

VALIDATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF MELOXICAM IN ANTI-INFLAMMATORY FILM

Nguyen Van Bach*, Bui Thi Tra My, Trinh Nam Trung,
Nguyen Truong Toan, Nguyen Thi Hong Van, Cao Van Anh

Vietnam Military Medical University - 160 Phung Hung, Phuc La Ward, Ha Dong Dist, Hanoi City, Vietnam

Received: 10/12/2024

Revised: 25/12/2024; Accepted: 20/01/2024

ABSTRACT

Objective: To validate a method for the quantification of Meloxicam in film by high performance liquid chromatography in order to contribute to product quality standardization.

Subjects and methods: Quantitative Meloxicam by high performance liquid chromatography method with GRACE Apollo C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm), flow rate 1.0 ml/min, detector UV at 354 nm, injection volume 10 μl, mobile phase consisting of acetonitril, distilled water and glacial acetic acid (55:40:5).

Results: The method ensured suitability, specificity, linearity, repeatability, and precision as specified by ICH.

Conclusions: The quantitative method meets the requirements and can be used for the quantification of Meloxicam in film.

Keywords: Meloxicam, HPLC, fast dissolving films.

*Corresponding author

Email: Bachhvqy@gmail.com **Phone:** (+84) 904765407 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD1.1962**

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG MELOXICAM TRONG PHIM MELOXICAM CÓ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Văn Bạch*, Bùi Thị Trà My, Trịnh Nam Trung,
Nguyễn Trương Toàn, Nguyễn Thị Hồng Vân, Cao Văn Ánh

Học viện Quân y - 160 Phùng Hưng, P. Phúc La, Q. Hà Đông, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 10/12/2024

Chỉnh sửa ngày: 25/12/2024; Ngày duyệt đăng: 20/01/2024

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thẩm định phương pháp định lượng Meloxicam trong phim Meloxicam có tác dụng chống viêm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm góp phần tiêu chuẩn hóa chất lượng sản phẩm.

Đối tượng và phương pháp: Tiến hành định lượng Meloxicam bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với cột sắc ký GRACE Apollo C18 ($4,6 \times 150$ mm, $5 \mu\text{m}$), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, Detector UV tại bước sóng 354 nm, thể tích tiêm $10 \mu\text{l}$, pha động gồm Acetonitril, nước và acid acetic bằng tỷ lệ 55:40:5.

Kết quả: Phương pháp bảo đảm tính thích hợp, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng theo quy định của ICH.

Kết luận: Phương pháp định lượng bảo đảm các yêu cầu và có thể sử dụng để định lượng Meloxicam trong phim.

Từ khóa: Meloxicam, HPLC, phim giải phóng nhanh.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Meloxicam là thuốc chống viêm không steroid, dẫn xuất của oxicam. Hiện nay Meloxicam vẫn đang được sử dụng rộng rãi để điều trị đau và viêm trong bệnh khớp dạng thấp, đợt cấp bệnh thoái hóa xương khớp, viêm cột sống dính khớp. Các chế phẩm đang lưu hành trên thị trường chủ yếu được sản xuất dưới dạng thuốc tiêm và viên nén. Tuy nhiên, vì độ tan của Meloxicam trong nước thấp nên sinh khả dụng của dạng viên nén thấp, còn dạng thuốc tiêm thì đòi hỏi kỹ thuật bào chế phức tạp và không thuận tiện cho bệnh nhân vì bệnh nhân không thể tự mình dùng thuốc [1], [2], [3]. Vì vậy, phim Meloxicam giải phóng nhanh tại khoang miệng đang được quan tâm nghiên cứu để tăng sinh khả dụng của thuốc và bệnh nhân dễ sử dụng hơn [4], [5], [6]. Hiện nay, đã có một số nghiên cứu về định lượng Meloxicam trong các chế phẩm bào chế như: viên nén, viên nang... [7], [8], tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào đề cập tới định lượng Meloxicam trong phim. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần cung cấp các dữ liệu về phương pháp định lượng Meloxicam trong phim giải phóng nhanh tại khoang miệng và có thể được áp dụng để đánh giá chất lượng một số chế phẩm mới khi lưu hành.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và hóa chất

- Meloxicam chuẩn (SKS 0209243), hàm lượng 99,40%, do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương cung cấp.
- Dung môi: Acetonitril, acid acetic bằng đạt tiêu chuẩn P.A (Merck Đức).
- Mẫu thử: phim Meloxicam hàm lượng 7,5 mg/phim.

