

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời adapalen và benzoyl peroxid trong sản phẩm gel bằng phương pháp HPLC

Nguyễn Văn Hà*, Phạm Toàn Quyền, Nguyễn Thị Bảo Anh, Bùi Thị Phường, Thái Thuỳ Trinh, Phạm Như Quỳnh, Lý Lê Duy, Lê Minh Trí



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Adapalen (AP) và Benzoyl peroxid (BO) là hai hoạt chất được sử dụng kết hợp để điều trị mụn rất hiệu quả, đặc biệt trong các sản phẩm gel, tuy nhiên, tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) cho các sản phẩm gel này hiện vẫn chưa có. Mặt khác, khó khăn khi xây dựng TCCS chính là việc định lượng đồng thời hai hoạt chất. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời hai hoạt chất AP và BO trong sản phẩm gel bằng phương pháp HPLC.

Đối tượng nghiên cứu là hoạt chất AP (Ấn Độ) và hoạt chất BO (Trung Quốc). Các dung môi đạt tiêu chuẩn dùng trong sắc ký lỏng. Mẫu thử là chế phẩm gel (bao gồm AP 0,1% và BO 2,5%) được bào chế tại phòng thí nghiệm Khoa Y ĐHQG TP.HCM. Thiết bị được sử dụng là hệ thống HPLC Shimadzu với điều kiện sắc ký là: cột C18 RP (250 x 4,6mm; 5 μ m), thể tích tiêm 20 μ L, bước sóng phát hiện 270 nm, tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ cột 30°C và pha động bao gồm acetonitril - tetrahydrofuran - dung dịch acid formic 0,1% trong nước cất theo tỉ lệ 42 : 32 : 26. Phương pháp định lượng được thẩm định các chỉ tiêu tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính và miễn giá trị, độ đúng, độ chính xác theo hướng dẫn của ICH.

Từ khóa: Adapalen, benzoyl peroxid, phương pháp HPLC, định lượng đồng thời

GIỚI THIỆU

Mụn trứng cá là căn bệnh thường gặp trên da của thanh thiếu niên hoặc người trưởng thành, gây ảnh hưởng tới chất lượng sống của các bệnh nhân khi mắc phải. Về mặt điều trị, nhiều nghiên cứu khác nhau đều có chung quan điểm sử dụng các retinoid dùng ngoài (trong đó có AP) kết hợp với kháng sinh dùng ngoài (trong đó có BO) để khởi đầu điều trị mụn cho hiệu quả rõ rệt.

Adapalen (AP) là một retinoid tổng hợp thuộc thế hệ thứ ba, có tác dụng kháng viêm nhẹ, giúp trung tính hoá các biểu mô nang tiết nhờn và là thuốc đầu tay dùng ngoài để trị mụn trứng cá. Hiệu quả của AP đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu lâm sàng¹⁻³. Tại Mỹ, AP được bào chế dưới dạng kem 0,1%, gel 0,1%, gel 0,3%, trong đó, dạng gel 0,1% là phổ biến nhất. Năm 2016, dạng gel (chứa adapalen 0,1%) với tên biệt dược Differin đã được FDA chấp thuận sử dụng không kê toa trong điều trị mụn^{4,5}.

Benzoyl peroxid (BO) có tên gọi khác là dibenzoyl peroxid, là tác nhân kháng khuẩn được sử dụng do khả năng chống lại *Propionibacterium acnes* (là vi khuẩn kỵ khí thường xuất hiện trong mụn trứng cá) một cách hiệu quả. Hoạt chất BO có nhiều dạng sản phẩm với nhiều tên thương mại khác nhau, nồng độ từ 2,5 – 10% như các dạng lotion, kem, gel, mặt nạ,

nước rửa. Tại Mỹ, BO có cả hai dạng kê toa và không kê toa¹⁻³.

Gần đây, dạng bào chế gel kết hợp giữa AP 0,1% và BO 2,5% cho hoạt tính kháng khuẩn cao và hiệu quả điều trị mụn trứng cá tốt ở các dạng vừa và nặng. Nghiên cứu của Sittart và cộng sự (2015) đã chứng minh rằng kết hợp này mang lại hiệu quả hơn các đơn trị liệu và có tính an toàn hơn⁶. Tuy nhiên, khó khăn trong quá trình sản xuất gel là xây dựng TCCS, mà cụ thể hơn là xây dựng quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất trong sản phẩm.

Hiện nay, trong Dược điển Mỹ (USP), Dược điển Anh (BP), Dược điển Nhật (JP)...phiên bản hiện hành chỉ có phương pháp định lượng riêng từng hoạt chất trong sản phẩm gel bằng một số phương pháp như UV-Vis, HPLC, định lượng trong môi trường khan... Mặt khác, trong Dược điển Việt Nam V hiện vẫn chưa có phương pháp định lượng đồng thời hai hoạt chất này.

Với những lý do nêu trên, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục tiêu xây dựng quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất AP và BO trong sản phẩm gel bằng phương pháp HPLC, tạo cơ sở cho việc kiểm tra chất lượng các sản phẩm gel chứa hai hoạt chất này.

