

Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng l-tetrahydropalmitine trong viên nén giải phóng kéo dài bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phạm Thị Phương Dung^{1,2*}, Trần Phương Thảo², Nguyễn Thị Trâm², Nguyễn Trần Linh¹, Nguyễn Thạch Tùng¹

¹Khoa Bào chế và Công nghệ dược phẩm, Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Cửa Nam, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Dược, Trường Đại học Đại Nam, 1 phố Xóm, phường Phú Lương, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/4/2025; ngày chuyển phân biện 23/4/2025; ngày nhận phân biện 20/5/2025; ngày chấp nhận đăng 26/5/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng l-tetrahydropalmitine (l-THP) trong các mẫu viên nén giải phóng kéo dài (GPKD) trong xây dựng tương quan *in vitro* - *in vivo*. Nghiên cứu sử dụng cột pha đảo C18 (250×4,6 mm; 5 μm), thể tích tiêm mẫu 20 μl, thời gian phân tích 10 phút. Các điều kiện pha động và tốc độ dòng khác nhau được khảo sát, và pha động tối ưu là hỗn hợp acetonitrile - dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 (tỷ lệ 30:70) với tốc độ dòng 1,5 ml/phút. Phương pháp có giới hạn phát hiện (LOD) là 3,125 ng/ml, giới hạn định lượng (LOQ) là 12,5 ng/ml và khoảng tuyến tính 10-100 μg/ml ($R^2=0,999$). Kết quả thẩm định cho thấy, phương pháp đáp ứng đầy đủ các tiêu chí theo hướng dẫn của Hội đồng Quốc tế về Hải hòa các yêu cầu kỹ thuật đối với dược phẩm (ICH) Q2 (R1) về độ chính xác, độ đúng, độ đặc hiệu, tuyến tính và độ nhạy. Phương pháp được áp dụng để định lượng l-THP trong 3 mẫu viên nén GPKD đã bào chế (FR, MR và SR) thu được kết quả lần lượt là 105,25±0,73, 100,67±1,59 và 103,65±1,09%. Phương pháp có thể sử dụng để kiểm soát chất lượng trong nghiên cứu bào chế viên nén GPKD chứa l-THP.

Từ khóa: định lượng, l-tetrahydropalmitine, rotundin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, viên nén giải phóng kéo dài.

Chỉ số phân loại: 2.4, 3.4

Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of l-tetrahydropalmitine in extended-release tablets

Thi Phuong Dung Pham^{1,2*}, Phuong Thao Tran², Thi Tram Nguyen², Tran Linh Nguyen¹, Thach Tung Nguyen¹

¹Faculty of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong Street, Cua Nam Ward, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Pharmacy, Dai Nam University, 1 Xom Street, Phu Luong Ward, Hanoi, Vietnam

Received 21 April 2025; revised 20 May 2025; accepted 26 May 2025

Abstract:

This study aimed to develop and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantification of l-tetrahydropalmitine (l-THP) in extended-release tablets used in an *in vitro* - *in vivo* correlation study. A reversed-phase C18 column (250×4.6 mm; 5 μm) was used with an injection volume of 20 μl and a total run time of 10 minutes. Various mobile phase compositions and flow rates were investigated, and the optimal mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.05 M phosphate buffer (pH 4.5) in a 30:70 ratio, with a flow rate of 1.5 ml/min. The method demonstrated a limit of detection (LOD) of 3.125 ng/ml and a limit of quantification (LOQ) of 12.5 ng/ml, with a linear calibration range from 10 to 100 μg/ml ($R^2=0.999$). Validation was conducted in accordance with the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2(R1) guidelines, confirming the method's accuracy, precision, specificity, linearity, and sensitivity. The method was successfully applied to quantify l-THP in three extended-release tablet samples (FR, MR, SR), yielding measured drug contents of 105.25±0.73, 100.67±1.59, and 103.65±1.09%, respectively. This HPLC method can be used for quality control in the formulation and development of extended-release tablets containing l-THP.

Keywords: extended-release tablets, high-performance liquid chromatography, l-tetrahydropalmitine, quantification, rotundine.

Classification numbers: 2.4, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: dung.pham.dkh@gmail.com/dungptp@dainam.edu.vn

1. Đặt vấn đề

l-tetrahydropalmatine ($C_{21}H_{25}NO_4$, l-THP) là một alkaloid được chiết từ củ bình vôi, đã được nghiên cứu sử dụng trong cai nghiện opioid [1, 2]. Tuy nhiên, l-THP có thời gian bán thải ngắn, khoảng $3,9 \pm 0,9$ giờ ở chuột, thỏ [3, 4], nên cần bào chế dưới dạng thuốc GPKD nhằm giảm số lần dùng thuốc, giảm tác dụng phụ, duy trì nồng độ được chất ổn định trong huyết tương. Để tối ưu hóa công thức viên nén GPKD và rút ngắn quá trình phát triển thuốc, các mẫu viên nén GPKD chứa l-THP trong nghiên cứu này sẽ được dùng để đánh giá sinh khả dụng và thiết lập tương quan *in vitro* - *in vivo*. Tuy nhiên, hiện Dược điển Việt Nam và Dược điển Trung Quốc chỉ đề cập phương pháp định lượng l-THP từ nguyên liệu [5, 6], viên nén giải phóng ngay [7-9] và thuốc tiêm rotundin sulfat [10] mà chưa có phương pháp định lượng l-THP trong viên nén GPKD. Theo ICH [11, 12] và Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (US-FDA) [13], phương pháp phân tích cần phải thẩm định lại khi sử dụng với dạng bào chế mới. Với viên nén GPKD, sự có mặt của các tá dược kiểm soát giải phóng là polyme có độ nhớt cao, có thể ảnh hưởng tới khả năng tách của pha động và độ chính xác của phương pháp định lượng. Vì vậy, việc xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC để định lượng l-THP trong viên nén GPKD là cần thiết, để đảm bảo độ chính xác của tương quan *in vitro* - *in vivo* và hỗ trợ phát triển công thức viên nén GPKD sau này.