2.2. Thiết bị nghiên cứu

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC) Shimadzu 10^a-VP.
- Detector PDA (Nhật).
- Cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,1 mg (Thụy Sĩ).
- Máy đo pH Mettler Toledo (Thụy Sĩ).
- Bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức).
- Màng lọc nilon Sartorius Minisart kích thước màng 0,45 μm (Đức).

*Tác giả liên hệ

Email: Bachhvqy@gmail.com Điện thoại: (+84) 904765407 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD1.1962>

- Hệ thống phổ thủy tinh Sartotius (Đức).
- Các dụng cụ khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Điều kiện sắc ký

- Hệ thống sắc ký: hệ thống HPLC Shimadu 10^a-VP.
- Cột sắc ký pha đảo GRACE Apollo C18 (4,6 × 250 mm, 5 μm).
- Detector: UV bước sóng 354 nm.
- Pha động: Acetonitril, nước và acid acetic bằng tỷ lệ 55:40:5.
- Thể tích tiêm: 10 μl.
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Dung môi hòa tan mẫu: Acetonitril.

2.3.2. Phương pháp xử lý mẫu

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn: dung dịch chứa Meloxicam chuẩn trong Acetonitril có nồng độ 10 μg/ml.
- Chuẩn bị dung dịch thử: cắt nhỏ 20 phim, trộn đều cân chính xác lượng phim tương ứng với 5 mg Meloxicam vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 40 ml Acetonitril, lắc để hòa tan và thêm dung môi đến vạch. Lắc đều, lọc. Pha loãng 10 lần để được dung dịch thử, lọc qua màng lọc 0,45 μm.
- Tính toán kết quả: nồng độ Meloxicam trong dung dịch thử (C_t) được tính theo công thức:

$$C_t = \frac{S_t \times C_s}{S_s}$$

Trong đó:

- S_t là diện tích pic của dung dịch thử (μV.s).
- C_s là nồng độ dung dịch chuẩn (μg/ml).
- S_s là diện tích pic của dung dịch chuẩn (μV.s).

Từ nồng độ chất trong dung dịch thử (C_t), tính được hàm lượng Meloxicam trong chế phẩm theo công thức sau:

$$HL (\%) = \frac{C_t \times 10 \times 50}{m_t} \times 100$$

Trong đó:

- C_t là nồng độ dung dịch thử (μg/ml).
- m_t là khối lượng Meloxicam trong mẫu phim (mg).

2.3.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành theo hướng dẫn của Hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (International Conference on Harmonization

- ICH) [9]:

- Tính thích hợp hệ thống: tiêm 6 lần dung dịch Meloxicam chuẩn 10 μg/ml vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn. Ghi kết quả: độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu (không quá 1%), diện tích pic (không quá 2%), hệ số đối xứng (không quá 2%) và số đĩa lý thuyết (không quá 2%).

- Tính đặc hiệu: khảo sát trên mẫu thử (Meloxicam) và mẫu trắng (hỗn hợp tá dược có thành phần giống như công thức viên), xem tá dược và dung môi có làm ảnh hưởng đến kết quả định lượng hay không.

- Đường chuẩn và khoảng tuyến tính: khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Meloxicam bằng cách pha một dãy dung dịch Meloxicam chuẩn có nồng độ từ 5-17,5 μg/ml. Tiến hành sắc ký theo như các điều kiện đã nêu. Dựa vào hệ số tương quan r để xem sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch.

