

Xây dựng và thẩm định phương pháp UV-Vis và HPLC-UV định lượng pregabalin trong hệ niosome

Nguyễn Hữu Phúc*, Nguyễn Huệ Minh
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Niosome chứa pregabalin được phát triển nhằm tăng cường phân phối thuốc trong điều trị đau thần kinh. Để bảo đảm chất lượng chế phẩm, cần xây dựng phương pháp định lượng pregabalin chính xác và thích hợp với nền mẫu phức tạp. **Mục tiêu:** Xây dựng và thẩm định định lượng pregabalin trong hệ niosome bằng hai phương pháp: (1) quang phổ UV-Vis và (2) HPLC-UV. **Phương pháp:** Thực hiện theo ICH Q2; phương pháp UV-Vis dựa trên phản ứng pregabalin-ninhydrin (90°C/5 phút, 568 nm, tuyến tính 1 - 30 µg/mL). Phương pháp HPLC-UV dùng cột C18, pha động acetonitrile-nước 5:95, phát hiện 205 nm, tuyến tính 0.2 - 2.0 mg/mL; thẩm định các tiêu chí đặc hiệu, tuyến tính, độ đúng và độ chính xác. **Kết quả:** Phương pháp UV-Vis đạt tuyến tính 1 - 30 µg/mL ($R^2 = 0.9962$), LOD 2.42 µg/mL, LOQ 7.34 µg/mL, độ phục hồi 98.82 - 101.28%, RSD < 2%. Phương pháp HPLC-UV tuyến tính 0.2 - 2.0 mg/mL ($R^2 = 0.9993$), LOD 42.4 µg/mL, LOQ 128.5 µg/mL, độ phục hồi 98.7 - 101.0%. **Kết luận:** Cả hai phương pháp đều đạt yêu cầu thẩm định theo ICH Q2 (R1). Trong đó, phương pháp UV-Vis phù hợp cho phân tích nhanh ở nồng độ thấp, còn HPLC-UV thích hợp hơn để định lượng pregabalin chính xác trong nền niosome phức tạp.

Từ khóa: pregabalin, niosome, UV-Vis, HPLC-UV, thẩm định phương pháp, ICH Q2 (R1)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Pregabalin (PGB) là dẫn xuất của γ -aminobutyric acid (GABA) với tác dụng giảm đau thần kinh và chống co giật, dùng điều trị đau thần kinh ngoại biên, động kinh và rối loạn lo âu lan tỏa [1]. PGB có độ tan cao trong nước (khoảng 25 mg/mL) nhưng khả năng thẩm qua màng sinh học thấp, dẫn đến sinh khả dụng đường uống hạn chế và thời gian bán thải ngắn. Do đó, hệ niosome chứa pregabalin giúp cải thiện hấp thụ, ổn định dược chất và kéo dài thời gian tác dụng [2, 3]. Pregabalin hấp thụ yếu trong vùng tử ngoại, làm hạn chế độ chính xác của các phương pháp định lượng trực tiếp; do đó, nhiều nghiên cứu đã phát triển các phương pháp UV-Vis hoặc HPLC-UV có bước dẫn xuất hóa để tăng khả năng phát hiện, chủ yếu áp dụng cho viên nang hoặc mẫu sinh phẩm [2, 4]. Cụ thể, Mohamed (2020) đã phát triển phương pháp UV-Vis dựa trên phản ứng tạo phức màu với ninhydrin và acid ascorbic trong DMSO, đun sôi cách thủy trong 30 phút. Phương pháp có ưu điểm là quy trình đơn giản và chi phí thấp, nhưng thời gian phản ứng kéo dài và việc sử dụng DMSO gây khó khăn thao tác,

không phù hợp với mẫu có nền lipid phức tạp [5]. Ngược lại, Mutalabisin (2021) phát triển phương pháp HPLC-UV sử dụng dẫn xuất ninhydrin trong đệm phosphate (pH 7.4), cho phép phát hiện ở vùng khả kiến với độ nhạy và độ đặc hiệu cao; tuy nhiên, quy trình chuẩn bị mẫu phức tạp, tốn thời gian và yêu cầu sử dụng đệm muối có thể ảnh hưởng đến độ ổn định sắc ký và tuổi thọ cột [6].

Nhìn chung, các nghiên cứu trước đây chỉ triển khai một kỹ thuật đơn lẻ và chưa có báo cáo định lượng pregabalin trong hệ niosome. Vì vậy, việc phát triển và thẩm định đồng thời hai phương pháp UV-Vis và HPLC-UV với quy trình tối ưu hóa là cần thiết nhằm nâng cao độ tin cậy và chuẩn hóa phân tích cho các hệ dược phẩm nano.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Pregabalin chứa trong hệ niosome được nhóm nghiên cứu điều chế. Thành phần tá dược trong niosome gồm polysorbat 80, sorbitan monostearat 60, cholesterol.

Tác giả liên hệ: Nguyễn Hữu Phúc

Email: phucnh2@hiu.vn

2.2. Hóa chất, thiết bị

Chất chuẩn: pregabalin ($C_8H_{17}NO_2$) - số lô: QT385 1024 - Hàm lượng 99.6 % - Viện Kiểm nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Hóa chất: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích. Ninhydrin ACS agent (Acros Organics - Mỹ). Dung môi đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC gồm methanol (Merck - Đức), acetonitril (Merck - Đức), chloroform (Merck - Đức), nước cất 2 lần. Tất cả các dung môi được siêu âm khử khí trước khi phân tích trên hệ thống HPLC.