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Chuẩn l-tetrahydropalmatine, số kiểm soát CFS201902, hàm lượng 99,54%, nhà sản xuất ChemFaces, Trung Quốc. Chế phẩm thử là các viên nén GPKD chứa 30 mg l-THP bào chế tại Khoa Bào chế - Công nghệ Dược phẩm, Trường Đại học Dược Hà Nội. Các dung môi đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký: methanol, acetonitrile, nước.

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao JASCO tiêm mẫu thủ công (Nhật Bản), máy siêu âm Elmasonic S100H (Đức), máy lắc xoáy IKA Vortex 3 (Đức), máy ly tâm HERMLE Z200A (Đức), cân phân tích Ohaus PA214 (Hoa Kỳ), thiết bị lọc hút chân không bằng thủy tinh borosilicat, màng lọc cellulose acetat 0,2 μ m. Các thiết bị được hiệu chuẩn theo quy định.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xử lý mẫu:

Tham khảo phương pháp xử lý mẫu viên nén rotundin của Dược điển Việt Nam, viên nén GPKD thường sử dụng các tá dược trương nở chậm, độ nhớt cao nên thời gian siêu

âm hòa tan được điều chỉnh nhằm thu được hỗn dịch đồng nhất. Cân 20 viên, tính khối lượng trung bình rồi nghiền thành bột mịn, rây qua rây 180 μ m. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 25 mg l-THP vào bình định mức 50 ml, thêm 20 ml methanol, lắc xoáy 5 phút, siêu âm 15 phút, sau đó bổ sung pha động tới vạch, lắc đều. Ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy phần dịch trên, pha loãng 10 lần bằng pha động, lắc đều, lọc qua màng cellulose acetat 0,45 mm sau đó tiêm vào hệ thống sắc ký.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc l-THP 1 mg/ml trong methanol. Pha loãng bằng pha động để được dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 50 μ g/ml.

Chuẩn bị mẫu placebo: Cân các thành phần tá dược theo công thức bào chế, trộn đồng lượng. Cân một lượng bột tá dược bằng với lượng tá dược có trong mẫu bột viên chứa 25 mg dược chất. Sau đó xử lý tương tự như mẫu bột viên ở trên.

Khảo sát điều kiện sắc ký:

Cột Thermo Hypersil Gold C18 (250x4,8 mm; 5 mm), nhiệt độ cột 25°C, thể tích tiêm mẫu 20 μ l. Bước sóng phát hiện, thành phần pha động, tốc độ dòng được lựa chọn từ các kết quả khảo sát xây dựng phương pháp.

Quét phổ dung dịch chuẩn 50 μ g/ml trong khoảng bước sóng 200-800 nm, lựa chọn bước sóng hấp thụ cực đại để phát hiện l-THP trong các mẫu phân tích.

Khảo sát các hệ pha động: methanol; acetonitrile; acetonitrile - nước tỷ lệ 50:50; acetonitrile - đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 các tỷ lệ 30:70, 50:50, 70:30; acetonitrile - đệm phosphat pH 5,5 các tỷ lệ 30:70, 50:50, 70:30; acetonitrile - đệm phosphat pH 6,5 các tỷ lệ 30:70, 50:50, 70:30; acetonitrile - đệm acetat pH 4,5 các tỷ lệ 30:70, 50:50, 70:30 với các tốc độ dòng 1,0, 1,2 và 1,5 ml/phút. Pha động được lựa chọn sao cho pic của chất phân tích gọn, đỉnh nhọn, tách hoàn toàn khỏi pic tạp, pic không có hiện tượng kéo đuôi, đổ đầu, chiều cao và diện tích lớn, thời gian lưu hợp lý.

Thẩm định phương pháp phân tích: Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo các tiêu chí của ICH Q2 (R1) [11].

