

Nghiên cứu định lượng mometason trong kem thuốc bằng phương pháp HPLC sử dụng cột L60 theo Dược điển Mỹ

Phan Lê Hiền, Hà Minh Hiền*

Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

Summary

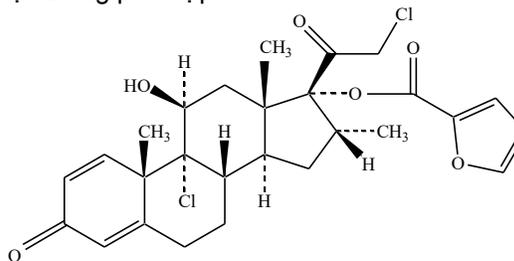
A reverse-phase HPLC method for determination of mometasone in mometasone furoate cream was fully verified: Column – Supelcosil™ LC-ABZ (25 cm × 4.6 mm, 5 μm); detector - UV (254 nm); mobile phase – water: acetonitrile (Gradient); flow rate – 2.0 ml/min. Internal standard solution of diethyl phthalate in acetonitrile was used. The method was validated observing the ICH guidelines: The tailing factor for the mometasone furoate peak of 1.0 was achieved. The linearity was good at the range of 20.0 – 79.9 μg·mL⁻¹ (r = 0.9998); RSD of intra-and inter-day precision variations < 2.0 %; mean recovery was 99.84 ± 0.36 % (RSD = 0.36 %). For quantitative purpose, the method was adequate and applicable to quality control of mometasone in cream.

Keywords: Cream, mometasone, diethyl phthalate, L60

Đặt vấn đề

Mometason có tên hóa học là 9,21 - dicloro - 11β - hydroxy - 16α - methyl - 3,20 - dioxopregna - 1,4 - dien - 17 - yl furan - 2 - carboxylat, là một glucocorticoid [1]. Trên thị trường có nhiều dạng bào chế như thuốc kem bôi da, thuốc mỡ, thuốc xịt mũi, thuốc xức (lotion) da đầu, chủ yếu để chống viêm, chống ngứa. Thuốc mometason dạng kem, lotion được dùng để điều trị những triệu chứng của bệnh lý da liễu như bệnh chàm, vẩy nến, viêm da dị ứng.... Theo các chuyên luận dược điển, để định lượng mometason trong kem thuốc, có thể dùng kỹ thuật sắc ký lỏng với các phương pháp chuẩn bị mẫu và điều kiện sắc ký khác nhau. Phương pháp của Dược điển Anh theo chuyên luận kem mometason định lượng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng, phương pháp ngoại chuẩn, sử dụng cột pha đảo C-18 loại có các nhóm OH silanol còn sót lại trong silica RP-18 đã bị biến đổi thành OR, với R là một mạch ngắn gồm 2-4 carbon (End-capped) và khử hoạt tính kiềm, nhiệt độ cột là 60 °C. Chuyên luận này không có chỉ tiêu tạp chất hữu cơ và có đề xuất sử dụng cột

Hypersil BDS C18 cho thấy giới hạn của quy trình phân tích [2]. Dược điển Mỹ cũng dùng kỹ thuật sắc ký lỏng, nhưng với phương pháp nội chuẩn và sử dụng cột L60 để thực hiện cả chỉ tiêu định lượng và tạp chất hữu cơ phần nào cho thấy tính ưu việt [3]. Tuy nhiên, cột L60 có nhiều loại do các nhà sản xuất khác nhau cung cấp trên thị trường và có giá thành khá cao nên khi trang bị phải cân nhắc đảm bảo hiệu quả sử dụng. Bài báo này đề xuất một phương pháp xác định mometason trong kem thuốc sử dụng cột: thép không gỉ (4,6 mm × 25 cm) được nhồi silica gel (5 μm) hình cầu, xốp, bề mặt được biến đổi hóa trị với sự hiện diện của các nhóm alkyl amid và các nhóm OH bị khóa (cột Supelcosil™ LC-ABZ) theo quy trình của Dược điển Mỹ để các nhà sản xuất có thể tham khảo ứng dụng trong công tác kiểm tra chất lượng sản phẩm của mình mà không phải chọn cột để hạn chế rủi ro về chi phí vận hành do sử dụng cột không phù hợp.