Thiết bị: Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1200, đầu dò UV. Máy quang phổ UV-Vis Shimadzu UV1800. Cột sắc ký C18 (150 x 4.6 mm; 5 μ m), Phenomenex - Mỹ. Cân phân tích Mettler Toledo MS205 - Thụy Sĩ, độ chính xác 0.01 mg. Bể siêu âm Elmasonic S120 - Đức. Vial, đầu lọc mẫu, xi lanh và các dụng cụ thủy tinh thông thường.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị mẫu thử

Dung dịch chuẩn pregabalin (1 mg/mL): Cân chính xác 10.0 mg pregabalin chuẩn cho vào bình định mức 10 mL, thêm chính xác 1 mL methanol và khoảng 5 mL nước cất, siêu âm 10 phút. Thêm nước cất đến vạch, đầy nút, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0.45 μ m.

Dung dịch chuẩn pregabalin làm việc (50 μ g/mL): Lấy chính xác 5 mL dung dịch pregabalin chuẩn cho vào bình định mức 100 mL, thêm nước cất đến vạch, đầy nút, lắc đều.

Dung dịch niosome pregabalin: Cân chính xác 10 mg niosome N-P, cho vào bình định mức 2 mL, thêm 200 μ L chloroform và 800 μ L methanol, sau đó siêu âm trong 5 phút để phá vỡ cấu trúc niosome. Bổ sung nước cất vừa đủ đến vạch 2 mL, tiếp tục siêu âm thêm 15 phút nhằm đảm bảo pregabalin được hòa tan hoàn toàn. Tiếp theo, ly tâm hỗn hợp ở 10,000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm, thu lấy phần dịch trong và lọc qua màng 0.22 μ m để loại bỏ tạp chất không tan.

Mẫu trắng: Thực hiện pha như mẫu thử nhưng không có hoạt chất.

2.3.2. Tối ưu hoá điều kiện phản ứng

Định lượng pregabalin bằng phản ứng tạo màu với ninhydrin, khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian để xác định điều kiện tối ưu phân tích.

Tiến hành: Lấy 10 mL dung dịch chuẩn pregabalin (50 μ g/mL) cho vào vial có nắp, thêm 10 mL dung dịch ninhydrin 1% trong ethanol, đầy kín và phản ứng ở 70, 80 và 90°C. Theo dõi phản ứng trong 60 phút (70 - 80°C) và 10 phút (90°C). Tại các thời điểm xác định, lấy 2 mL dịch phản ứng, thêm 2 mL nước cất lạnh, đo phổ UV-Vis (200 - 800 nm) để xác định bước sóng hấp thụ cực đại và cường độ hấp thụ. Kết quả dùng để xác định điều kiện nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phản ứng tạo màu pregabalin-ninhydrin. Hàm lượng pregabalin trong mẫu thử được tính theo công thức (1), như sau:

$$\text{Hàm lượng pregabalin (\%)} = (C_p \times \text{ĐPL}_p) / (1000 \times m_p) \times 100\% \quad (1)$$

C_p (μ g/mL): Nồng độ pregabalin quy đổi từ phương trình đường tuyến tính.

m_p : Khối lượng cân của mẫu (mg).

ĐPL_p : Độ pha loãng.

2.3.3. Thẩm định quy trình định lượng pregabalin bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

Phương pháp UV-Vis được thẩm định theo các tiêu chí: Tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng, tuân thủ hướng dẫn ICH Q2 (R1).

2.3.4. Thẩm định quy trình định lượng pregabalin bằng phương pháp HPLC - Đầu dò UV

Phương pháp HPLC-UV được thẩm định theo các tiêu chí tương tự hướng dẫn ICH Q2 (R1) nêu trong mục 2.3.3.

Xử lý số liệu: Các dữ liệu thu được được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

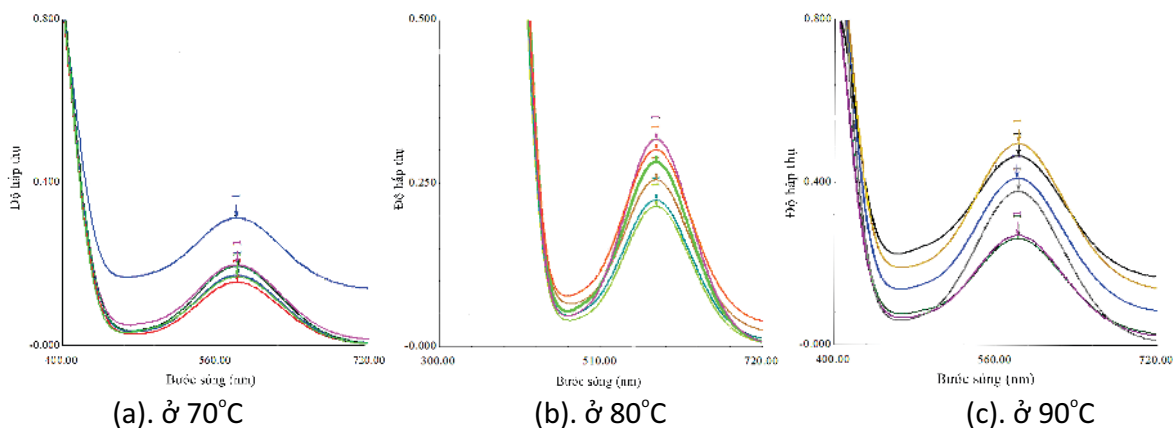
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tối ưu hoá điều kiện phản ứng

Quét phổ hấp thụ UV-Vis xác định λ_{max} tại 568 nm. Kết quả khảo sát phản ứng pregabalin-ninhydrin ở 70, 80 và 90°C được trình bày trong Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng của pregabalin với ninhydrin