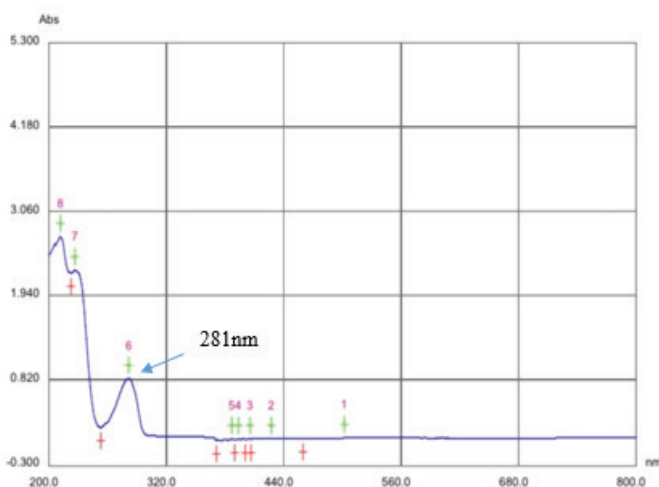
Định lượng l-THP trong viên nén giải phóng kéo dài: Sử dụng phương pháp đã xây dựng và thẩm định để định lượng l-THP trong các mẫu viên nén GPKD bào chế tại Khoa Bào chế - Công nghệ dược phẩm, Trường Đại học Dược Hà Nội. Các mẫu viên này có tốc độ giải phóng khác nhau là nhanh (fast release - FR), trung bình (medium release - MR) và chậm (slow release - SR) được sử dụng trong nghiên cứu xây dựng tương quan *in vitro* - *in vivo*. Hàm lượng l-THP trong viên là 30 mg.

Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

3. Kết quả

3.1. Xây dựng phương pháp định lượng

Khảo sát lựa chọn bước sóng: Từ phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch chuẩn l-THP 50 µg/ml, bước sóng phân tích được lựa chọn là 281 nm vì tại đây xuất hiện đỉnh hấp thụ rõ nét, tách biệt với các đỉnh khác trên phổ (hình 1).



Hình 1. Phổ hấp thụ từ ngoại khả kiến của l-THP.

Bảng 1. Kết quả khảo sát pha động.

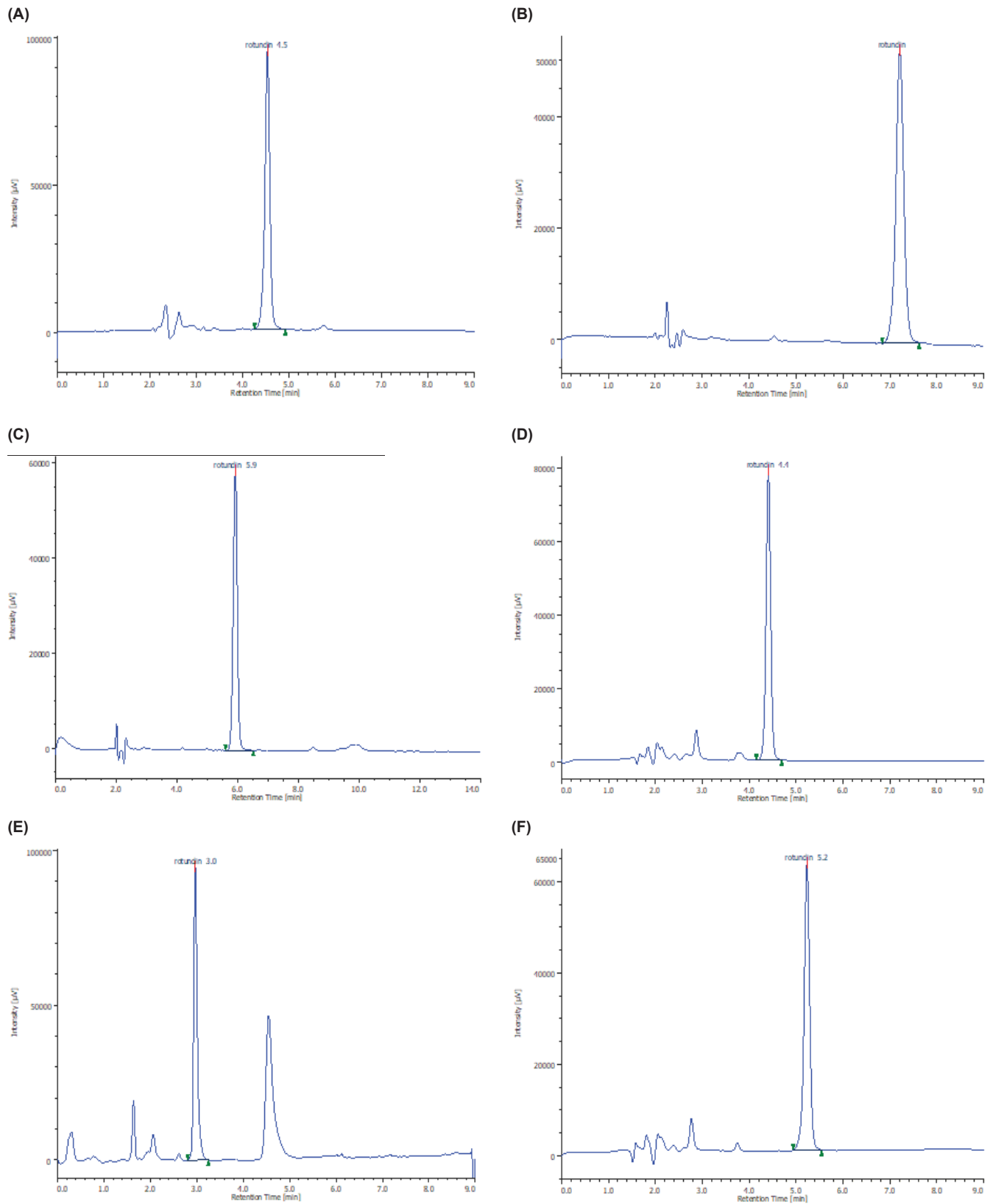
Pha động	Tỷ lệ	Khả năng tách	Thời gian lưu (phút)	Số đĩa lý thuyết (N)	Hệ số đối xứng (SF)
Methanole	100	Không	-	-	-
Acetonitrile (ACN)	100	Kém	2,11	4701	0,90
ACN - Nước	50:50	Có	5,72	8288	1,15
ACN - AB pH 4,5	70:30	Có	4,53	9282	0,90
ACN - AB pH 4,5	50:50	Có	7,21	9195	0,97
ACN - AB pH 4,5	30:70	Không	-	-	-
ACN - PB pH 4,5	70:30	Kém	3,71	3006	1,08
ACN - PB pH 4,5	50:50	Kém	2,79	6558	0,92
ACN - PB pH 4,5	30:70	Có	5,92	9461	0,97
ACN - PB pH 5,5	70:30	Không	-	-	-
ACN - PB pH 5,5	50:50	Có	4,41	10164	0,99
ACN - PB pH 5,5	30:70	Không	-	-	-
ACN - PB pH 6,5	70:30	Có	2,97	7638	0,93
ACN - PB pH 6,5	50:50	Có	5,23	10025	1,36
ACN - PB pH 6,5	30:70	Không	-	-	-