Khoa Y, Đại Học Quốc Gia TP.HCM, Việt Nam

Liên hệ

Nguyễn Văn Hà, Khoa Y, Đại Học Quốc Gia TP.HCM, Việt Nam

Email: nvha@medvnu.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 20-10-2020
- Ngày chấp nhận: 20-12-2020
- Ngày đăng: 31-12-2020

DOI:



Bản quyền

© ĐHQG TP.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Hà NV, Quyền P T, Anh NT B, Phường B T, Trinh T T, Quỳnh P N, Duy LL, Trí LM. **Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời adapalen và benzoyl peroxid trong sản phẩm gel bằng phương pháp HPLC.** *Sci. Tech. Dev. J. - Health Sci.*; 1(2):64-74.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Hoá chất và dung môi

- Chuẩn Adapalen (Sigma-Aldrich – Đức, Secondary Standard)
- Chuẩn Benzoyl peroxid (Sigma-Aldrich – Đức, Primary Standard)
- Hoạt chất Adapalen tinh khiết 98%, Ấn Độ.
- Hoạt chất Benzoyl Peroxid tinh khiết 98%, Trung Quốc.
- Các dung môi: Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran, Acid formic, Nước cất đạt chuẩn HPLC.
- Mẫu thử: Chế phẩm gel được bào chế tại phòng thí nghiệm Khoa Y ĐHQG TP.HCM với công thức:
Adapalen 0,1%
Benzoyl peroxid 2,5%
Simugel 600 PHA 1%
Natri docusat 0,1%
Dinatri EDTA 0,1%
Glycerol 5%
Poloxamer 124 1%
Propylen glycol 2%
Nước cất vừa đủ 100%

Thiết bị và thông số

- Hệ thống HPLC SHIMADZU Prominence-I LC-2030C 3D, đầu dò PDA (190–800 nm), autosampler.
- Cột C18 RP, kích thước hạt 5 μm , 4,6 mm x 250mm.
- Thông số sắc ký: Thể tích tiêm 20 μL . Bước sóng phát hiện: 270 nm. Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Nhiệt độ cột: 30⁰C.
- Xử lý thông tin: Hệ điều hành Microsoft Windows 10, phần mềm Lab Solution đi kèm theo hệ thống HPLC, Microsoft Excel 2010.

Phương pháp nghiên cứu

Trong quá trình thực nghiệm, tất cả các mẫu đều được tiêm 3 lần lấy kết quả trung bình.

Điều kiện sắc ký

Theo USP 41, phương pháp HPLC dùng hệ pha động acetonitril - tetrahydrofuran - trifluoroacetic acid - nước cất (21 : 16 : 0,01 : 13) được sử dụng để xác định hoạt chất AP trong sản phẩm gel⁷ và hệ pha động acetonitril - nước cất (5 : 10) được sử dụng để xác định hoạt chất BO trong sản phẩm gel⁸.

Kết hợp một số kết quả các nghiên cứu khác cũng như điều kiện thực nghiệm và khảo sát sơ bộ, nghiên cứu này lựa chọn sử dụng hệ dung môi acetonitril - tetrahydrofuran - dung dịch 0,1% acid formic trong

nước cất theo tỉ lệ 42 : 32 : 26 để định lượng đồng thời hai hoạt chất.

Dung môi pha loãng: acetonitril - tetrahydrofuran tỉ lệ 55 : 45

Dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn AP: Nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$ AP trong dung môi pha loãng. Lọc qua màng Millipore 0,45 μm

- Dung dịch chuẩn BO: Nồng độ 1 mg/ml BO trong dung môi pha loãng. Lọc qua màng Millipore 0,45 μm

- Dung dịch chuẩn đối chiếu AP và BO: Nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$ AP và 1 mg/ml BO trong dung môi pha loãng. Cân chính xác 20 mg AP và 500 mg BO cho vào BDM 50 ml, thêm khoảng 2/3 lượng dung môi pha loãng, siêu âm 20 phút, thỉnh thoảng lắc đều, thêm dung môi pha loãng vừa đủ đến vạch. Hút chính xác 5 ml dung dịch này cho vào BDM 50 ml, thêm dung môi pha loãng vừa đủ đến vạch. Lọc qua màng Millipore 0,45 μm .

Dung dịch mẫu thử

Cân chính xác 1,0 g chế phẩm gel vào bình định mức 50 ml, thêm 2/3 lượng dung môi pha loãng, siêu âm 20 phút, thỉnh thoảng lắc đều. Thêm vừa đủ dung môi pha loãng. Lọc qua màng Millipore 0,45 μm , bỏ 1 ml dịch lọc đầu.

Dung dịch tá dược

Cân chính xác 1,0 g hỗn hợp tá dược (*Simugel 600 PHA, natri docusat, dinatri EDTA, glycerol, poloxamer 124, propylen glycol, nước cất*) với tỉ lệ tương tự như trong công thức bào chế vào bình định mức 50 ml, pha chế tương tự dung dịch mẫu thử. Lọc qua màng Millipore 0,45 μm , bỏ 1 ml dịch lọc đầu.

