

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Đức Hạnh*, Đỗ Thị Thúy An

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

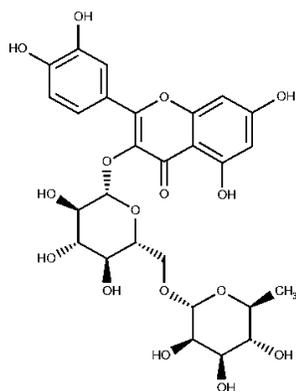
Summary

Rutin is a flavonoid with strong antioxidant properties and its effectiveness in treating symptoms of varicose veins. This study was carried out to determine the quantification of rutin in microemulsion-based gel, a potential dosage form in the use of rutin to treat varicose veins. HPLC conditions for quantitative determination of rutin in microemulsion - based gel were determined using Thermo Scientific Synchronis C18 chromatographic column (250 x 4.6 mm; 5 μ m), C18 HQ105 pre-column (4 x 10 mm; 5 μ m) with a mobile phase composition of acetonitrile and acid formic (76:24, v/v). The flow rate was 1 ml/min, sample injection volume was 20 μ l and quantitative wavelength was 255 nm. The quantification method was within the validation acceptance range for system suitability, linearity, specificity, accuracy and precision. This method can be used to develop and characterize rutin microemulsion-based gel.

Keywords: Rutin, HPLC, microemulsion, gel.

Đặt vấn đề

Rutin là một hợp chất glycosid flavonoid có tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm, chống tăng lipid huyết... Rutin có hiệu quả bảo vệ mạch máu trong bệnh suy giãn tĩnh mạch nhờ tác dụng tăng độ bền mạch máu, giảm tính thấm thành mạch [1, 2].



Hình 1. Cấu trúc hóa học của rutin

Gel vi nhũ tương chứa rutin là dạng bào chế dễ sử dụng trên da, giúp giữ hoạt chất rutin tại da lâu hơn, tăng khả năng thẩm qua da và tác động trực tiếp tại vị trí mong muốn trong hỗ trợ điều trị bệnh lý suy giãn tĩnh mạch [3, 4]. Định lượng rutin trong dạng bào chế gel vi nhũ tương bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là một tiêu chí quan trọng của tiêu chuẩn gel vi nhũ tương, giúp kiểm soát chất lượng dạng bào chế. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu thiết lập quy trình định lượng rutin trong sản phẩm gel vi nhũ tương rutin.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng và nguyên liệu

Rutin chuẩn làm việc (Hãng Biopurify Phytochemicals, Trung Quốc) đạt độ tinh khiết 99,0%. Acetonitril (Hãng Fisher, Mỹ), acid formic (Hãng Merck) và nước cất hai lần đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC

Chuẩn bị mẫu

Mẫu trắng: Dung môi ethanol.

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 20 mg rutin chuẩn cho vào bình định mức 10 ml, thêm khoảng 5 ml ethanol, siêu âm 5 phút và bổ sung ethanol đến vạch, lắc kỹ. Dung dịch chuẩn gốc

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Hạnh

Email: duchanh@ump.edu.vn

Ngày nhận: 14/9/2021

Ngày phân biện: 20/9/2021

Ngày duyệt bài: 24/12/2021

rutin có nồng độ khoảng 2000 µg/ml.

Mẫu chuẩn: Lấy 375 µl dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 5 ml, pha loãng và bổ sung vừa đủ thể tích bằng ethanol, lắc kỹ, lọc qua màng lọc 0,22 µm. Dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ rutin khoảng 150 µg/ml.

Mẫu thử: Cân chính xác 160 mg gel vi nhũ tương rutin cho vào bình định mức 5 ml, cho khoảng 3 ml ethanol và siêu âm trong 5 phút. Bổ sung ethanol vừa đủ thể tích, lắc kỹ, lọc qua màng lọc 0,22 µm. Dung dịch mẫu thử có nồng độ rutin khoảng 128 µg/ml.