ACN: acetonitrile; AB: dung dịch đệm acetat; PB: dung dịch đệm phosphat.

Khảo sát lựa chọn pha động: Tiến hành phân tích mẫu thử bằng các hệ pha động như đã liệt kê ở phần phương pháp nghiên cứu với tốc độ 1,5 ml/phút, bước sóng phân tích 281 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và hình 2.

Do l-THP là một alkaloid khó tan trong nước, có độ tan phụ thuộc pH và mức độ phân cực trung bình, do đó khả năng tách chất phân tích khỏi nền mẫu phụ thuộc vào mức độ phân cực và pH của pha động. Từ bảng 1 có thể thấy, khi mức độ phân cực tăng (methanole; acetonitrile; hỗn hợp acetonitrile:nước), khả năng tách chất phân tích cũng tăng lên. Pha động acetonitrile - nước tỷ lệ 50:50 có khả năng tách tốt, pic gọn, đỉnh nhọn, hình dạng cân đối, thời gian lưu phù hợp cho quá trình phân tích định lượng (5,72 phút), diện tích và chiều cao pic lớn. Tuy nhiên, khi thẩm định phương pháp không đạt yêu cầu về độ đúng.

Thay nước bằng các dung dịch đệm acetat và phosphat có pH từ 4,5 đến 6,5. Kết quả cho thấy, tỷ lệ dung dịch đệm trong pha động, loại dung dịch đệm (acetat hay phosphat) và pH đều ảnh hưởng tới khả năng tách chất phân tích, thời gian lưu, diện tích, số đĩa lý thuyết và hệ số đối xứng. Trong số các hệ pha động, hệ acetonitrile - dung dịch đệm acetat pH 4,5 (70:30), hệ acetonitrile - dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 (30:70) và hệ acetonitrile - dung dịch đệm phosphat pH 5,5 (50:50) có khả năng tách tốt, pic gọn, đỉnh nhọn, hình dạng cân đối (0,8<SF=0,9; 0,97 và 0,99<1,2),



Hình 2. Sắc ký đồ của các hệ dung môi có khả năng tách I-THP (rotundin) khỏi nền mẫu. **(A)** Acetonitrile - đệm acetat pH 4,5 (70:30); **(B)** Acetonitrile - đệm acetat pH 4,5 (50:50); **(C)** Acetonitrile - đệm phosphat pH 4,5 (30:70); **(D)** Acetonitrile - đệm phosphat pH 5,5 (50:50); **(E)** Acetonitrile - đệm phosphat pH 6,5 (70:30); **(F)** Acetonitrile - đệm phosphat pH 6,5 (50:50).

thời gian lưu phù hợp để phân tích định lượng (4,53, 5,92 và 4,41 phút), diện tích và chiều cao pic lớn, số đĩa lý thuyết $N > 2000$ (9282, 9461 và 10164). Số đĩa lý thuyết được tính toán dựa trên thời gian lưu thực tế của chất phân tích. Do không sử dụng chất đối chiếu không hấp thu, giá trị này phản ánh tương đối hiệu suất tách của các hệ dung môi trong điều kiện khảo sát. Tuy vậy, với giá trị thu được các hệ dung môi trên đều cho thấy hiệu suất tách tốt. Trong số 3 hệ dung môi, hệ acetonitrile - dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 (30:70) sử dụng ít dung môi hữu cơ hơn cả, tiết kiệm chi phí cho quá trình phân tích nên được lựa chọn.

Khảo sát lựa chọn tốc độ dòng: Khi tốc độ dòng tăng từ 1,0 lên 1,5 ml/phút thời gian lưu của chất phân tích giảm từ 8,38 xuống 5,92 phút, không ảnh hưởng tới khả năng tách cũng như hình dạng của pic. Để rút ngắn thời gian phân tích, lựa chọn tốc độ dòng là 1,5 ml/phút.