Thẩm định quy trình

Quy trình định lượng đồng thời hai hoạt chất AP và BO được thẩm định một số chỉ tiêu theo ICH:

a) Tính tương thích hệ thống

Tiêm 6 lần liên tiếp mẫu chuẩn vào hệ thống sắc ký. Ghi nhận các thông số: thời gian lưu (t_R), diện tích peak (S), hệ số kéo đuôi (T), số đĩa lý thuyết (N). Yêu cầu: $RSD(t_R, S, N) \leq 2\%$; $0,5 \leq T_f \leq 1,5$;

b) Tính đặc hiệu

Ghi nhận sắc ký đồ dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch tá dược, pha động. Yêu cầu: Trong sắc ký đồ của dung dịch thử, 2 peak chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 2 peak AP và BO trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Trong sắc ký đồ của dung dịch tá dược và pha động, không có peak nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 2 peak AP và BO trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn.

c) Độ tuyến tính, khoảng nồng độ tuyến tính

Pha các dung dịch có nồng độ AP và BO bằng 60%, 80%, 100%, 120%, 140% và 160% so với nồng độ của dung dịch chuẩn. Xác định phương trình hồi quy tuyến tính, hệ số tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất chuẩn có trong mẫu và đáp ứng peak thu được trên sắc ký đồ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Sử dụng phân tích hồi quy trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy và trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số trong phương trình hồi quy. *Yêu cầu:* $R^2 \geq 0,995$.

d) Độ đúng

Thêm AP và BO vào mẫu tá được để được các dung dịch có nồng độ tương ứng với 80%, 100% và 120% so với nồng độ dung dịch chuẩn. Tiến hành phân tích và tính tỷ lệ thu hồi. Thực hiện ba lần ở mỗi mức nồng độ. *Yêu cầu:*

- Tỷ lệ thu hồi trung bình ở các mức nồng độ nằm trong khoảng 98,0-102,0%
- Tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ có $RSD \leq 2,0\%$

e) Độ chính xác

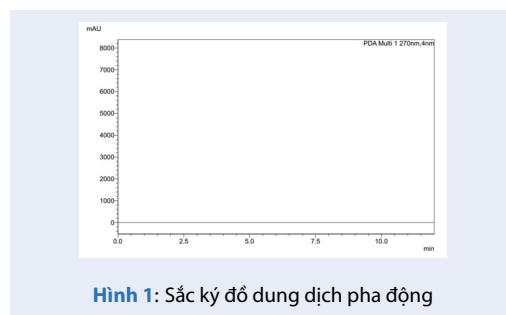
Độ lặp lại: định lượng 06 mẫu cân độc lập. *Yêu cầu:* $RSD \leq 2,0\%$ ($n = 6$). Độ chính xác trung gian: định lượng 06 mẫu cân độc lập trong hai ngày khác nhau. *Yêu cầu:* $RSD \leq 2,0\%$ ($n = 12$).

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Điều kiện sắc ký

Kiểm tra sắc ký đồ dung dịch pha động và dung môi trước khi triển khai.

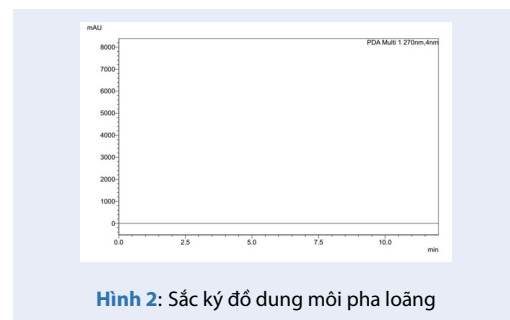
Sắc ký đồ dung dịch pha động và dung môi được trình bày lần lượt trong Hình 1 và 2 Hình 2.



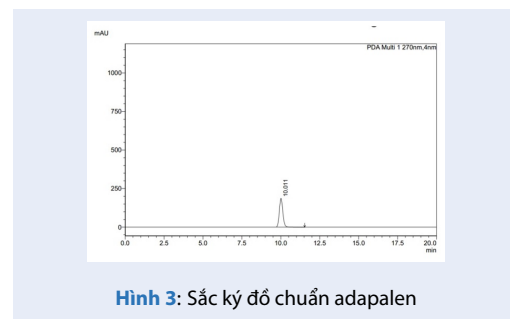
Hình 1: Sắc ký đồ dung dịch pha động

Theo Hình 1 và Hình 2, trong sắc ký đồ dung dịch pha động và dung môi pha loãng không thấy xuất hiện các peak bất thường. Như vậy, có thể thấy dung dịch pha động và dung môi pha loãng không có các tạp bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả định tính cũng như định lượng hai hoạt chất.

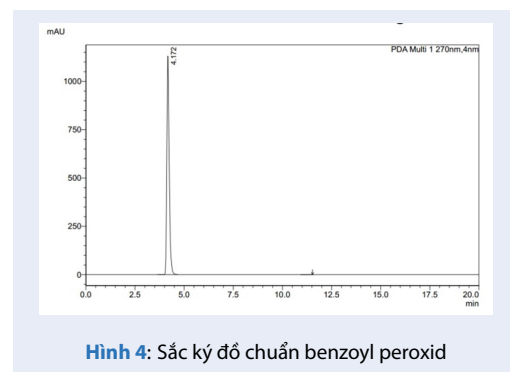
Sắc ký đồ chuẩn AP và sắc ký đồ chuẩn BO được trình bày lần lượt trong Hình 3 và Hình 4. Sắc ký đồ chuẩn