Mẫu placebo: Cân chính xác 160 mg gel vi nhũ tương không chứa rutin cho vào bình định mức 5 ml, cho khoảng 3 ml ethanol và siêu âm trong 5 phút. Bổ sung ethanol vừa đủ thể tích, lắc kỹ và lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Điều kiện **HPLC** để định lượng rutin trong gel

vi nhũ tương được tiến hành trên máy HPLC Azura (Hãng Knauer, Đức), cột sắc ký Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), tiền cột C18 HQ105 (4 x 10 mm; 5 µm), nhiệt độ cột: 30 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích bơm mẫu 20 µl, bước sóng phát hiện là 255 nm.

Tiến hành sắc ký mẫu thử với pha động khảo sát trong bảng 1. Dựa vào sắc ký đồ, các thông số sắc ký để chọn pha động sao cho các pic tách nhau hoàn toàn và các thông số sắc ký đạt yêu cầu.

Thẩm định quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC

Phương pháp định lượng rutin trong gel vi nhũ tương được thẩm định về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng theo hướng dẫn của ICH.

Bảng 1. Các chương trình pha động **HPLC** khảo sát

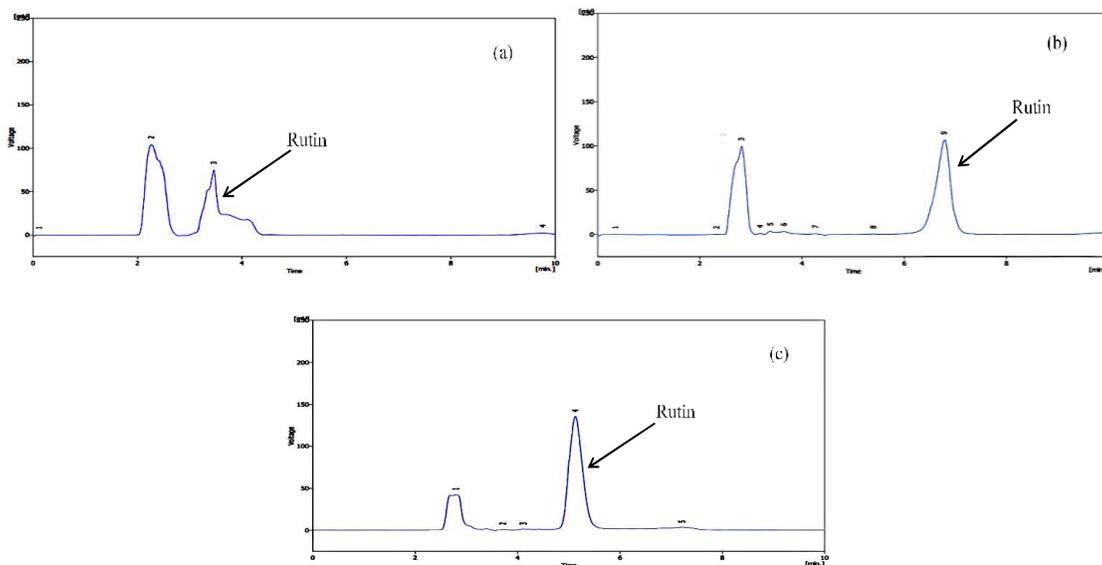
Chương trình	Nồng độ dung dịch acid formic (%)	Acid formic (%)	Acetonitril (%)	Tốc độ dòng (ml/phút)
(a)	0,07	65	35	1
(b)	0,1	78	22	1
(c)	0,13	76	24	1

Kết quả và bàn luận

Xây dựng quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC.

Khảo sát điều kiện sắc ký HPLC

Tiến hành khảo sát các hệ dung môi pha động theo bảng 1. Sắc ký đồ **HPLC** của các chương trình pha động khảo sát được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ **HPLC** của các chương trình pha động khảo sát

Chương trình (a) cho thấy pic rutin chệch đỉnh, không đạt các thông số sắc ký, pic rutin không tách hoàn toàn khỏi các pic khác. Vì vậy, tiếp tục khảo sát bằng cách tăng tỉ lệ dung dịch acid formic từ 65 % lên 78 %, tăng nồng độ acid từ 0,07 % đến 0,1 %.