Từ các kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký như sau: Thiết bị HPLC Jasco LC4000 tiêm mẫu thủ công, pha tĩnh là cột Thermo Hypersil GOLD C18 (250x4,8 mm; 5

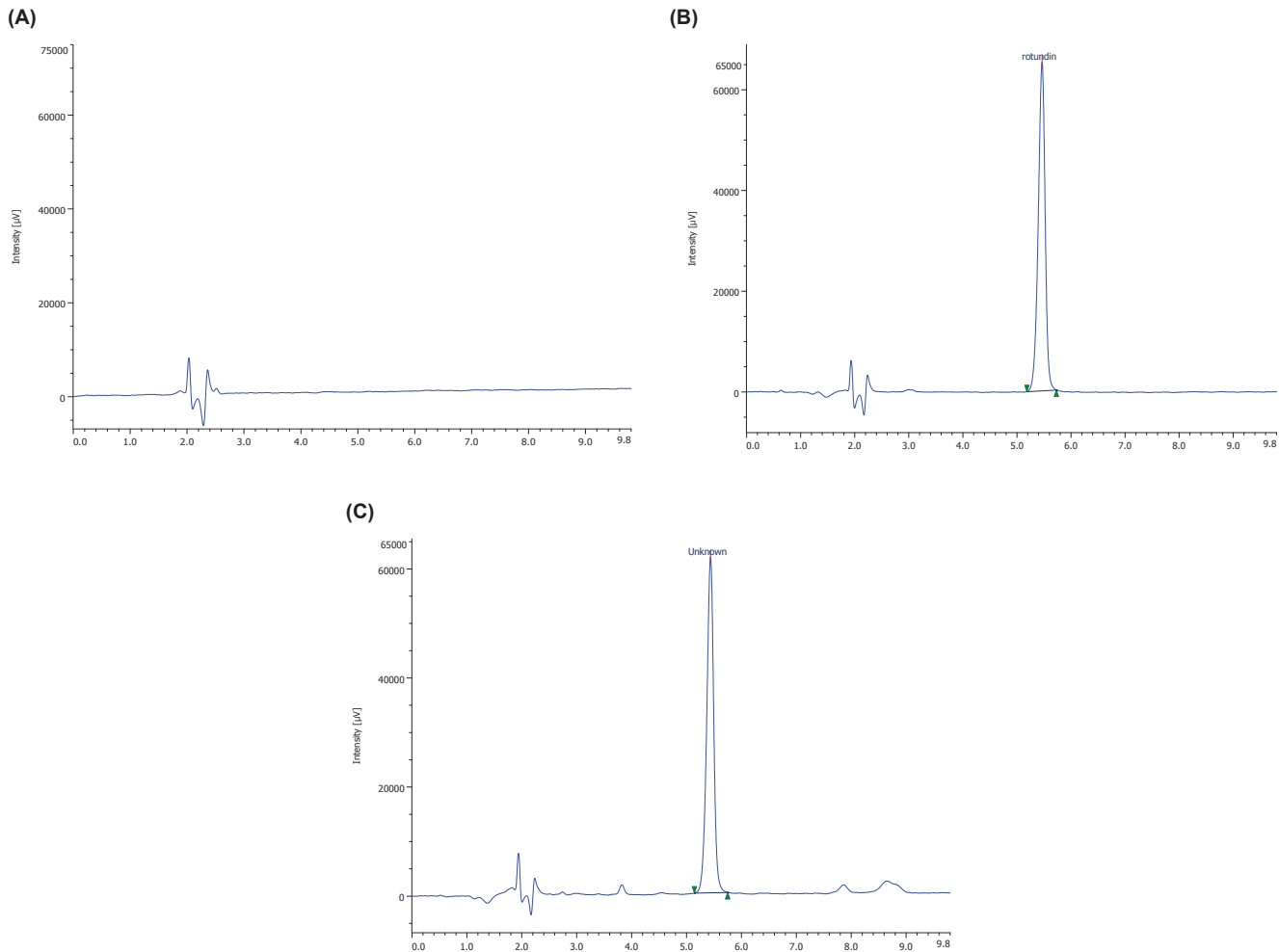
μm), pha động acetonitrile - đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 tỷ lệ 30:70, tốc độ dòng 1,5 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μl , bước sóng phát hiện 281 nm, nhiệt độ cột duy trì ở 25°C.

3.2. Thẩm định phương pháp định lượng đã xây dựng

Tính thích hợp hệ thống: Phân tích dung dịch chuẩn 1-THP nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ lặp lại 6 lần. Kết quả bảng 2 cho

Bảng 2. Kết quả thẩm định tính thích hợp hệ thống.