Hình 1. Công thức cấu tạo của mometason

Chịu trách nhiệm: Hà Minh Hiền

Email: haminhhien@yahoo.com

Ngày nhận: 12/4/2021

Ngày phân biên: 04/5/2021

Ngày duyệt bài: 26/7/2021

Nguyên liệu và phương pháp

Mẫu nghiên cứu

Chế phẩm: Kem MDS 0,1 %, Tuýp 15 g. Số lô: 001NC; Ngày sản xuất: 08/12/19; Hạn dùng: 08/12/22; Nơi sản xuất: Công ty Cổ phần Dược GEA-NUS. Công thức bào chế: mometason furoat, stearyl alcohol, cetyl alcohol, sorbitan monostearat, dầu parafin light, propylen glycol, polysorbat 80, nước tinh khiết theo tỷ lệ của công thức.

Thiết bị, thuốc thử và chất chuẩn

Cân phân tích, dụng cụ thủy tinh: Đã được hiệu chuẩn theo GLP và ISO/IEC 17025: 2017 và các dụng cụ thông thường khác.

Máy sắc ký lỏng HPLC Shimadzu: Bộ kiểm tra hệ thống CBM-20Alite; Bơm LC-20AD; Bộ chích mẫu tự động SIL-20AC HT; Buồng cột CTO-20AC; Đầu dò PDA SPD-M20A; Phần mềm xử lý dữ kiện LCsolution.

Chất chuẩn: Mometason furoat, số lô: C0264/118030, nguồn gốc: Crystal Pharma (Tây Ban Nha), hàm lượng: 99,3 %.

Diethyl phthalat, số lô: BCBS9373V, nguồn gốc: Sigma Aldrich, Hàm lượng: 99,5 %.

Hóa chất: Tetrahydrofuran (TT), acid acetic băng (TT), acetonitril (TT) (dùng trong phương pháp sắc ký).

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị các dung dịch

Dung môi pha loãng A: tetrahydrofuran – acid acetic băng (100 : 10).

Dung môi pha loãng B: acetonitril – nước – acid acetic băng (50 : 50 : 1).

Dung môi A: nước.

Dung môi B: acetonitril.

Dung dịch nội chuẩn: Hòa tan diethyl phthalat chuẩn trong acetonitril (TT) để được dung dịch nội chuẩn có nồng độ 1,4 mg/ml.

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan mometason furoat chuẩn trong dung môi pha loãng A để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 0,2 mg/ml.

Dung dịch chuẩn: Trộn đồng lượng dung dịch chuẩn gốc và dung dịch nội chuẩn rồi pha loãng trong dung môi pha loãng B để được dung dịch chuẩn có nồng độ 0,05 mg/ml mometason furoat và 0,35 mg/ml diethyl phthalat.

Dung dịch thử: Chuyển một lượng kem thuốc tương ứng với 1,0 mg mometason furoat vào một ống ly tâm 50 ml có nắp vặn. Thêm 5 ml dung môi pha loãng A và một vài hạt bi thủy tinh, trộn trên máy lắc xoáy. Thêm 5 ml dung dịch nội chuẩn, trộn đều. Thêm 10 ml dung môi pha loãng B, trộn trên máy lắc xoáy

trong 1 phút, ly tâm trong 10 phút với tốc độ 5000 rpm. Lọc qua màng lọc 0,45 µm, bỏ 1-2 ml dịch lọc đầu.

Điều kiện sắc ký

Cột: thép không gỉ (4,6 mm × 25 cm) được nhồi silica gel (5 µm) hình cầu, xốp, bề mặt được biến đổi hóa trị với sự hiện diện của các nhóm alkyl amid và các nhóm OH bị khóa (Cột L60 theo USP).

Detector: UV 254 nm.