Nhiệt độ	Thời gian (phút)	5	10	15	30	45	60
70°C	Độ hấp thụ	0.155	0.169	0.173	0.199	0.207	0.348
80°C	Độ hấp thụ	0.215	0.224	0.255	0.282	0.328	0.317
90°C	Thời gian (phút)	1	3	5	7	9	10
	Độ hấp thụ	0.27	0.301	0.496	0.465	0.378	0.411



Hình 1. Phổ hấp thụ UV-Vis của phức màu pregabalin-ninhydrin ở 70°C, 80°C và 90°C

Kết quả cho thấy độ hấp thụ phụ thuộc rõ rệt vào thời gian và nhiệt độ phản ứng. Ở 70°C, phản ứng diễn ra chậm và đạt cực đại sau 60 phút; ở 80°C, tốc độ tăng nhanh hơn nhưng tín hiệu giảm nhẹ khi kéo dài thời gian; trong khi ở 90°C, phản ứng xảy ra rất nhanh, đạt cực đại sớm nhưng độ hấp thụ giảm do phức màu kém ổn định. Như vậy, tăng nhiệt độ giúp rút ngắn thời gian phản ứng, song nhiệt độ quá cao có thể làm giảm độ ổn định sản phẩm màu.

Kết luận: Điều kiện tối ưu cho phản ứng pregabalin-ninhydrin là 90°C trong 5 phút, cho độ hấp thụ cực đại trong thời gian ngắn, phù hợp cho định lượng.

3.2. Thẩm định quy trình định lượng bằng phương pháp quang phổ UV-Vis

Pha mẫu chuẩn PGB định lượng: Lấy 1.0 mL dung

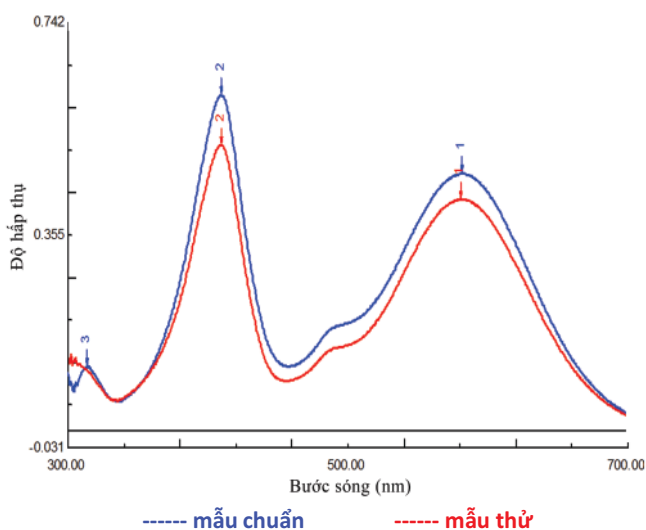
dịch PGB chuẩn làm việc (50 µg/mL) cho vào ống nghiệm có nắp, thêm 1.0 mL dung dịch ninhydrin 1%, lắc đều và đun cách thủy ở 90°C trong 5 phút. Sau đó làm nguội nhanh bằng khoảng 10 mL nước cất lạnh, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 25 mL và thêm nước cất đến vạch.

Dung dịch mẫu niosome: Mẫu được xử lý nhằm giải phóng hoàn toàn dược chất pha theo quy trình trong mục 2.3.1.

3.2.1. Độ đặc hiệu

Kết quả phổ hấp thụ được minh họa trong Hình 2 cho thấy dung dịch mẫu chuẩn và mẫu thử đều xuất hiện đỉnh hấp thụ tại bước sóng 568 nm, trong khi mẫu trắng không ghi nhận tín hiệu.

Kết luận: Phương pháp định lượng pregabalin bằng UV-Vis đặc hiệu tại bước sóng 568 nm.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử niosome pregabalin

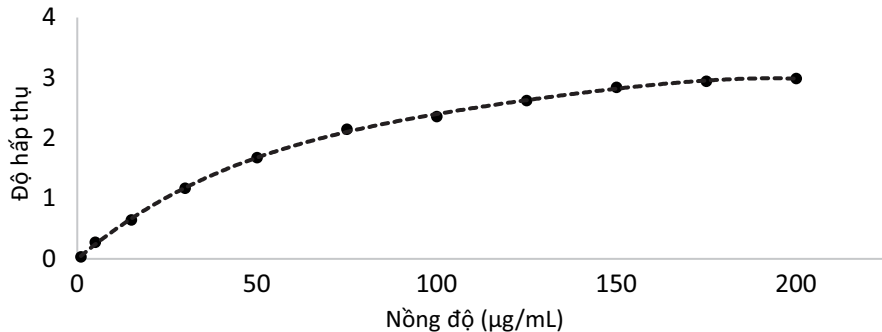
3.2.2. Tính tuyến tính

Để đánh giá tính tuyến tính theo định luật Beer-Lambert của phức màu pregabalin-thuốc thử, độ

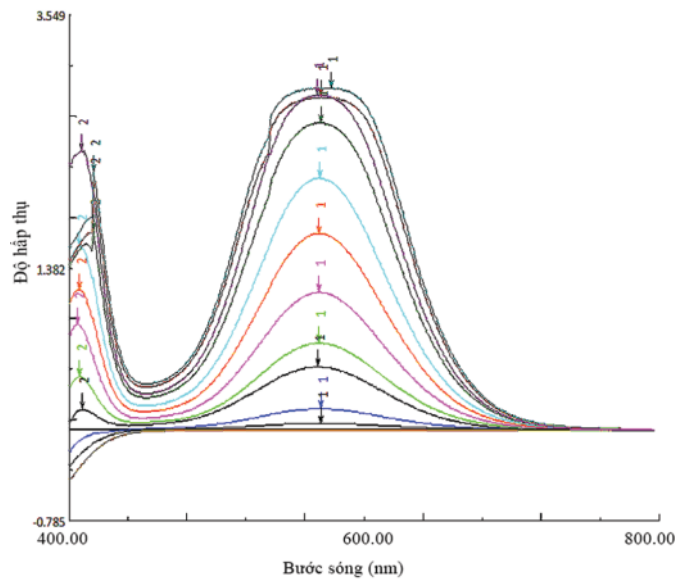
hấp thụ được khảo sát trong khoảng nồng độ 1 - 200 µg/mL. Mối quan hệ giữa độ hấp thụ và nồng độ được trình bày trong Bảng 2 và Hình 3 và 4.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ hấp thụ pregabalin theo nồng độ bằng UV-Vis