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	5,48	585526	8894	0,903
2	5,38	581908	8671	0,896
3	5,40	585761	8735	0,904
4	5,39	584201	8805	0,903
5	5,43	587629	8840	0,909
6	5,40	584757	8735	0,913
Trung bình	5,41	584964	8780	0,905
RSD (%)	0,70	0,32	0,93	0,66

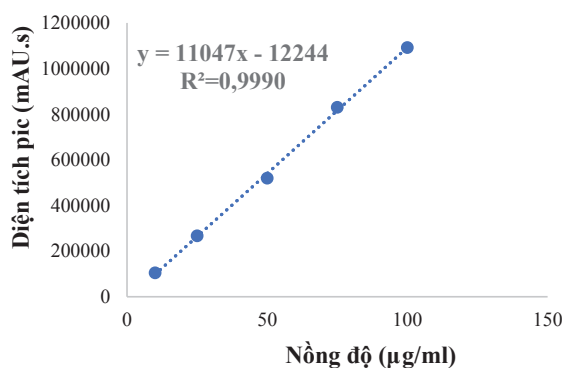


Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu placebo (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thử (C).

thấy, độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu nằm trong giới hạn cho phép của ICH (<1%) [11]. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic, số đĩa lý thuyết, hệ số đối xứng đạt yêu cầu theo ICH (<2%) [11]. Như vậy, hệ thống ổn định và phù hợp để định tính, định lượng l-THP trong mẫu nghiên cứu.

Độ đặc hiệu: Tiến hành phân tích mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu thử theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic l-THP ở sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu thử; trên sắc ký đồ của mẫu thử, pic l-THP được nhận diện rõ ràng và có thời gian lưu ($t_R=5,44$ phút) tương ứng với thời gian lưu của pic l-THP trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn ($t_R=5,46$ phút) (hình 3). Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính: Pha một dãy các dung dịch chuẩn l-THP có nồng độ 10, 25, 50, 75 và 100 µg/ml từ dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1 mg/ml, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã lựa chọn. Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ 10-100 µg/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ l-THP theo phương trình $y = 11047x - 12244$ với bình phương hệ số tương quan $R^2=0,9990$ (>0,99) (hình 4).



Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ l-THP.

Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ l-THP.

Nguồn phương sai	df	SS	MS	F	p-value
Hồi quy (Regression)	1	5324,60	5324,60	2956,02	0,000014
Sai số (Residual)	3	5,40	1,80		
Tổng	4	5330,00			

df: bậc tự do; SS (Sum of Square): tổng bình phương; MS (Mean Square): bình phương trung bình.

Phân tích phương sai hồi quy tuyến tính (ANOVA) giữa diện tích pic (Y) và nồng độ chất phân tích (X) cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê với $F=2956,02$; $p=0,000014$ <0,0001 (bảng 3). Điều này cho thấy, sự biến đổi diện tích pic tương quan có ý nghĩa với nồng độ l-THP.

Độ đúng: Chuẩn bị các dung dịch chuẩn, dung dịch thử thêm chuẩn có nồng độ 80, 100 và 120% so với nồng độ định lượng như sau: Cân 1 lượng bột viên tương ứng 12,5 mg dược chất cho vào bình định mức 50 ml, thêm 3, 5 hoặc 7 ml dung dịch chuẩn gốc 2,5 mg/ml và tiếp tục thực hiện các bước tiếp theo của quy trình xử lý mẫu. Tại mỗi mức nồng độ, tiến hành phân tích 3 mẫu độc lập.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng.

Phần trăm so với nồng độ định lượng (%)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Lượng chuẩn tìm lại (mg)	Độ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
80	7,50	7,41	98,81	99,60	1,45
		7,60	101,27		
		7,40	98,73		
100	12,50	12,28	98,21	99,01	0,72
		12,41	99,25		
		12,45	99,57		
120	17,50	17,28	98,76	99,04	1,14
		17,17	98,09		
		17,55	100,28		

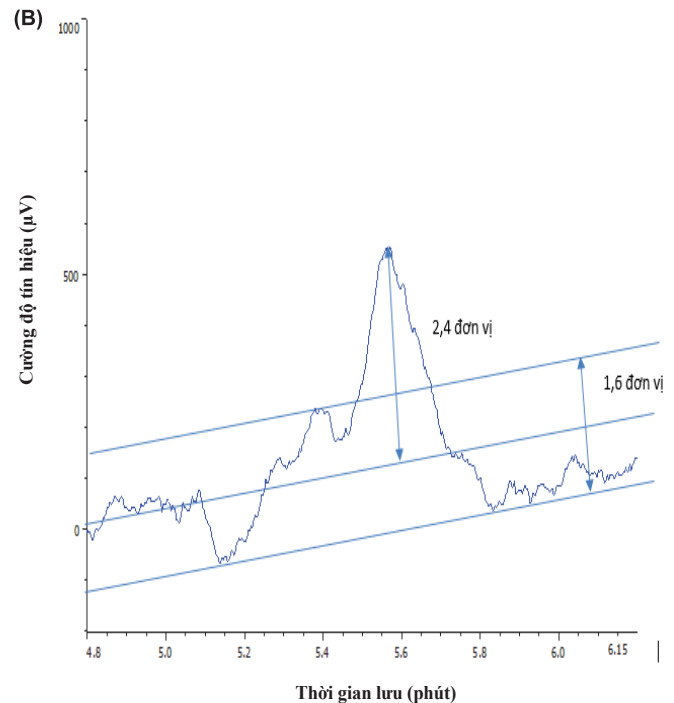
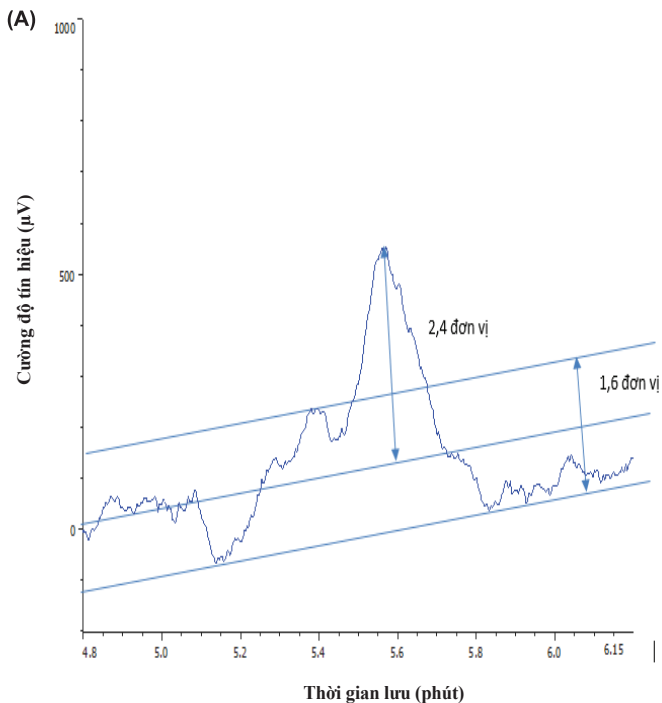
Kết quả bảng 4 cho thấy, ở cả 3 nồng độ 80, 100 và 120% so với nồng độ định lượng, độ lệch chuẩn tương đối đều nằm trong giới hạn cho phép ($RSD<2\%$). Độ thu hồi trung bình từ 99,01 đến 99,60% nằm trong giới hạn cho phép (98,0-102,0%) (bảng 4). Như vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng theo ICH Q2 (R1) [11].