Tốc độ dòng: 2 ml/ phút.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Tiến hành chạy sắc ký theo chương trình ở bảng sau:

Thời gian (min)	Dung môi A (%)	Dung môi B (%)
0	70	30
2	70	30
45	45	55
46	70	30
50	40	30

Tiến hành

Thử tính phù hợp của hệ thống

Tiêm dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ. Hệ số đối xứng của pic mometason furoat phải không quá 1,5. RSD % của diện tích pic chuẩn 6 lần tiêm phải không quá 2,0 %.

Lưu ý: Thời gian lưu tương đối của pic diethyl phthalat và mometason furoat lần lượt là 0,4 và 1,0.

Tiêm dung dịch chuẩn và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ.

Tính hàm lượng % mometason furoat có trong mẫu theo công thức sau:

$$X\% = (R_U / R_S) \times (C_S / M_T) \times 20 \times 100$$

Trong đó:

R_U : Tỷ lệ diện tích giữa pic của mometason furoat và diethyl phthalat có được từ sắc ký đồ của dung dịch thử.

R_S : Tỷ lệ diện tích giữa pic của mometason furoat và diethyl phthalat có được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

C_S : Nồng độ của chuẩn mometason furoat trong dung dịch chuẩn (mg/ml).

M_T : Khối lượng mẫu thử (mg).

Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng theo hướng dẫn của ICH^[4].

Kết quả và bàn luận

Khảo sát tính phù hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ. Thông số về sắc ký như hệ số đối xứng của pic mometason và thông số về độ chụm của kết quả định tính, định lượng thể hiện

ở % RSD đối với: thời gian lưu của pic mometason và % RSD đối với tỷ lệ diện tích giữa pic mometason và diethyl phthalat trên 6 lần tiêm được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Thử tính phù hợp của hệ thống sắc ký (n = 6)

STT	Thời gian lưu pic mometason furoat (phút)	Diện tích pic mometason furoat (A)	Diện tích pic diethyl phthalat (B)	A/B	Hệ số đối xứng
1	34,026	1417855	1385659	1,0232	0,995
2	34,024	1418743	1390582	1,0203	0,995
3	34,023	1418933	1388982	1,0216	0,993
4	34,014	1419270	1390514	1,0207	0,996
5	34,035	1419545	1391834	1,0199	1,000
6	33,971	1416420	1391120	1,0182	1,008
Trung bình	34,015	1418461	1389782	1,0206	0,998
RSD (%)	0,07	0,08	0,16	0,17	0,55

**Thẩm định phương pháp nghiên cứu
Tính đặc hiệu**

Tiêm vào hệ thống HPLC dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch placebo, dung môi. Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu thử cho pic có cùng thời gian lưu với pic trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn (độ lệch < 2,0 %). Phổ UV-Vis của pic mometason furoat trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu thử tương tự (λ_{max} : 248,49 nm và 248,33 nm). Mẫu placebo không có pic có thời gian lưu trùng với pic mometason furoat và diethyl phthalat trên sắc ký đồ dung dịch thử. Pic mometason furoat trong sắc ký đồ dung dịch thử có độ tinh khiết đạt yêu cầu (Purity index = 1,00 (> 0,99)).

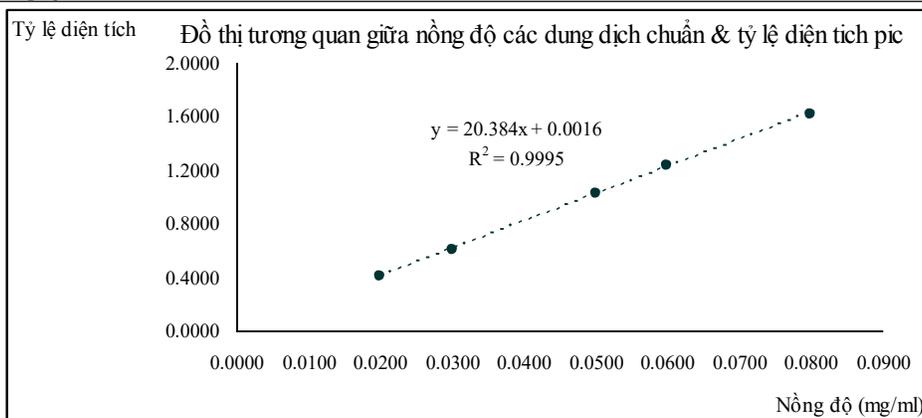
	Thời gian lưu (phút)	Độ lệch thời gian lưu (%)
Chuẩn mometason	34,015	
Thử	34,099	0,25