Hình 2: Sắc ký đồ dung môi pha loãng



Hình 3: Sắc ký đồ chuẩn adapalen

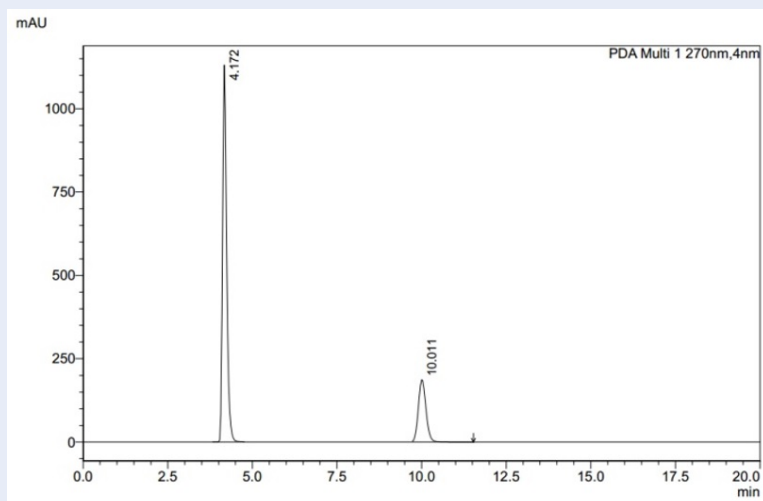


Hình 4: Sắc ký đồ chuẩn benzoyl peroxid

hỗn hợp AP và BO (40 µg/ml AP và 1 mg/ml BO trong dung môi) được trình bày trong Hình 5.

Theo Hình 3, trong sắc ký đồ chuẩn AP xuất hiện một peak có thời gian lưu 10,011 phút tại bước sóng 270 nm. Ngoài ra, trong sắc ký đồ không thấy xuất hiện peak nào khác. Như vậy, peak xuất hiện trong sắc ký đồ này chính là peak của AP và trong thành phần của chuẩn AP không có sự xuất hiện của các tạp bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu.

Theo Hình 4, trong sắc ký đồ chuẩn BO xuất hiện một peak có thời gian lưu 4,172 phút tại bước sóng 270 nm. Ngoài ra, trong sắc ký đồ không thấy xuất hiện peak nào khác. Như vậy, peak xuất hiện trong sắc ký đồ này chính là peak của BO và trong thành phần của chuẩn BO không có sự xuất hiện của các tạp bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu.



Hình 5: Sắc ký đồ chuẩn hỗn hợp AP và BO

Theo Hình 5, trong sắc ký đồ chuẩn hỗn hợp có sự xuất hiện của hai peak với thời gian lưu tương ứng 4,172 phút và 10,011 phút tại bước sóng 270 nm. Ngoài ra, trong sắc ký đồ không thấy xuất hiện peak nào khác. Như vậy, hai peak xuất hiện tương ứng chính là hai peak của BO và AP khi so sánh với sắc ký đồ chuẩn của hai chất này ở Hình 3 và Hình 4. Hơn nữa, trong thành phần của hai chuẩn cũng như khi kết hợp hai chuẩn lại trong cùng một điều kiện sắc ký không thấy có sự xuất hiện của các tạp bất thường. Như vậy, nhìn chung, hai chuẩn AP và BO đủ điều kiện làm chuẩn để so sánh với kết quả định lượng hoạt chất trong chế phẩm gel.

Tính tương thích hệ thống

Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống của phương pháp được thể hiện trong Bảng 1.

Theo Bảng 1, đối với hoạt chất AP, qua 6 lần tiêm mẫu liên tiếp, RSD của thời gian lưu là 0,17% < 2%, RSD của diện tích peak là 0,16% < 2% và RSD của số đĩa lý thuyết là 1,38% < 2%, tất cả đều đạt yêu cầu. Hơn nữa, hệ số kéo đuôi là 1,12 nằm trong vùng [0,5;1,5], đạt yêu cầu. Đối với hoạt chất BO, qua 6 lần tiêm mẫu liên tiếp, RSD của thời gian lưu là 0,09% < 2%, RSD của diện tích peak là 0,26% < 2% và RSD của số đĩa lý thuyết là 1,16% < 2%, tất cả đều đạt yêu cầu. Hơn nữa, hệ số kéo đuôi là 1,3 nằm trong vùng [0,5;1,5], đạt yêu cầu. Như vậy, phương pháp định lượng này có tính tương thích tốt với hệ thống HPLC SHIMADZU Prominence-I LC-2030C 3D, các kết quả có thể tin tưởng được.

Tính đặc hiệu

Sắc ký đồ dung dịch chuẩn được thể hiện trong Hình 5 với hai peak chính của BO và AP có thời gian lưu tương ứng 4,172 phút và 10,011 phút. Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử được trình bày trong Hình 6. Sắc ký đồ dung dịch tá dược được trình bày trong Hình 7.

Theo Hình 6, trong sắc ký đồ dung dịch mẫu thử có hai peak chính có thời gian lưu 4,191 phút và 10,083 phút tương ứng với thời gian lưu của hai peak BO và AP trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Theo Hình 7 và Hình 1, trong sắc ký đồ dung dịch tá dược và pha động không thấy xuất hiện peak nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của BO và AP trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn. Như vậy, phương pháp định lượng này đặc hiệu cho hai hoạt chất AP và BO, các tá dược sử dụng trong công thức bào chế không ảnh hưởng đến kết quả định lượng.