- Độ đúng: xác định độ đúng thông qua độ thu hồi (độ tìm lại) của phương pháp bằng cách thêm một lượng chất chuẩn xác định vào mẫu thử, phân tích các mẫu thêm chuẩn đó. Pha dung dịch thử thêm chuẩn có nồng độ lần lượt bằng 80%, 100% và 120% nồng độ định lượng (10 μg/ml).

- Độ lặp lại: tiến hành phân tích 6 dung dịch thử nồng độ 10 μg/ml được chuẩn bị song song theo phương pháp đã xây dựng. Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của kết quả phân tích. Yêu cầu RSD < 2%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả thẩm định tính tương thích của hệ thống

Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn Meloxicam nồng độ 10 μg/ml vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã xây dựng. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký được trình bày trong bảng 1.

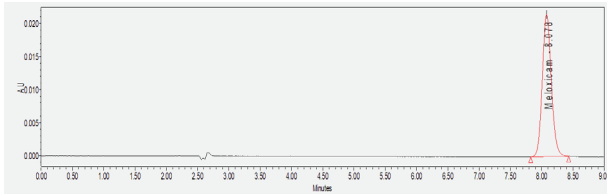
Bảng 1. Kết quả khảo sát độ tương thích của hệ thống sắc ký

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic μV.s)	Hệ số bất đối (AF)	Số đĩa lý thuyết (n)
1	7,925	220655	1,12	15073
2	8,078	215573	1,11	15026
3	8,096	217138	1,11	14940
4	8,088	212742	1,12	15363
5	8,011	212970	1,11	15321
6	7,942	216399	1,12	15234
Trung bình	8,0233	215912,83	1,115	15159,50
RSD	0,947%	1,359%	0,5989%	1,129%

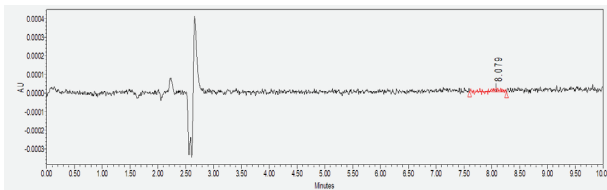
Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD, diện tích pic của Meloxicam, số đĩa lý thuyết, hệ số bất đối trong 6 phép thử đều nằm trong khoảng cho phép (< 2%), các giá trị của thời gian lưu cũng nằm trong giới hạn < 1%. Điều này chứng tỏ hệ thống phù hợp và bảo đảm ổn định cho phép phân tích định lượng Meloxicam trong phim.

3.2. Kết quả thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp

Mục đích nhằm chứng minh sự có mặt của tá dược và dung môi pha động không ảnh hưởng đến phương pháp phân tích. Khảo sát trên mẫu tự tạo gồm: mẫu thử (Meloxicam) và mẫu trắng (hỗn hợp tá dược). Kết quả phân tích sắc ký đồ được ghi ở hình 1.



(a)



(b)

Hình 1. Sắc ký đồ của dung dịch Meloxicam (a) và của hỗn hợp tá dược (b)

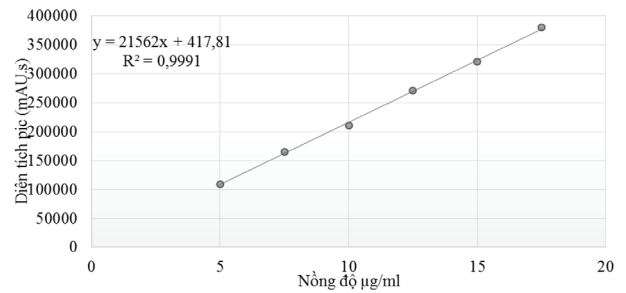
Nhận xét: Trong mẫu thử, pic của Meloxicam xuất hiện sau khoảng 8,078 phút (a). Tại vị trí pic của Meloxicam, không thấy xuất hiện pic lạ trên sắc ký đồ của mẫu trắng (b). Điều đó chứng tỏ: tá dược và dung môi không làm ảnh hưởng đến kết quả định lượng Meloxicam bằng phương pháp HPLC.