Tính tuyến tính

Tiến hành trên 6 mức nồng độ. Xây dựng đồ thị tương quan giữa nồng độ các dung dịch chuẩn mometason và tỷ lệ diện tích giữa pic của mometason và diethyl phthalat thu được trên các sắc ký đồ (đường chuẩn) bằng phương pháp bình phương tối thiểu (hình 2).

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính tuyến tính

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	20,0	30,0	49,9	59,9	79,9
Tỷ lệ diện tích pic trung bình	0,4043	0,6098	1,0217	1,2402	1,6187
Phương trình hồi quy:	$y = 20,384x + 0,0016$				
Hệ số tương quan:	$r = 0,9998$				



Hình 2. Đồ thị tương quan giữa nồng độ các dung dịch mometasol chuẩn và tỷ lệ diện tích pic

Độ chính xác

Đánh giá dựa vào độ lặp lại trong ngày, kiểm nghiệm viên (KNV) 1 chuẩn bị mẫu để định lượng 6 lần theo quy trình phân tích. KNV 2 tiến hành tương tự nhưng khác ngày. Độ chính xác trung gian của phương pháp là RSD% kết quả định lượng của 2 KNV.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng mometasol

STT	Khối lượng mẫu thử (g)	Tỷ lệ diện tích pic trung bình	Hàm lượng (g/100 g)
1	1085,9	1,0989	0,099
2	997,2	1,0097	0,099
3	1053,7	1,0652	0,099
4	1019,4	1,0399	0,100
5	1016,4	1,0291	0,099
6	1028,0	1,0400	0,099
Trung bình			0,099
RSD% (n = 6)			0,34 (< 2,0 %)

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp định lượng mometasol

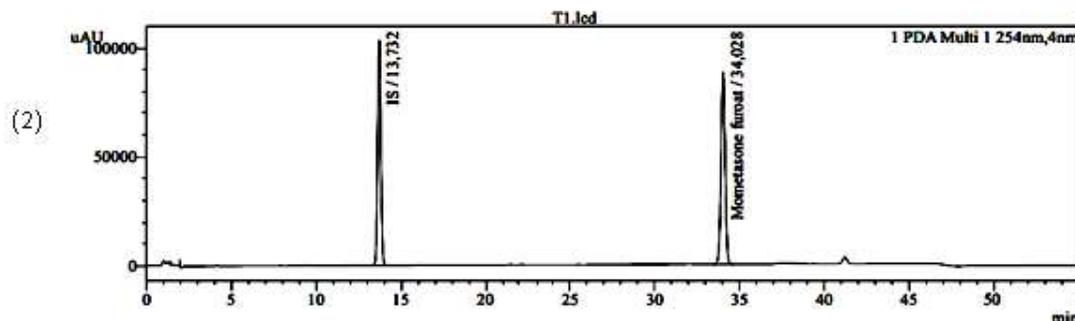
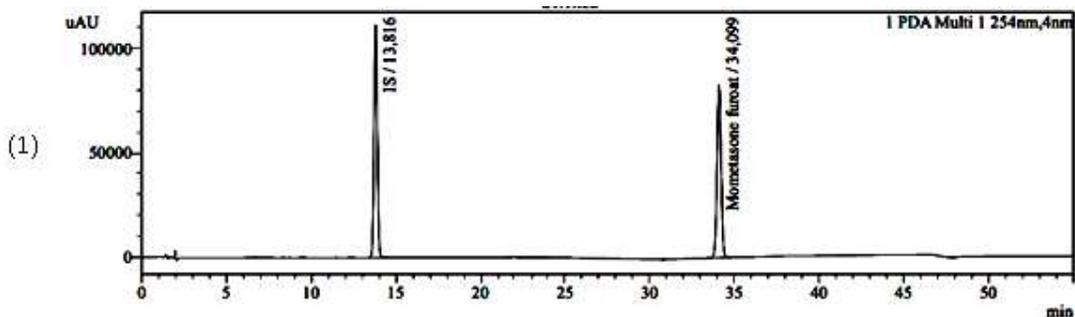
KNV 1, ngày 1 (n = 6)	Hàm lượng (%)		
	Kết quả kiểm nghiệm	Trung bình	RSD% (n = 12)
	0,099 ± 0,00034	0,101 ± 0,0016	1,56 (< 2,0 %)
KNV 2, ngày 2 (n = 6)	0,102 ± 0,00093		