Độ tuyến tính và khoảng nồng độ tuyến tính

Kết quả xác định độ tuyến tính được trình bày trong Bảng 2.

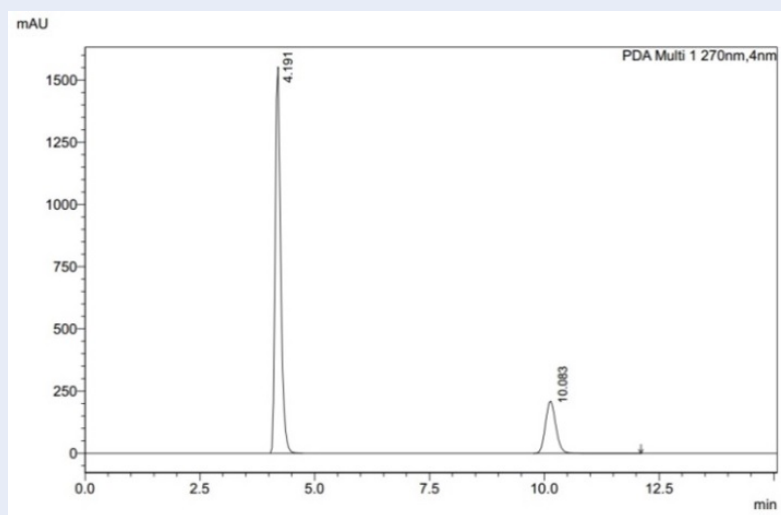
Đồ thị mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak BO được trình bày trong Hình 8. Đồ thị mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak AP được trình bày trong Hình 9.

Theo Hình 8 và Hình 9, đối với BO và AP tương ứng, hai phương trình hồi quy đều có $R^2 \geq 0,995$, đạt yêu cầu để ra và thể hiện mối tương quan mạnh giữa nồng độ và diện tích peak.

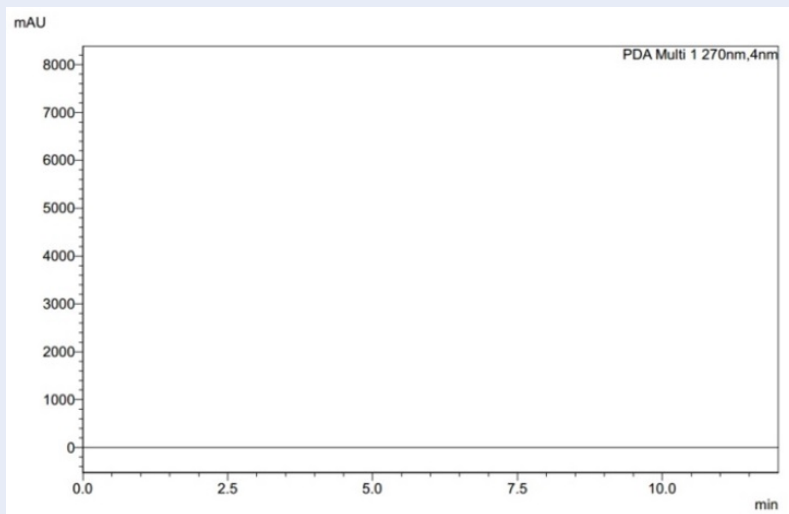
Sử dụng công cụ Data analysis trong Microsoft Excel 2010 xác định ý nghĩa của các hệ số a và b trong

Bảng 1: Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống

		Trung bình 6 lần	RSD%
Adapalen	t_R	10,10	0,17
	S	3059344,17	0,16
	T_f	1,12	
	N	6811,5	1,38
Benzoyl	t_R	4,18	0,09
	S	9112764,67	0,26
	T_f	1,30	
	N	3836,50	1,16



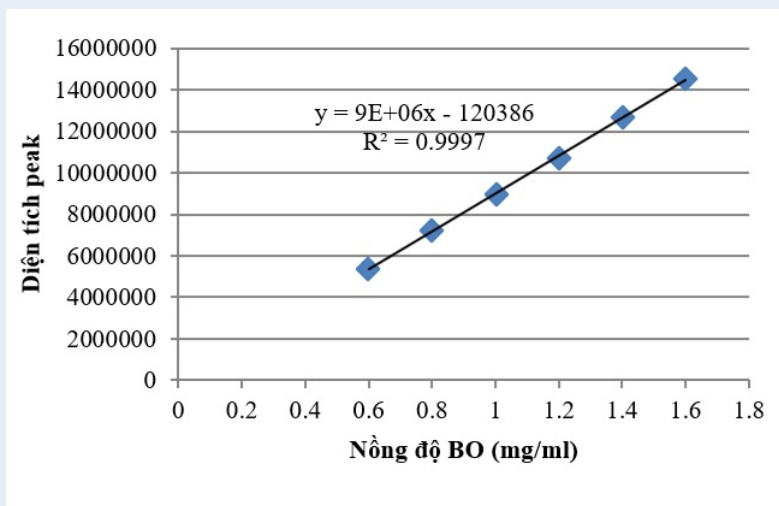
Hình 6: Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử



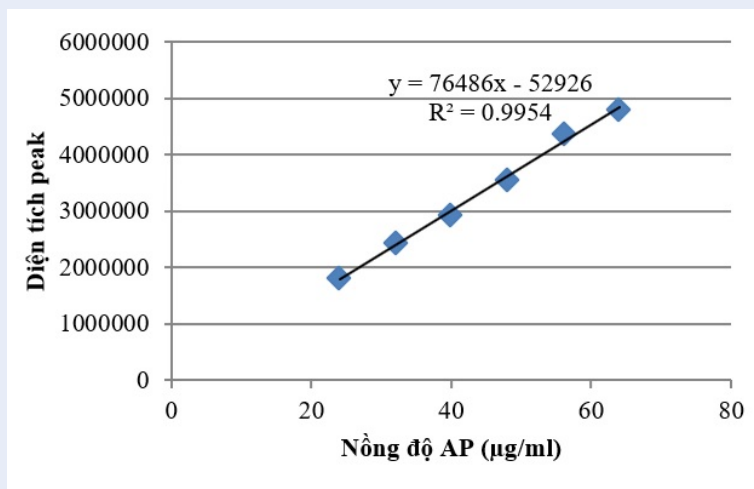
Hình 7: Sắc ký đồ dung dịch tá dược

Bảng 2: Kết quả thẩm định độ tuyến tính

Nồng độ so với chuẩn	Diện tích peak Benzoyl peroxid	Diện tích peak Adapalen
60 %	5354714	1799874
80 %	7219412	2437589
100 %	8969859	2921887
120 %	10719829	3554589
140 %	12630677	4354376
160 %	14512706	4806490



Hình 8: Đồ thị mối liên hệ giữa nồng độ - diện tích peak BO



Hình 9: Đồ thị mối liên hệ giữa nồng độ - diện tích peak AP

phương trình tuyến tính. Kết quả: đối với phương trình tuyến tính thể hiện mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak BO, hệ số a có ý nghĩa thống kê (với $p_a = 2,45 \times 10^{-8} < \alpha = 0,05$), hệ số b không có ý nghĩa thống kê (với $p_b = 0,22 > \alpha = 0,05$). Đối với phương trình tuyến tính thể hiện mối liên hệ giữa nồng độ và diện tích peak AP, hệ số a có ý nghĩa thống kê (với $p_a = 7,82 \times 10^{-6} < \alpha = 0,05$), hệ số b không có ý nghĩa thống kê (với $p_b = 0,68 > \alpha = 0,05$). Dựa trên kết quả đo được, suy ra khoảng nồng độ xác định của AP là: 24 – 64 ($\mu\text{g/ml}$), khoảng nồng độ xác định của BO là: 0,6 – 1,6 mg/ml , trong khoảng nồng độ này kết quả có tính tin cậy cao.

Độ đúng, độ chính xác

Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác được thể hiện trong Bảng 3 và Bảng 4.

Theo Bảng 3, tỷ lệ thu hồi trung bình ở các mức nồng độ đều nằm trong khoảng 98,0-102,0% và tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ đều có $\text{RSD} \leq 2,0\%$. Như vậy, phương pháp định lượng đạt yêu cầu độ đúng.

Theo Bảng 4, kết quả định lượng sáu mẫu cân độc lập trong ngày đầu tiên cho thấy $\text{RSD} (\%)$ với $n = 6$ ở cả hai hoạt chất đều đạt yêu cầu $\leq 2,0\%$. Kết quả định lượng sáu mẫu cân độc lập trong hai ngày khác nhau cho thấy $\text{RSD} (\%)$ với $n = 12$ ở cả hai hoạt chất đều đạt yêu cầu $\leq 2,0\%$. Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác, các kết quả có tính lặp lại ở ngay trong cùng một ngày đo và ở hai ngày đo độc lập khác nhau.

Như vậy, dựa trên phương pháp nghiên cứu để ra, nghiên cứu được tiến hành đúng quy trình và cho một số kết quả ban đầu khả quan. Cụ thể, phương pháp định lượng đồng thời hai hoạt chất AP và BO đạt các yêu cầu cơ bản của ICH về thẩm định quy trình phân tích, bao gồm các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác. Bước đầu có thể sử dụng phương pháp này để định lượng hai hoạt chất đồng thời, giúp tiết kiệm thời gian, công sức và góp phần xây dựng TCCS cho chế phẩm gel có sự kết hợp của hai hoạt chất này.

Áp dụng phương pháp phân tích để định lượng chế phẩm gel

Chế phẩm gel bào chế tại phòng thí nghiệm Khoa Y Đại Học Quốc Gia TP.HCM (công thức: *Adapalene 0,1%*; *Benzoyl peroxid 2,5%*; *Simugel 600 PHA 1%*; *Natri docusat 0,1%*; *Dinatri EDTA 0,1%*; *Glycerol 5%*; *Poloxamer 124 1%*; *Propylen glycol 2%*; *Nước cất vừa đủ 100%*) được định lượng bằng phương pháp này. Qua 3 lần định lượng độc lập, kết quả cho thấy phương pháp định tính và định lượng được hai hoạt

chất có trong mẫu gel với kết quả hàm lượng trung bình của AP là $101,38 \pm 0,87\%$ và của BO là $95,56 \pm 0,04\%$. Chế phẩm gel đạt yêu cầu về hàm lượng theo USP 41. Sắc ký đồ dung dịch mẫu thử gel được trình bày trong Hình 10.