Chương trình (b) cho thấy thời gian lưu của pic rutin tăng, pic không đạt hệ số bất đối ($A_s = 0,696$), chân pic rộng (1,683 phút). Vì vậy, giảm tỉ lệ dung dịch acid formic từ 78 % xuống 76 %, đồng thời tăng nồng độ acid từ 0,1 % thành 0,13 %.

Chương trình (c) cho thấy thời gian lưu của pic rutin được rút ngắn so với chương trình (b), giúp tiết kiệm thời gian phân tích, pic đạt các yêu cầu về thông số sắc ký, chân pic rutin thu hẹp.

Vậy chương trình (c) được lựa chọn làm pha động cho quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp **HPLC**.

Quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 20 mg rutin chuẩn cho vào bình định mức 10 ml, thêm khoảng 5 ml ethanol, siêu âm 5 phút và bổ sung ethanol đến vạch, lắc kỹ. Dung dịch chuẩn gốc rutin có nồng độ khoảng 2000 µg/ml.

Mẫu chuẩn: Lấy 375 µl dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 5 ml, pha loãng và bổ sung vừa đủ thể tích bằng ethanol, lắc kỹ, lọc qua màng lọc 0,22 µm. Dung dịch mẫu chuẩn có nồng độ rutin khoảng 150 µg/ml.

Mẫu thử: Cân chính xác 160 mg gel vi nhũ tương rutin cho vào bình định mức 5 ml, cho khoảng 3 ml ethanol và siêu âm trong 5 phút. Bổ sung ethanol vừa đủ thể tích, lắc kỹ, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện sắc ký: Máy HPLC Azura (Hãng Knauer, Đức), cột sắc ký Thermo Scientific Synchronis C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), tiền cột C18 HQ105 (4 x 10 mm; 5 µm), nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích bơm mẫu 20 µl, đầu dò **UV-Vis** với bước sóng định lượng là 255 nm. Pha động là acetonitril và dung dịch acid formic 0,13% theo tỉ lệ 76:24 (tt/tt).

Hàm lượng rutin trong gel vi nhũ tương được tính theo công thức:

$$C = \frac{S_{thử}}{S_{chuẩn}} \times C_{chuẩn} \times \frac{5}{m_{cân}}$$

Trong đó:

C là hàm lượng rutin trong gel vi nhũ tương (µg/g).

$S_{thử}$ và $S_{chuẩn}$ là diện tích pic của rutin trong mẫu thử và mẫu chuẩn (mAU.s).

$C_{chuẩn}$ là nồng độ của rutin trong mẫu chuẩn (mg/ml).

$m_{cân}$ là khối lượng cân gel vi nhũ tương rutin thực tế (mg).

Thẩm định quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp HPLC

Tính tương thích hệ thống

Kết quả sắc ký 6 lần mẫu thử được trình bày trong bảng 2.