Nồng độ (µg/mL)	1	5	15	30	50	75	100	125	150	175	200
Độ hấp thụ (AU)	0.034	0.274	0.643	1.170	1.676	2.149	2.358	2.625	2.844	2.945	2.988



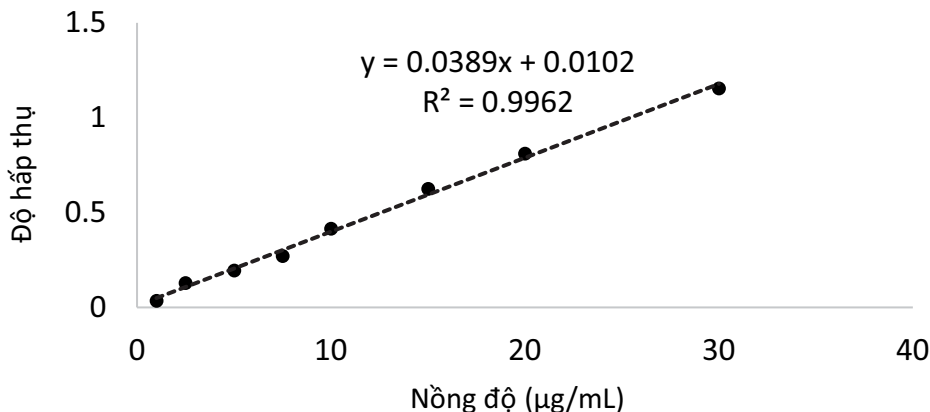
Hình 3. Đồ thị biểu diễn độ hấp thụ pregabalin biến thiên theo nồng độ



Hình 4. Phổ đồ biểu diễn độ hấp thụ pregabalin theo nồng độ

Kết quả cho thấy độ hấp thụ tăng theo nồng độ PGB trong khoảng 1 - 200 µg/mL, phản ánh mối tương quan thuận giữa hai đại lượng. Tuy nhiên, tính tuyến tính không được duy trì trên toàn bộ dải khảo sát; khi nồng độ vượt quá 50 µg/mL,

dung dịch có màu xanh đậm, các đỉnh hấp thụ bị biến dạng và mất đối xứng. Do đó, khoảng nồng độ 1 - 30 µg/mL được lựa chọn để tiếp tục đánh giá tính tuyến tính, với kết quả được trình bày trong Hình 5, Bảng 3.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn độ hấp thụ pregabalin biến thiên trong khoảng nồng độ 1 - 30 µg/mL

Bảng 3. Kết quả khảo sát đường tuyến tính của độ hấp thụ pregabalin theo nồng độ bằng UV-Vis

Nồng độ (µg/mL)	1	2.5	5	7.5	10	15	20	30
Độ hấp thụ (AU)	0.034	0.127	0.194	0.269	0.413	0.624	0.809	1.154

Kết quả phân tích hồi quy của Hình 5 bằng công cụ Regression trong MS Excel cho thấy phương trình có ý nghĩa thống kê với trắc nghiệm tính tương thích $p = 1.68 \times 10^{-8}$ (< 0.05). Hệ số chặn không có ý nghĩa thống kê ($p = 0.502 > 0.05$) và hệ số xác định đạt $R^2 = 0.9962$. Do đó, trong khoảng nồng độ 1 - 30 µg/mL, nồng độ pregabalin (PGB) thể hiện mối tương quan tuyến tính tốt với độ hấp thụ UV-Vis và có thể mô tả bằng phương trình (pt) hồi quy tương ứng:

$$\hat{y} = 0.0389x$$

3.2.3. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Độ lệch chuẩn của diện tích pic: $\sigma = S_b = 0.0286$; Độ dốc của đường chuẩn (µg/mL): $a = 0.039$.

$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{a} = 2.42 \mu\text{g/mL}$; $LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{a} = 7.34 \mu\text{g/mL}$

3.2.4. Độ chính xác

Pha mẫu niosome định lượng: Lấy 1 mL dịch lọc niosome cho vào ống nghiệm có nắp, thêm 1 mL dung dịch ninhydrin 1%, lắc đều và đun cách thủy ở 90°C trong 5 phút. Sau đó, thêm khoảng 4 mL nước cất lạnh, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 10 mL và thêm nước đến vạch. Hút chính xác 1 mL dung dịch này cho vào bình định mức 5 mL, thêm nước đến vạch và đo độ hấp thụ tại bước sóng 568 nm. Kết quả đánh giá độ chính xác của quy trình định lượng PGB bằng UV-Vis được trình bày trong Bảng 4.

Kết luận: Giá trị RSD là 1.41% < 2.00 , phương pháp định lượng PGB bằng UV-Vis đáp ứng yêu cầu về độ chính xác theo tiêu chí thẩm định.