Độ chính xác: Độ chính xác của phương pháp gồm độ chụm và độ chụm trung gian. Độ chụm trung gian được đánh giá trên các mẫu tự tạo tương tự độ lặp lại trên cùng thiết bị nhưng khác ngày và khác kiểm nghiệm viên (KNV).

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ chụm và độ chụm trung gian.

Ngày	STT	Khối lượng mẫu (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Độ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
Ngày 1, KNV 1	1	0,1676	512018	100,69	99,22	1,32
	2	0,1681	515298	101,03		
	3	0,1676	499040	98,14		
	4	0,1677	503674	98,99		
	5	0,1675	499032	98,19		
	6	0,1678	500420	98,29		
Ngày 2, KNV 2	7	0,1678	503099	98,29	99,47	1,31
	8	0,1680	497874	97,68		
	9	0,1675	512523	100,85		
	10	0,1677	503580	98,97		
	11	0,1676	514070	101,09		
	12	0,1675	505184	99,41		

Độ thu hồi trung bình=99,35%; RSD: 1,32% (n=12).



Hình 5. Giới hạn phát hiện (A) và giới hạn định lượng (B) của phương pháp.

Chuẩn bị 6 mẫu thử độc lập và 1 mẫu chuẩn như đã nêu ở phần phương pháp nghiên cứu. Tiến hành sắc ký theo phương pháp đã chọn, kết quả thu được như ở bảng 5. Kết quả cho thấy, độ lệch chuẩn của 6 mẫu cùng ngày đều nhỏ hơn 2%, độ lệch chuẩn của 12 mẫu nhỏ hơn 3%. Phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu của ICH [11].

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Tiến hành phân tích các mẫu chuẩn được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc 1 mg/ml đến khi nồng độ thấp nhất thu được có tín hiệu của chất phân tích gấp 2-3 lần cường độ nhiễu đường nền (LOD). Giá trị LOQ là nồng độ thấp nhất mà tại đó tín hiệu của chất phân tích thu được gấp khoảng 10 lần cường độ nhiễu đường nền.

Kết quả xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp là 3,125 ng/ml (đáp ứng pic gấp 3 lần độ nhiễu đường nền) và giới hạn định lượng là 12,5 ng/ml (đáp ứng pic gấp 10 lần độ nhiễu đường nền) (hình 5).

Ứng dụng: Áp dụng phương pháp đã xây dựng được để định lượng l-THP trong các mẫu viên nén GPKD sử dụng trong nghiên cứu xây dựng tương quan *in vitro* - *in vivo*. Kết quả bảng 6 cho thấy, hàm lượng l-THP trong các mẫu viên đều nằm trong khoảng 90-110% so với hàm lượng lý thuyết.

Bảng 6. Hàm lượng I-THP định lượng được từ các mẫu viên nén giải phóng kéo dài.

Mẫu viên	FR	MR	SR
Hàm lượng trung bình (%)	105,25	100,67	103,65
Độ lệch chuẩn (SD, %)	0,73	1,59	1,09
Khoảng tin cậy 95% (%)	103,44-107,06	96,72-104,62	100,94-106,36

FR: fast release; MR: medium release; SR: slow release.