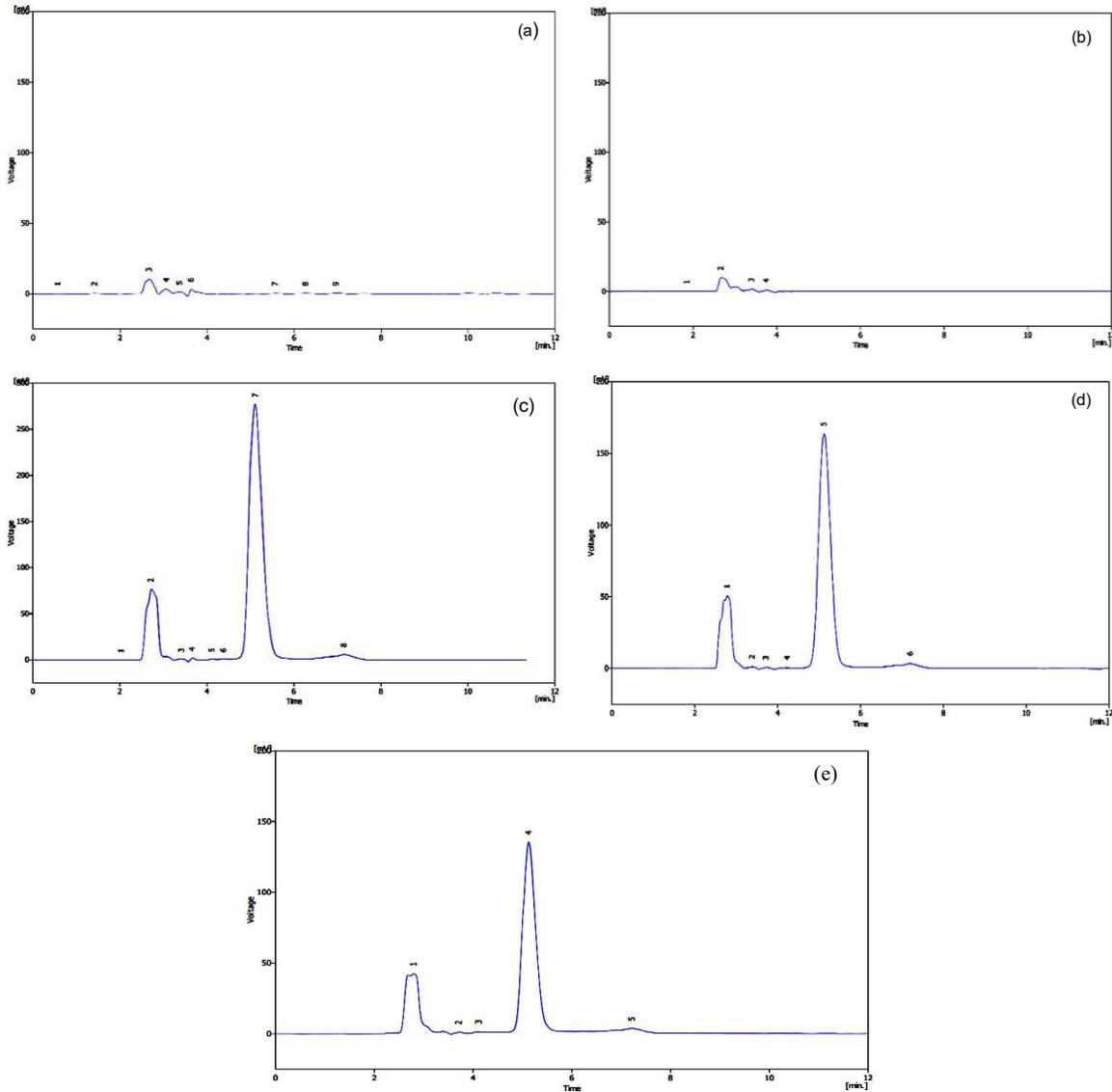
Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

STT	t_R (phút)	S (mAU.s)	A_s	R_{s1}	R_{s2}	N
1	5,033	2552,681	1,125	1,888	4,678	31190
2	5,200	2521,754	1,188	2,018	2,462	24457
3	5,083	2527,122	1,357	1,863	2,710	28552
4	5,167	2529,227	1,267	2,018	3,252	29496
5	5,167	2530,819	1,125	1,936	2,567	24145
6	5,100	2586,856	1,385	2,090	2,791	23834
Trung bình	5,125	2541,41	1,241	1,969	3,017	26945,667
SD	0,063	24,672				
% RSD	1,234	0,971	$0,8 \leq A_s \leq 1,5$	$R_s \geq 1,5$		

%RSD của thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S) $\leq 2\%$. Hệ số bất đối $0,8 \leq A_s \leq 1,5$, độ phân giải

(R_s) $> 1,5$. Vậy phương pháp **HPLC** đã xây dựng đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống.