Như vậy, phương pháp định lượng này hoàn toàn có thể áp dụng để định lượng các mẫu gel có sự kết hợp của hai hoạt chất AP và BO được bào chế trong phòng thí nghiệm hoặc đang lưu hành trên thị trường.

KẾT LUẬN

Phương pháp HPLC dùng hệ dung môi acetonitril-tetrahydrofuran-dung dịch 0,1% acid formic trong nước cất theo tỉ lệ 42:32:26 để định lượng đồng thời hai hoạt chất AP và BO trong sản phẩm gel đạt các chỉ tiêu *tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác* theo hướng dẫn của ICH và bước đầu có thể ứng dụng để định lượng sản phẩm gel được bào chế trong phòng thí nghiệm hoặc đang lưu hành trên thị trường và góp phần xây dựng TCCS cho các sản phẩm gel được bào chế sau này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại Học Quốc Gia TP.HCM trong khuôn khổ đề tài mã số C2020-44-04

DANH MỤC VIẾT TẮT

Tiếng Việt

TCCS: Tiêu Chuẩn Cơ Sở
ĐHQG TP.HCM: Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh
BĐM: Bình định mức

Tiếng Anh

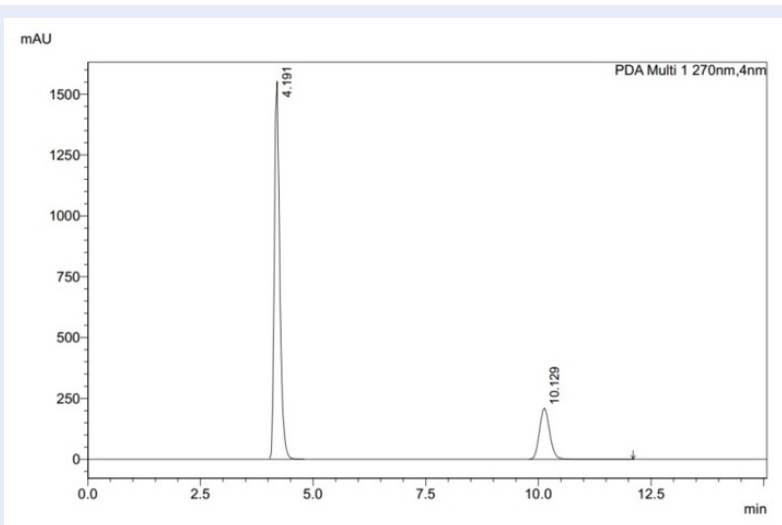
AP: Adapalene
BO: Benzoyl Peroxid
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)
RP: Reverse Phase (Pha đảo)
ICH: International Conference Harmonisation (Hội đồng quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký Dược phẩm sử dụng cho con người)
FDA: Food and Drug Administration (Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ)
USP: United States Pharmacopoeia (Dược điển Hoa Kỳ)
BP: British Pharmacopoeia (Dược điển Anh)
JP: Japanese Pharmacopoeia (Dược điển Nhật Bản)
UV – Vis: Ultraviolet visible spectroscopy (Phương pháp quang phổ tử ngoại – khả kiến)
RSD: Relative Standard Deviation (Độ lệch chuẩn tương đối)

Bảng 3: Kết quả thẩm định độ đúng

MẪU	m CÂN			NỒNG ĐỘ ĐO			DIỆN TÍCH PEAK			TỈ LỆ THU HỒI (%)					
	AP (mg)	BO (mg)	BO (mg)	AP (µg/ml)	BO (mg/ml)	BO (mg/ml)	AP	BO	BO	AP	TB	RSD (%)	BO	TB	RSD (%)
80%	1	16,01	400,11	32,02	0,80	0,80	2433918	7361044	7361044	99,38	99,20	0,95	100,94	101,25	0,93
	2	16,05	400,21	32,10	0,80	0,80	2456005	7424400	7424400	100,04			101,79		
	3	16,09	400,08	32,18	0,80	0,80	2416374	7364995	7364995	98,18			101,01		
100%	1	20,02	500,01	40,04	1,00	1,00	3041932	9140331	9140331	99,33	99,21	0,18	100,30	100,18	0,18
	2	20,15	500,12	40,30	1,00	1,00	3060895	9107476	9107476	99,31			99,92		
	3	20,11	500,05	40,22	1,00	1,00	3045467	9143315	9143315	99,00			100,33		
120%	1	24,04	600,12	48,08	1,20	1,20	3668127	10828359	10828359	99,75	99,40	0,33	99,00	99,29	0,33
	2	24,12	600,06	48,24	1,20	1,20	3665371	11032012	11032012	99,34			100,87		
	3	24,11	600,15	48,22	1,20	1,20	3654589	10719829	10719829	99,09			98,00		

Bảng 4: Kết quả thẩm định độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian)

MẪU	DIỆN TÍCH PEAK			RSD(%) n=6			DIỆN TÍCH PEAK			RSD (%) n = 12		
	AP	BO	BO	AP	BO	BO	AP	BO	BO	AP	BO	BO
1	3070987	9371826	9319920	0,80	0,52		3038647	9252974	9279701	0,95	0,93	
2	3031040	9319920	9420221				3041933	9279701	9174099			
3	3096871	9420221	9337670				3005124	9174099	9200697			
4	3055064	9337670	9449005				3044987	9200697	9349005			
5	3087395	9449005	9389604				3012440	9239631	9349005			
6	3085280	9389604					3045467	9344032				



Hình 10: Sắc ký đồ mẫu thử gel

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả khẳng định không có xung đột lợi ích đối với các nghiên cứu, tác giả và xuất bản bài báo.

ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Nguyễn Văn Hà và Lê Minh Trí giới thiệu nghiên cứu, thiết kế nghiên cứu, lựa chọn nguyên liệu, tá dược, đóng gói nội dung.

Nguyễn Văn Hà, Phạm Toàn Quyền, Nguyễn Thị Bảo Anh, Bùi Thị Phương, Thái Thụy Trinh, Phạm Như Quỳnh, Lý Lê Duy tiến hành khảo sát thực nghiệm, thu thập số liệu, xử lý kết quả

Nguyễn Văn Hà, Nguyễn Thị Bảo Anh, Thái Thụy Trinh, Phạm Như Quỳnh tham gia viết bản thảo, chỉnh sửa nội dung bản thảo.

Lê Minh Trí hướng dẫn, chỉnh sửa, góp ý cho nội dung bản thảo.

Nguyễn Văn Hà là nhóm trưởng, chịu trách nhiệm chính trong phân công nhiệm vụ, trong nội dung công việc, nội dung bài báo, trong kiểm tra, liên lạc, đăng bài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akhavan A, Bershad S. Topical acne drugs. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003;4:473–492. PMID: 12814337. Available from: <https://doi.org/10.2165/00128071-200304070-00004>.
2. Bershad SV. The modern age of acne therapy: A review of current treatment options. *Mt Sinai J. Med.* 2001;68:279–285. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11514915/>.
3. Osman-Ponchet H, et al. Fixed-Combination Gels of Adapalene and Benzoyl Peroxide Provide Optimal Percutaneous Absorption Compared to Monad Formulations of These Compounds: Results from Two In Vitro Studies. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017;7(1):123–131. PMID: 27900658. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0159-9>.
4. FDA approves Differin Gel 0.1% for over-the-counter use to treat acne. 2016; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-differin-gel-01-over-counter-use-treat-acne>.
5. [Citation day: 09/05/2019]; Available from: <https://www.differin.com/AboutDifferin/Default.aspx>.
6. Sittart JA, Costa A, Mulinari-Brenner F, Follador I, Azulay-Abulafia L, Castro LC. Multicenter study for efficacy and safety evaluation of a fixed dose combination gel with adapalene 0.1% and benzoyl peroxide 2.5% (Epiduo[®] for the treatment of acne vulgaris in Brazilian population. *An Bras Dermatol.* 2015;90:1–16. PMID: 27168522. Available from: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153969>.
7. United States Pharmacopoeia 41. Adapalene gel monograph. 2018;1:85–88.
8. United States Pharmacopoeia 41. Benzoyl peroxide gel monograph. 2018;1:490–492.

Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitative determination of adapalene and benzoyl peroxide in gel products

Van-Ha Nguyen^{*}, Toan-Quyên Pham, Thi-Bao-Anh Nguyen, Thi-Phuong Bui, Thuy-Trinh Thai, Nhu-Quyên Pham, Le-Duy Ly, Minh-Tri Le



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

ABSTRACT

Adapalene (AP) and Benzoyl peroxide (BO) have been used to treat acnes very efficient for many years, especially in gel products. But nowadays, that gel products still don't have in-house standard. And furthermore, the most difficult thing to build in-house standard is to assay simultaneously. The aim of this research is to build a method to assay two of AP and BO simultaneously by HPLC method. Subjects: AP (from India) and BO (from China). Solvents get the quality standard to use in liquid chromatography. Sample: gel product (AP 0.1% and BO 2.5%) prepared at Laboratory of School of Medicine, National University of HCMC. Chromatographic system: HPLC Shimadzu system with column C18 RP (250 x 4.6 mm; 5 μ m), injection volume 20 μ L, detector at 270 nm, flow rate 1 mL/min, temperature 30°C, mobile phase with acetonitril - tetrahydrofuran - acid formic 0.1% in water 42 : 32 : 26. Validations: system suitability, specificity, linearity, accuracy, precision adapt to ICH.

Results: The HPLC method for simultaneous quantitative determination of adapalene and benzoyl peroxide in gel products was built successfully. The method was achieved all validations term adapt to ICH: *system suitability, specificity, linearity, accuracy, precision*. Furthermore, that method is used to assay the concentration of two API (AP and BO) in the product (prepared at Laboratory of School of Medicine, National University of HCMC) with result: the concentration of AP is $101.38 \pm 0.87\%$ and that of BO is $95.56 \pm 0.04\%$, get the standard of USP 41.

Key words: Adapalene, benzoyl peroxide, HPLC method, gel, quantitative simultaneously

School of Medicine, Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Van-Ha Nguyen, School of Medicine, Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: nvha@medvnu.edu.vn

History

- Received: 20-10-2020
- Accepted: 20-12-2020
- Published: 31-12-2020

DOI :



Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Nguyen V, Pham T, Nguyen T, Bui T, Thai T, Pham N, Ly L, Le M. **Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitative determination of adapalene and benzoyl peroxide in gel products.** *Sci. Tech. Dev. J. - Health Sci.*; 1(2):64-74.