Độ đúng

Cân một lượng chuẩn mometasol cho vào mẫu placebo để khi chuẩn bị mẫu theo quy trình phân tích thì thu được các dung dịch có nồng độ nằm trong khoảng 80 %, 100 % và 120 % so với nồng độ định lượng. Ở mỗi mức nồng độ thực hiện 3 lần. Tính lượng mometasol tìm thấy dựa vào phương trình hồi quy xác định ở mục tính tuyến tính. Tính tỷ lệ phục hồi là phần trăm lượng tìm thấy trên lượng chuẩn thêm.

Mức nồng độ	Tỷ lệ phục hồi (%)	RSD (n = 3) (%)
80 %	98,66	0,49
100 %	98,74	0,24
120 %	99,12	0,19
Trung bình (n = 9)	99,84 ± 0,36	0,36

Tỷ lệ phục hồi ở các mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98 % - 102 % với RSD% không quá 2,0 %. Kết quả thẩm định các thông số cho thấy đạt tiêu chuẩn chấp nhận theo ICH^[4].



ID#1 Compound Name: IS

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor
Placebo.lcd	Placebo-IS	38GTC0018	0,000	0	--
IS.lcd	Diethyl phtalat	38GTC0018	13,763	1452316	1,074
S1.1.lcd	S1	38GTC0018	13,816	1481756	1,053
T1.lcd	Do lap	38GTC0018	13,732	1344652	1,050

ID#2 Compound Name: Mometasone furoat

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor
Placebo.lcd	Placebo-IS	38GTC0018	0,000	0	--
IS.lcd	Diethyl phtalat	38GTC0018	0,000	0	--
S1.1.lcd	S1	38GTC0018	34,099	1395547	1,021
T1.lcd	Do lap	38GTC0018	34,028	1477577	0,989

Hình 3. Sắc ký đồ của dung dịch mẫu chuẩn (1) và thử (2) chuẩn bị theo phương pháp đề xuất

Bàn luận

Kết quả thử tính phù hợp hệ thống cho thấy cột Supelcosil™ LC-ABZ sử dụng cho pic của mometason có hình dạng cân đối ($T = 1,0$) cũng như sắc ký đồ thể hiện có sự tách nền (Baseline separation) là khá hoàn hảo so với tiêu chuẩn chấp nhận (Không quá 1,5^[3]), dẫn đến kết quả định lượng rất đúng ($99,84 \pm 0,36\%$) và chính xác (1,56%). Do đó, có thể chọn lựa cột trên để phân tích mẫu kem mometason.

Kết luận

Cột đề nghị (cột Supelcosil™ LC-ABZ) để định lượng mometason trong kem thuốc bằng kỹ thuật sắc ký lỏng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho kết quả đạt độ đúng, chính xác và tin cậy. Cột này có thể ứng dụng

vừa định tính, vừa định lượng mometason trong chế phẩm với điều kiện là chúng được tách ra khỏi các thành phần khác trong nền mẫu.

Tài liệu tham khảo

1. The British Pharmacopoeia (2018), *Mometasone*.
2. The British Pharmacopoeia (2018), *Mometasone cream*.
3. The United States Pharmacopoeia (2019), *Mometasone furoate cream*.
4. International conference on Harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of analytical procedure: Text and methodology*, pp. 1-13.