Độ đặc hiệu

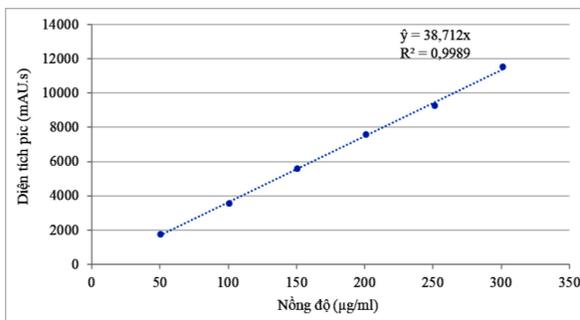


Hình 3. Sắc ký đồ của (a) mẫu trắng, (b) mẫu placebo, (c) mẫu chuẩn, (d) mẫu thử và (e) mẫu placebo thêm chuẩn

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu ở hình 3 cho thấy: Mẫu trắng và mẫu placebo không xuất hiện pic tại thời gian lưu của pic rutin trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ của mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng tại thời gian lưu của pic rutin trong mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu placebo thêm chuẩn cho pic có thời gian lưu tương ứng tại thời gian lưu của pic rutin trong mẫu chuẩn. Vậy phương pháp **HPLC** đã xây dựng đạt tính đặc hiệu.

Tính tuyến tính

Kết quả khảo sát tính tuyến tính của phương pháp **HPLC** định lượng rutin trong gel vi nhũ tương được trình bày trong hình 4. Phương pháp **HPLC** đã xây dựng đạt tính tuyến tính với phương trình hồi quy là $\hat{y} = 38,712x$ ($R^2 = 0,9989$).



Hình 4. Tương quan giữa diện tích pic và nồng độ rutin

Độ chính xác

Kết quả thẩm định độ chính xác của phương pháp định lượng được trình bày ở bảng 4. % RSD hàm lượng rutin của mỗi ngày và của cả 2 ngày đều nhỏ hơn 2 %. Vậy phương pháp **HPLC** đã xây dựng đạt yêu cầu độ chính xác.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ chính xác

Mẫu	Hàm lượng rutin (µg/g)	
	Ngày 1	Ngày 2
1	2298,32	2334,00
2	2302,66	2317,32
3	2316,22	2327,74
4	2354,45	2314,08
5	2336,40	2266,23
6	2323,23	2350,14
Trung bình	2321,88	2318,25
% RSD	0,91	1,23
% RSD 2 ngày	1,04	

Độ đúng

Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp **HPLC** định lượng rutin trong gel vi nhũ tương được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng

Mức nồng độ thêm vào	Lượng rutin chuẩn thêm vào (µg)	Lượng rutin tìm được (µg)	Tỉ lệ phục hồi (%)	Trung bình tỉ lệ phục hồi (%)	RSD (%)
50 %	190,86	195,53	102,45	103,29	0,73
	200,90	207,96	103,51		
	210,95	219,21	103,92		
100 %	391,76	389,52	99,43	100,47	1,00
	401,80	404,01	100,55		
	411,86	417,76	101,44		
150 %	592,66	595,23	100,43	100,90	0,41
	602,70	610,14	101,23		
	612,75	618,98	101,02		

Các tỉ lệ phục hồi trong khoảng cho phép là 95 – 105 % và %RSD không quá 2 %. Vậy phương pháp **HPLC** đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đúng.

Kết luận

Quy trình định lượng rutin trong gel vi nhũ tương bằng phương pháp **HPLC** đã được xây dựng. Kết quả thẩm định quy trình định lượng đạt các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng. Độ lặp lại đạt yêu cầu với RSD là 1,04 %. Độ đúng đạt yêu cầu với độ phục hồi trong khoảng 99,43 - 103,92 %. Quy trình định lượng có thể được ứng dụng trong đánh giá hàm lượng rutin trong gel vi nhũ tương.

Tài liệu tham khảo

- Durant (1946), "Rutin: A new drug for the treatment of increased capillary fragility", *American Heart Journal*, 32, pp. 274.
- Arct J., Pytkowska K. (2008), "Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals", *Clinics in Dermatology*, 26 (4), pp. 347-357.
- Lawrence M. J., Rees G. D. (2000), "Microemulsion - based media as novel drug delivery systems", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45 (1), pp. 89-121.
- Mehta D. P., Rathod H. J., Shah D. P. et al. (2015), "A review on microemulsion based gel: A recent approach for topical drug delivery system", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 8 (2), pp. 118-126.