophenol

chủ yếu tồn tại ở dạng phân tử có độ phân cực thấp hơn so với dạng ion, kết quả làm cho pic tạp 4-aminophenol rửa giải chậm hơn và tách hoàn toàn so với pic dung môi. Và để cải thiện hơn nữa các thông số sắc ký cho pic 4-aminophenol cũng như các pic hoạt chất thì một chương trình rửa giải gradient với tỷ lệ pha động có độ phân cực giảm khi phân tách tạp 4-aminophenol được lựa chọn thay thế cho việc chạy đẳng dòng. Bước sóng phát hiện được lựa chọn là 230 nm ứng với cực đại hấp thụ của 4-aminophenol nhằm tăng tín hiệu đáp ứng với đầu dò cho pic 4-aminophenol từ đó tăng khả năng phát hiện, định lượng của quy trình.

KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình định lượng paracetamol, thiocolchicossid và tạp 4-aminophenol trong chế phẩm đa thành phần bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA một cách đơn giản, nhanh chóng và kinh tế. Quy trình phân tích cũng đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH ban hành vào tháng 11 năm 2005 và theo Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, phụ lục 8 cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu cao, cho kết quả đúng và chính xác, có thể áp dụng vào việc định lượng các chế phẩm chứa đồng thời hai hoạt chất này, góp phần xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho các chế phẩm chứa paracetamol và thiocolchicossid trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế (2014). Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị các bệnh cơ xương khớp. URL: <http://canhgiacduoc.org.vn/SiteData/3/UserFiles/QD%20361%20BYT.pdf> (access on 22/07/2020).
2. Tulder MWV, Koes BW, Bouter LM(1995). A cost-of-illness study of back pain in the Netherlands. *Pain*, 62(2):233-240.

3. Janbroers JM (1987). Review of the toxicology, pharmacodynamics and pharmacokinetics of thiocolchicoside, a GABA-agonist muscle relaxant with anti-inflammatory and analgesic actions. *Acta Therapeutica*, 13 (3):221-250.
4. Heads of Medicines Agencies (2019). Package leaflet: Information for the user. URL: https://mri.cts-mrp.eu/Human/Downloads/PT_H_2236_001_FinalPI_2of3.pdf (access on 22/07/2020).
5. Pohanish R (2008). Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemical Carcinogens, 5th ed, pp. 146. *William Andrew*, USA.
6. European Commission (2011). opinion of the scientific committee on consumer safety on p-aminophenol. URL: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_078.pdf. (access on 22/07/2020).
7. The United States Pharmacopeia and National Formulary (2018). Monographs: actaminophen , 4-aminophenol in acetaminophen-containing drug products, pp. 34, 6141. USA.
8. Bộ Y Tế (2017). Dược điển Việt Nam V, pp.640-649. *Nhà Xuất Bản Y Học*, Hà Nội.
9. Patel CM, Mayank B, Brahmhatt KD, Ronak A. Patel RA, et al (2013). Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of paracetamol and thiocolchicoside by RP-HPLC in bulk and pharmaceutical dosage form. *J Pharma Science Monitor*, 3(3):296-306.
10. Rao N, Narasaraju A (2006). Rapid separation and determination of process-related substances of paracetamol using reversed-phase HPLC with photo diode array as a detector. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistr*, 22:287-292.
11. Deshpande S, Patel AR (2014). Stability indicating simultaneous estimation of thiocolchicoside, paracetamol and diclofenac sodium in bulk drug and formulation by RP-HPLC. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(7):671-678.
12. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, pp.1-13.
13. Bộ Y Tế (2013). Quyết định của Cục Trưởng Cục Quản Lý Dược Số 07/QĐ-QLD ngày 11 tháng 01 năm 2013 về việc ban hành sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc, phụ lục 8.
14. Verma S (2011). Reversed-Phase HPLC buffers. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/reversed-phase-hplc.html> (access on 14/08/2020).

Ngày nhận bài báo: 15/12/2020
 Ngày phản biện nhận xét bài báo: 05/01/2021
 Ngày bài báo được đăng: 20/04/2021