Bảng 4. Kết quả độ chính xác của quy trình định lượng PGB bằng UV-Vis

Mẫu	Lượng cân (mg)	Độ hấp thụ (Abs)	% prebagalin
1	10	0.511	101.1
2	10	0.509	100.6
3	10.1	0.512	100.2
4	10	0.497	98.3
5	10	0.495	98.0
6	10.1	0.516	101.00
Trung bình			99.85
SD			1.14
RSD			1.41%

3.2.5. Độ đúng

Kết quả đánh giá độ đúng của quy trình định lượng PGB bằng phương pháp UV-Vis được trình

bày trong Bảng 5. Giá trị RSD% trung bình = 0.98% $< 2.00\%$. Tỷ lệ phục hồi trong khoảng 98.82 - 101.28%.

Bảng 5. Kết quả độ đúng của phương pháp định lượng PGB bằng UV-Vis

Tỷ lệ thêm vào (%)	KL niosome (mg)	KL chuẩn (mg)	KL lý thuyết (mg)	Độ hấp thụ	KL thực tế (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
80	10.0	0.8	2.099	0.807	2.075	98.82	99.43	0.61
	10.1	0.8	2.112	0.822	2.113	100.04		
	10.0	0.8	2.099	0.812	2.087	99.43		
100	10.1	1.0	2.312	0.914	2.350	101.65	100.58	1.49
	10.0	1.0	2.298	0.884	2.272	98.87		
	10.0	1.0	2.298	0.905	2.326	101.22		
120	10.0	1.2	2.498	0.984	2.530	101.28	100.31	0.86
	10.1	1.2	2.511	0.977	2.512	100.03		
	10.0	1.2	2.498	0.968	2.488	99.63		

Kết luận: Phương pháp định lượng PGB đáp ứng yêu cầu về độ đúng.

Như vậy, phương pháp định lượng pregabalin bằng UV-Vis đã được thẩm định và chứng minh đạt yêu cầu, đảm bảo độ tin cậy khi áp dụng cho đánh giá các công thức.

3.3. Thẩm định quy trình định lượng niosome chứa pregabalin bằng HPLC - UV

Điều kiện sắc ký hoàn chỉnh:

- Hệ thống: Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent-1200, đầu dò UV.

- Cột sắc ký: Phenomenex C18 (150 x 4.6 mm; 5 m).

- Pha động: Acetonitril - nước cất = 5:95 (v/v). Dung môi được lọc qua màng lọc 0.45 μm và đui khí bằng siêu âm trước khi sử dụng.

- Thông số vận hành:

Tốc độ dòng: 1.0 mL/phút.

Bước sóng phát hiện: 205 nm.

Thể tích tiêm mẫu: 10 μL .

Thời gian phân tích: 12 phút.

Nhiệt độ cột: Không điều chỉnh, tiến hành ở nhiệt độ phòng.

- Chuẩn bị dung dịch mẫu:

Dung dịch chuẩn và mẫu thử (2 mg/mL): Cân chính

xác 20.0 mg pregabalin (chuẩn hoặc nguyên liệu) vào bình định mức 10 mL. Hòa tan trong 5 mL methanol và 3 mL nước, siêu âm 10 phút và định mức bằng nước. Lọc qua màng 0.45 μm trước khi phân tích.

Dung dịch mẫu niosome: Mẫu được xử lý nhằm giải phóng hoàn toàn dược chất.

Cân lượng niosome tương đương 10 mg PGB vào eppendorf. Thêm 0.1 mL chloroform và methanol vừa đủ 2 mL, siêu âm 20 phút và ly tâm ở 10,000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 1.0 mL dịch trong, bổ sung nước cất vừa đủ trong bình định mức 2 mL. Tiếp tục, siêu âm 20 phút và ly tâm lại (10,000 vòng/phút trong 15 phút). Thu lấy dịch trong và lọc qua màng 0.22 μm trước khi tiêm sắc ký.

3.3.1. Tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn PGB nồng độ 2.0 mg/mL. Các thông số đặc trưng bao gồm: Thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết (N) và hệ số bất đối xứng (A_s).

Yêu cầu: RSD của diện tích pic và thời gian lưu $\leq 2.0\%$, (A_s) trong khoảng 0.8 - 1.50, N > 2,000.

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả kiểm chứng tính tương thích hệ thống

Lần bơm	t _R (phút)	S ($\mu\text{AU.giây}$)	A _s	Số đĩa lý thuyết (N)	Độ phân giải (R _s)
1	5.914	2,257.8	1.151	5,325	16.80
2	5.918	2,256.5	1.165	5,508	17.07
3	5.905	2,249.6	1.133	5,313	17.26
4	5.951	2,226.5	1.179	5,423	17.50
5	5.959	2,225.8	1.189	5,323	16.92
6	5.923	2,208.9	1.158	5,325	16.80
Trung bình	5.928	2,237.52	1.163	5,369.50	17.06
SD	0.020	18.24	0.0182	79.20	0.28
RSD (%)	0.33	0.82	1.57	1.47	1.63

RSD của các thông số khảo sát gồm diện tích pic, thời gian lưu, hệ số đối, số đĩa lý thuyết, độ phân giải đều có RSD < 2%, chứng tỏ qui trình có tính phù hợp hệ thống.

3.3.2. Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu được đánh giá bằng cách so sánh sắc ký đồ của: (i) mẫu trắng (placebo niosome), (ii)

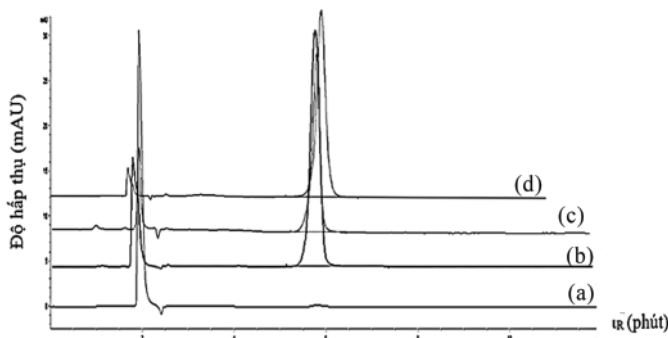
mẫu chuẩn PGB, (iii) mẫu thử niosome chứa PGB và (iv) mẫu thêm chuẩn.