3.3. Kết quả thẩm định độ tuyến tính của phương pháp

Khảo sát sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Meloxicam bằng cách pha một dãy dung dịch Meloxicam chuẩn có nồng độ từ 5-17,5 µg/ml. Tiến hành sắc ký theo như các điều kiện đã nêu. Tiến hành sắc ký, kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Mối liên quan giữa nồng độ Meloxicam và diện tích pic

	Nồng độ Meloxicam (µg/ml)					
	5	7,5	10	12,5	15	17,5
Diện tích pic (µV.s)	108748	164876	211197	271651	321323	380116
Kết quả	Phương trình hồi quy: $y = 21562x + 417,81$ $R^2 = 0,9991$					



Hình 2. Đồ thị biểu thị sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích pic và nồng độ Meloxicam

Nhận xét: Trong khoảng nồng độ từ 5-17,5 µg/ml, sự phụ thuộc của diện tích pic và nồng độ của Meloxicam được biểu diễn theo phương trình $y = 21562x + 417,81$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9991$ (nằm trong khoảng 0,99-1,00). Điều này khẳng định có sự phụ thuộc tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic với nồng độ Meloxicam trong khoảng nồng độ từ 5-17,5 µg/ml.

3.4. Kết quả thẩm định độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành khảo sát độ lặp lại của phương pháp đối với mẫu phim Meloxicam 7,5 mg/ml. Độ lặp lại được đánh giá dựa trên độ lặp lại của 6 thí nghiệm riêng biệt. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

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

STT	Khối lượng phim (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,0802	215987	100,26
2	0,0813	218132	101,71
3	0,0792	214661	99,20
4	0,0788	214533	98,70
5	0,0810	215645	101,23
6	0,0800	214027	99,79
Dung dịch chuẩn (10 µg/ml)		215427	
		$\bar{X} \pm SD = 100,15 \pm 1,56$ $RSD = 1,16\%$	

Nhận xét: Với chương trình sắc ký đã chọn, phương pháp định lượng Meloxicam có độ lặp lại cao, độ lệch chuẩn tương đối là 1,16% (< 2%), đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn quy định.

3.5. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp

Tiến hành xác định độ đúng bằng phương pháp thêm chuẩn. Thêm một lượng Meloxicam chuẩn có nồng độ lần lượt bằng 80%, 100% và 120% nồng độ định lượng (10 µg/ml) vào mẫu thử sao cho nồng độ vẫn nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Lượng chuẩn thêm vào (%)	Diện tích pic của mẫu thử + chuẩn (mAU.s)	Lượng chuẩn tìm thấy	Tỷ lệ tìm thấy
Mẫu thử (10µg/ml)	0	216228		
1	80	384258	77,71%	97,13%
2	100	429689	98,72%	98,72%
3	120	473512	118,98%	99,15%
$\bar{X} \pm SD = 98,33 \pm 1,20$ RSD = 1,08%				

Nhận xét: Phương pháp có tỷ lệ thu hồi ở 6 mẫu khác nhau là 98,33% và độ lệch chuẩn tương đối là 1,08% (< 2%). Điều đó chứng tỏ phương pháp có độ đúng cao.

4. BÀN LUẬN

Phương pháp HPLC là một phương pháp phân tích hiện đại, được sử dụng phổ biến trong phân tích định lượng dược phẩm. Tuy có một số nhược điểm như giá thành trang thiết bị còn cao, dung môi, hóa chất đắt tiền nhưng HPLC có nhiều ưu điểm nổi bật như tính ổn định, độ chọn lọc, tính chính xác cao và có thể định tính, định lượng đồng thời nhiều hoạt chất mà không cần phân tách. Hầu hết hệ thống HPLC hiện nay đều sử dụng kỹ thuật sắc ký pha đảo trong phân tích dược phẩm do sự tiện dụng, nhanh chóng so với sắc ký pha thuận và khả năng phân tích hàng loạt mẫu. Do vậy, phương pháp được xây dựng có tính thiết thực, nhiều khả năng có thể áp dụng trong thực tế phân tích các màng phim có chứa Meloxicam ở Việt Nam.