4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, phương pháp định lượng được phát triển dựa trên phương pháp của Dược điển Việt Nam [5, 9], với một số điều chỉnh về cách xử lý mẫu, thành phần pha động và điều kiện sắc ký nhằm phù hợp hơn với điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm. Trong quá trình xử lý mẫu, phương pháp sử dụng thể tích methanol lớn hơn (20 µl so với 10 µl), thời gian lắc và siêu âm dài hơn (15 phút so với 5 phút) đảm bảo hòa tan hoàn toàn I-THP từ nền mẫu chứa các polyme kiểm soát giải phóng trương nở chậm. Phương pháp cũng sử dụng pha động đơn giản, dễ chuẩn bị hơn nhưng vẫn đảm bảo khả năng tách và độ đặc hiệu cần thiết. Thành phần pha động mới gồm acetonitrile - dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 (30:70) sử dụng ít dung môi hữu cơ hơn, tiết kiệm chi phí cho quá trình phân tích so với pha động trong phương pháp của Dược điển Việt Nam V (dung dịch đệm pH 6,5 - methanol (35:65)). Ngoài ra, dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 được pha chế đơn giản, nhanh chóng hơn so với dung dịch đệm pH 6,5. Trong nghiên cứu này, dung dịch đệm phosphat 0,05 M pH 4,5 được chuẩn bị bằng cách hòa tan 6,80 g kali dihydrophosphat vào nước vừa đủ 1000,0 ml theo hướng dẫn của Phụ lục 2.2 của Dược điển Việt Nam V [14]. Trong khi đó, dung dịch đệm pH 6,8 sử dụng các hóa chất ít phổ biến với quy trình pha chế phức tạp hơn: hỗn hợp dung dịch kali dihydrophosphat 0,05 M và dung dịch natri heptansulfonat 0,05 M (1:1) có chứa 0,2% triethylamin, điều chỉnh pH đến 6,5±0,05 bằng acid phosphoric [9].

Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn ICH Q2(R1) [11], đáp ứng các tiêu chí về độ đúng, độ chính xác, độ đặc hiệu, tính tuyến tính và giới hạn định lượng. Tuy nhiên, theo hướng tiếp cận mới trong ICH Q14 (2024), các nội dung như ước lượng sai số đo lường (measurement uncertainty), đánh giá yếu tố gây biến thiên và thiết lập

chiến lược kiểm soát phương pháp chưa được thực hiện đầy đủ. Các nội dung này sẽ được tiếp tục hoàn thiện trong các nghiên cứu tiếp theo, hướng tới việc phát triển phương pháp theo vòng đời sản phẩm thuốc và chất lượng theo thiết kế (Quality by design).

5. Kết luận

Qua khảo sát, nghiên cứu đã lựa chọn được các điều kiện sắc ký phù hợp để định lượng I-THP trong viên nén GPKD. Phương pháp có giới hạn phát hiện là 3,125 ng/ml, giới hạn định lượng là 12,5 ng/ml, khoảng tuyến tính 10-100 µg/ml. Phương pháp có độ đúng, độ chính xác đáp ứng yêu cầu của ICH Q2(R1) và đã được áp dụng để định lượng I-THP trong 3 mẫu viên nén GPKD. Hàm lượng I-THP trong các mẫu viên xác định được đều nằm trong giới hạn 90-110% so với hàm lượng lý thuyết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.B. Wang, J.R. Mantsch (2012), "I-tetrahydropalmitine: A potential new medication for the treatment of cocaine addiction", *Future Medicinal Chemistry*, **4**(2), pp.177-186, DOI: 10.4155/fmc.11.166.
- [2] H.E. Hassan, D. Kelly, M. Honick, et al. (2017), "Pharmacokinetics and safety assessment of I-tetrahydropalmitine in cocaine users: A randomized, double-blind, placebo-controlled study", *The Journal of Clinical Pharmacology*, **57**(2), pp.151-160, DOI: 10.1002/jcph.789.
- [3] Z. Hong, G. Fan, Y. Chai, et al. (2005), "Stereoselective pharmacokinetics of tetrahydropalmitine after oral administration of (-)-enantiomer and the racemate", *Chirality*, **17**(5), pp.293-296, DOI: 10.1002/chir.20161.
- [4] S.C. Tran, N.D. Duc, N.T. Tung (2016), "Pharmacokinetic analysis of levo-tetrahydropalmitine in rabbit plasma by rapid sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, **1008**, pp.81-86, DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.11.033.

- [5] Vietnamese Ministry of Health (2017a), “Rotundin”, *Vietnamese Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, pp.842-843 (in Vietnamese).
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015a), “Rotundine”, *Pharmacopoeia of The People’s Republic of China*, **1**, pp.736-737.
- [7] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015b), “Rotundine hydrochloride tablets”, *Pharmacopoeia of The People’s Republic of China*, **1**, p.738.
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015c), “Rotundine Tablets”, *Pharmacopoeia of The People’s Republic of China*, **1**, p.737.
- [9] Vietnamese Ministry of Health (2017b), “Rotundin tablets”, *Vietnamese Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, 844pp (in Vietnamese).
- [10] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015d), “Rotundine sulfate injection”, *Pharmacopoeia of The People’s Republic of China*, **1**, p.738.
- [11] International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.
- [12] International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2024), *ICH Q14 Guideline on Analytical Procedure Development*.
- [13] United States Food and Drug Administration (2013), “Chapter <1225> Validation of compendial procedures”, *The United States Pharmacopoeia-National Formulary (USP-NF)*.
- [14] Vietnamese Ministry of Health (2017c), “Appendix 2.2. volumetric solutions (VS)”, *Vietnamese Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, 10pp (in Vietnamese).