Kết quả trong Bảng 7 và Hình 6 cho thấy sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của pregabalin. Mẫu thử cho pic trùng khớp về thời gian lưu và phổ UV với mẫu chuẩn.

Như vậy, phương pháp có tính đặc hiệu đối với định lượng niosome chứa pregabalin.

Bảng 7. Kết quả kiểm chứng tính đặc hiệu của phương pháp định lượng pregabalin bằng HPLC-UV

Mẫu	t _R (phút)	S ($\mu\text{AU.giây}$)	A _s	Số đĩa lý thuyết (N)	Độ phân giải (R _s)
Chất chuẩn	5.921	2,257.8	1.151	5,564	17.40
Niosome (N-P)	5.928	476.2	1.062	5,268	17.35
Niosome thêm chuẩn	6.019	2,879.1	1.214	5,313	17.23



Hình 6. Sắc ký đồ HPLC-UV kiểm chứng tính đặc hiệu của phương pháp định lượng pregabalin: (a) mẫu trắng; (b) chuẩn PGB ; (c) niosome chứa PGB ; (d) niosome chứa PGB thêm chuẩn

3.3.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn

Xây dựng đường chuẩn dựa trên 6 mức nồng độ PGB từ 0.2 mg/mL đến 2.0 mg/mL. Mỗi nồng độ

được tiêm 3 lần để lấy giá trị diện tích pic trung bình. Kết quả được trình bày trong Bảng 8 và Hình 7.

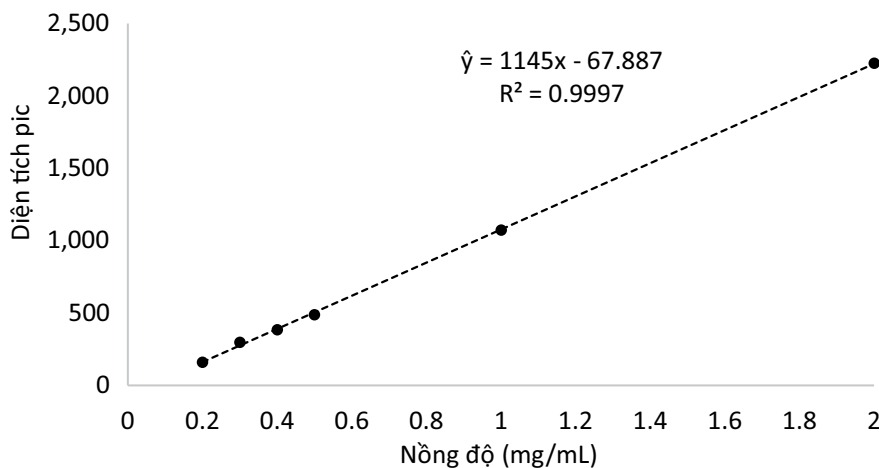
Bảng 8. Kết quả đánh giá tính tuyến tính của phương pháp định lượng pregabalin bằng HPLC-UV

Nồng độ (mg/ mL)	2.0	1.0	0.5	0.4	0.3	0.2
Diện tích pic (μ AU.giây)	2,225.8	1,073.3	488.5	384.3	298.9	159.8

Kết quả phân tích cho thấy mối tương quan tuyến tính rất tốt giữa nồng độ PGB và diện tích pic, với $R^2 = 0.9993$. Phương trình hồi quy có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) và độ lệch chuẩn của diện tích

pic đạt $\sigma = 14.71$. Trong khoảng 0.2 - 2.0 mg/mL, diện tích pic tỷ lệ tuyến tính với nồng độ PGB theo phương trình:

$$\hat{y} = 1145x - 67.887$$



Hình 7. Đồ thị biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ PGB chuẩn

Kết quả phân tích cho thấy mối tương quan tuyến tính rất tốt giữa nồng độ PGB và diện tích pic, với $R^2 = 0.9993$. Phương trình hồi quy có ý nghĩa thống kê ($p < 0.05$) và độ lệch chuẩn của diện tích pic đạt $\sigma = 14.71$. Trong khoảng 0.2 - 2.0 mg/mL, diện tích pic tỷ lệ tuyến tính với nồng độ PGB theo phương trình:

$$\hat{y} = 1145x - 67.887$$

3.3.4. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện:

$$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{a} = 0.0424 \text{ mg/mL} = 42.4 \mu\text{g/mL}$$

Giới hạn định lượng:

$$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{a} = 0.1285 \text{ mg/mL} = 128.5 \mu\text{g/mL}$$

3.3.5. Độ chính xác

Độ chính xác được xác định bằng cách phân tích lặp lại các mẫu niosome chứa pregabalin dưới cùng điều kiện thí nghiệm. Kết quả trình bày trong Bảng 9 cho thấy $RSD \leq 2.0\%$. Điều này chứng minh phương pháp có độ chính xác cao theo hướng dẫn ICH.