Cột GRACE Apollo C18 được sử dụng có khả năng lưu trữ lượng mẫu lớn, tính ổn định cao, cho pic gọn, cân đối. Cột được chế tạo với công nghệ liên kết và được xử lý endcap tốt cho hiệu quả phân tách tốt với các chất ở khoảng pH thấp và trung tính. Độ dài cột và kích thước hạt nhỏ là hai yếu tố đầu tiên ảnh hưởng đến quá trình phân tách chất. Cột dài sẽ cho số đĩa lý thuyết lớn và kích thước hạt càng nhỏ sẽ cho pic càng gọn và nhọn hơn. Pha động sử dụng dung môi hữu cơ Acetonitril do ưu điểm của nó là độ nhớt thấp, có thể sắc ký ở áp suất thấp, mặt khác có thể đo độ hấp thụ UV đến 190 nm. Qua nghiên cứu cho thấy phương pháp xây dựng được có khả năng định lượng Meloxicam một cách đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả, phù hợp với điều kiện thực tế tại nhiều cơ sở kiểm nghiệm trong việc kiểm tra chất lượng các chế phẩm có chứa hoạt chất này.

Như vậy, chương trình HPLC đã xây dựng có khoảng tuyến tính thích hợp, độ đúng, độ lặp lại cao và cho kết quả đáng tin cậy. Có thể áp dụng phương pháp HPLC với các điều kiện trên để xác định hàm lượng Meloxicam trong phim.

5. KẾT LUẬN

Đã lựa chọn điều kiện định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao như sau: Meloxicam chuẩn hoặc phim Meloxicam được hòa tan trong Acetonitril để được nồng độ khoảng 10 µg/ml, tiến hành sắc ký và so sánh diện tích pic thu được. Điều kiện sắc ký: cột sắc ký pha đảo GRACE Apollo C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm), detector UV bước sóng 354 nm, pha động gồm Acetonitril:nước:acid acetic băng (55:40:5), thể tích tiêm 10 µl, tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Phương pháp cũng được thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu theo hướng dẫn của ICH về thẩm định phương pháp phân tích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế, Dược thư quốc gia Việt Nam, tập 2, 2022, tr. 1074-1075.
- [2] Türck D, Busch U, Heinzl G et al, Clinical pharmacokinetics of Meloxicam, *Arzneimittelforschung*, 1997, 47 (3), 253-258.
- [3] Peter L, Klaus D, Wolfhard E et al, Structure and physicochemical properties of Meloxicam, a new NSAID, 1996, *Eur. J. Pharm. Sci*, 4 (3), 175-187.
- [4] Aggarwal J, Singh G, Saini S et al, Fast dissolving films: A novel approach to oral drug, *International research journal of pharmacy*, 2011, 2 (12), 69-74.
- [5] Shrimali C, Patel G, Bhimani B, Formulation and evaluation of fast dissolving oral film of Meloxicam, *International journal of pharmaceutical research and bio-science*, 2005, 4(2), 378-387.
- [6] Ankita C, Pranati S, Sunita Y et al, Fast dissolving films: A review, *Current Drug Delivery*, 2011, 8(4), pp. 373-380.
- [7] Francine R, Luciane V, Alexandre M et al, Validation of high performance liquid chromatography method for determination of Meloxicam loaded PEGylated nanocapsules, *Braz. J. Pharm. Sci*, 2015, 51 (4), 823-832.
- [8] Nalini K, Madhusmita S, Podilapu S et al, Validation of assay indicating method development of Meloxicam in bulk and some of its tablet dosage forms by RP-HPLC, *Springerplus*, 2014, 3(95), 1-6.
- [9] ICH, Validation of analytical procedures: text and methodology, 2022, Q2(R2).