Bảng 9. Kết quả độ chính xác đối với sản phẩm niosome prebagalin

STT	KL niosome (mg)	Diện tích pic (μ AU.giây)	Nồng độ PGB (mg/mL)	% pregabalin
1	10.0	308.45	0.329	100.7
2	10.1	315.88	0.335	101.6
3	10.0	302.48	0.323	99.1
4	10.0	310.40	0.330	101.2
5	10.1	316.40	0.336	101.8
6	10.0	304.66	0.325	99.6
\bar{X}				100.66
SD				1.10
RSD (%)				1.09

3.3.6. Độ đúng

Dùng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử trước khi xử lý mẫu. Nồng độ mẫu chuẩn thêm vào lần lượt là 80%, 100%, 120%. Thực hiện 9 lần tiêm mẫu trên các mẫu đã chuẩn bị (mỗi nồng độ 3 mẫu). Tính toán % tỷ lệ phục hồi và kết quả được trình bày trong Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả kiểm chứng độ đúng đối với prebagalin

Tỷ lệ thêm vào (%)	KL niosome (mg)	KL chuẩn (mg)	KL lý thuyết (mg)	Diện tích pic (μ AU.giây)	KL thực tế (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
80	10.1	4	5.30	1,460.9	5.34	100.8	100.15	1.19
	10.2	4	5.31	1,467.1	5.36	100.9		
	10	4	5.29	1,427.1	5.22	98.8		
100	10	5	6.28	1,716.6	6.23	99.2	99.17	0.48
	10	5	6.28	1,723.8	6.26	99.6		
	10	5	6.28	1,706.6	6.20	98.7		
120	10.1	6	7.29	2,040.5	7.37	101.0	100.23	0.67
	10	6	7.28	2,010.5	7.26	99.7		
	10	6	7.28	2,014.9	7.28	100.0		

Tỷ lệ phục hồi trong khoảng: 98.7 - 101.0%.

Tỷ lệ phục hồi trung bình: 99.85%. RSD% = 0.78% < 2%

Kết quả phục hồi tại ba mức nồng độ nằm trong giới hạn cho phép cho thấy phương pháp đạt độ đúng theo yêu cầu của ICH.

Như vậy, phương pháp định lượng niosome chứa pregabalin bằng HPLC-UV đã được thẩm định và

chứng minh đạt yêu cầu, đảm bảo độ tin cậy khi áp dụng cho đánh giá các công thức.

Kết quả thẩm định cho thấy cả UV-Vis và HPLC-UV đều đáp ứng các tiêu chí về tuyến tính, độ nhạy, độ chính xác và độ đúng được tổng hợp trong Bảng 11.

Bảng 11. So sánh các thông số thẩm định giữa UV-Vis và HPLC-UV

Chỉ tiêu thẩm định	Phương pháp UV-Vis	Phương pháp HPLC-UV
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 0.0389x$, $R^2 = 0.9962$	$\hat{y} = 1145x - 67.887$, $R^2 = 0.9997$
Khoảng tuyến tính	1 - 30 μ g/mL	0.2 - 2 mg/mL
Giới hạn phát hiện LOD	2.42 μ g/mL	42.4 μ g/mL
Giới hạn định lượng LOQ	7.34 μ g/mL	128.5 μ g/mL
Độ chính xác	98.0 - 101.1% (RSD% = 1.41%)	99.1 - 101.8% (RSD% = 1.09%)
Độ đúng	98.8 - 101.3% (RSD% = 0.99%)	98.7 - 101.0% (RSD% = 0.78%)

Kết quả cho thấy: Phương pháp UV-Vis thể hiện giới hạn phát hiện và định lượng thấp hơn, trong

khi HPLC-UV cho độ tuyến tính và độ lặp lại vượt trội. Nhìn chung, UV-Vis phù hợp cho kiểm nghiệm

nhận và định lượng đơn giản, trong khi HPLC-UV thích hợp cho các mẫu phức tạp, đòi hỏi độ chính xác và độ đúng cao. Việc lựa chọn phương pháp phụ thuộc vào mục tiêu phân tích và yêu cầu đặc thù của mẫu.

4. BÀN LUẬN

So với nghiên cứu của Yogita B. Wani (2015), phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis sử dụng tạo phức màu với PDAB trong acid cho độ nhạy cao (LOD = 0.025 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0.076 $\mu\text{g/mL}$) và độ phục hồi 101.03 \pm 0.94%, song phương pháp cần môi trường acid mạnh và thuốc thử đắt tiền. Trong khi đó, Regina Andayani (2021) ứng dụng hệ ninhydrin-ascorbic acid trong đệm citrate pH 5, cho LOD 0.35 $\mu\text{g/mL}$ và độ thu hồi 99.31%, phù hợp mẫu nồng độ thấp nhưng cần thêm acid ascorbic [7, 8]. Phương pháp UV-Vis dựa trên phản ứng tạo phức giữa pregabalin và ninhydrin tạo sản phẩm màu xanh tím có cực đại hấp thụ tại 568 nm. Phản ứng tối ưu khi cách thủy ở 90°C trong 5 phút. Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng 1 - 30 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9964$), độ phục hồi 98.82 - 101.28%, LOD = 2.42 $\mu\text{g/mL}$, LOQ = 7.34 $\mu\text{g/mL}$, chứng tỏ độ nhạy và độ chính xác cao. Phương pháp có ưu điểm thao tác đơn giản, thời gian phân tích ngắn và không sử dụng dung môi hữu cơ đắt tiền, độc hại.

Trong nghiên cứu của Gülsüm Çiçek (2025), pregabalin được định lượng trong viên nén bằng phương pháp HPLC-UV sau khi dẫn xuất hóa với 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) ở pH 9, gia nhiệt ở 60°C trong 5 phút. Phân tích được thực hiện trên cột C18 với pha động đệm phosphate 20 mM-acetonitrile (70:30, v/v), tốc độ dòng 1.0

mL/phút, phát hiện huỳnh quang tại 260/315 nm. Phương pháp cho đường chuẩn tuyến tính trong khoảng 0.5 - 6.0 $\mu\text{g/mL}$, với LOD = 0.039 $\mu\text{g/mL}$, LOQ = 0.117 $\mu\text{g/mL}$ và độ phục hồi 101.39% [9]. Tuy nhiên, việc sử dụng hệ đệm phosphate gây kết tủa muối và giảm tuổi thọ cột. Trong nghiên cứu này, quy trình phân tích được đơn giản hóa bằng cách sử dụng cột Phenomenex C18 (150 \times 4.6 mm, 5 μm) và pha động acetonitrile-nước (5:95, v/v), tốc độ dòng 1.0 mL/phút, phát hiện ở 205 nm. Việc loại bỏ đệm phosphate và tác nhân ion hóa giúp duy trì độ bền cột, hạn chế tích tụ muối trong hệ thống và tăng tính ổn định, khả năng tái lập phương pháp.

5. KẾT LUẬN

Cả hai phương pháp UV-Vis và HPLC-UV đều được xây dựng và thẩm định thành công theo hướng dẫn ICH, đáp ứng các tiêu chí về tính đặc hiệu, tuyến tính, độ nhạy, độ chính xác và độ đúng trong định lượng pregabalin. Phương pháp UV-Vis có ưu điểm thao tác đơn giản, phân tích nhanh và độ nhạy cao, phù hợp cho sàng lọc và nghiên cứu công thức ban đầu. Ngược lại, phương pháp HPLC-UV cho độ chính xác và độ tin cậy cao, đặc biệt thích hợp cho định lượng pregabalin trong hệ niosome có nền mẫu phức tạp. Sự kết hợp hai phương pháp này đáp ứng mục tiêu xây dựng quy trình định lượng đơn giản, nhanh và chính xác cho hệ dược phẩm nano.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC18.39.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Manjushree, D. Chakraborty, K. Shashidhar, and S. Narayanaswamy, "A review of the drug pregabalin", *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, pp. 601-605, 01/01 2015.
- [2] M. M. Ibrahim, D. N. Maria, S. R. Mishra, D. Guragain, X. Wang, and M. M. Jablonski, "Once Daily Pregabalin Eye Drops for Management of Glaucoma", *ACS Nano*, vol. 13, no. 12, pp. 13728-13744, Dec 24 2019.
- [3] S. Agrawal, P. Gurjar, and A. Mutke, "DOE based Formulation development and Evaluation of Niosomal dispersion of Pregabalin", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, pp. 3912-

3918, 09/28 2022.

- [4] M. G. Arafa and B. M. Ayoub, "DOE Optimization of Nano-based Carrier of Pregabalin as Hydrogel: New Therapeutic & Chemometric Approaches for Controlled Drug Delivery Systems", *Sci Rep*, vol. 7, p. 41503, Jan 30 2017.
- [5] A. Abdelmonim Mohamed, T. Elsaman, M. Adam, E. Gadkariem, and S. Shantier, "Development and validation of colorimetric method for the determination of pregabalin in bulk and pharmaceutical formulations", *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 11, pp. 5896-5901,

10/15 2020.

[6] F. Mutalabisin, A. B. M. Helal Uddin, P. Sengupta, F. Mohamed, and B. Chatterjee, "Quantitation of Pregabalin by HPLC-UV Method using Ninhydrin Derivatization: Development and Validation", *Current Pharmaceutical Analysis*, vol. 16, 11/14 2019.

[7] D. Patil, M. Patil, and Y. Wani, "Spectrophotometric method for pregabalin determination: An experimental design approach for method development", *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and*

Applied Sciences, vol. 5, 06/15 2015.

[8] S. a. F. Regina Andayani, "Development and validation of uv-visible spectrophotometric method for the determination of pregabalin using ninhydrin and ascorbic acid", *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, vol. 10, pp. 185-195, 11/11 2021.

[9] G. Çiçek, S. E. Toker, and G. E. Kizilçay, "A New HPLC Method Development and Validation of Pregabalin in Pharmaceutical Preparations", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 59, no. 2, pp. 216-221, 05/01 2025.

Development and validation of UV-Vis and HPLC-UV assay methods for pregabalin in niosomes

Nguyen Huu Phuc, Nguyen Hue Minh

ABSTRACT

Background: Niosomes containing pregabalin have been developed to enhance drug delivery in the treatment of neuropathic pain. To ensure product quality, an accurate quantification method suitable for the complex matrix of niosomal formulations is required. Objective: To develop and validate two analytical methods for determining pregabalin in niosomes: (1) UV-Vis spectrophotometry and (2) HPLC-UV. Methods: Method development and validation were performed according to ICH Q2. The UV-Vis method is based on the pregabalin-ninhydrin reaction (90°C for 5 minutes, detection at 568 nm, linearity 1 - 30 µg/mL). The HPLC-UV method employed a C18 column with an acetonitrile-water mobile phase (5:95, v/v), detection at 205 nm, and a linearity range of 0.2 - 2.0 mg/mL. Validation parameters included specificity, linearity, accuracy, and precision. Results: The UV-Vis method exhibited good linearity over the concentration range of 1 - 30 µg/mL ($R^2 = 0.9962$), with LOD = 2.42 µg/mL and LOQ = 7.34 µg/mL. Recovery ranged from 98.82% to 101.28%, with RSD < 2%. The HPLC-UV method demonstrated excellent linearity in the range of 0.2 - 2.0 mg/mL ($R^2 = 0.9993$), with LOD = 42.4 µg/mL and LOQ = 128.5 µg/mL, with recovery values between 98.7% and 101.0%. Conclusion: Both methods successfully met ICH validation standards. Specifically, the UV-Vis method is preferred for rapid analysis of low-concentration samples, while HPLC-UV is more appropriate for the accurate quantification in complex niosome matrices due to its superior specificity.

Keywords: pregabalin, niosome, UV-Vis, HPLC-UV, method validation

Received: 14/10/2025

Revised: 31/01/2026

Accepted for publication: 05/02/2026