

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF AZELAIC ACID AND THE PRESERVATIVE BENZOIC ACID IN TOPICAL GEL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

LE QUANG THAO¹, NGUYEN THI HANG¹, HUA THI THU HUYEN¹, HOANG THI THANH THAO^{1,✉}

¹National Institute of Drug Quality Control

✉Corresponding author: hoangthaodkh@gmail.com

Received July 1st, 2025

Accepted September 18th, 2025

Abstract: A reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of acid azelaic and acid benzoic in topical gel was introduced. The method was carried out on a C18 column (4.6 mm x 250 mm, 5 μ m), using a methanol – amoni acetat buffer pH 4.5 mixture (20 : 80, v/v) as mobile phase. The mobile phase flow rate was maintained at 1.0 mL per minute. Injection volumn was 20 μ L. The UV dectector was set at 230 nm. The developed method has been illustrated to statisfy the requirements of specificity, system suitability, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision) according to ICH-(Q2R1) guideline. The validation results indicated that the developed procedure was suitable for simultaneous determination of acid azelaic and acid benzoic in studied gel and may be applied in laboratories.

Keywords: Simultaneous quantification, azelaic acid, benzoic acid, gel, HPLC.

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI ACID AZELAIC VÀ CHẤT BẢO QUẢN ACID BENZOIC TRONG GEL BÔI DA BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

LÊ QUANG THẢO¹, NGUYỄN THỊ HẰNG¹, HỨA THỊ THU HUYỀN¹, HOÀNG THỊ THANH THẢO^{1,✉}

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

✉Tác giả liên hệ: hoangthaodkh@gmail.com

Nhận bài ngày 01 tháng 7 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 9 năm 2025

Tóm tắt: Nghiên cứu này đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic trong gel bôi da bằng HPLC pha đảo. Phương pháp được thực hiện trên cột C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m), sử dụng pha động là hỗn hợp dung môi methanol - đệm amoni acetat pH 4,5 (20 : 80, v/v). Tốc độ dòng pha động được duy trì ở mức 1,0 mL/phút. Thể tích tiêm là 20 μ L. Đầu dò UV được đặt ở bước sóng 230 nm. Phương pháp đã xây dựng được thẩm định các yêu cầu về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian) theo hướng dẫn của ICH-(Q2R2). Kết quả thẩm định chỉ ra rằng quy trình đã xây dựng phù hợp để định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic trong gel nghiên cứu và có thể được áp dụng trong phòng thí nghiệm.

Từ khóa: Định lượng đồng thời, acid azelaic, acid benzoic, gel, HPLC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acid azelaic là một acid dicarboxylic bão hòa tự nhiên thường được sử dụng phổ biến trong điều trị mụn trứng cá và mụn viêm (sẩn mụn và nốt sần), cũng như các loại mụn khác, rối loạn tăng sắc tố [1]. Trên thị trường hiện nay, dạng gel thân nước của acid azelaic đang rất phổ biến với các ưu điểm như giải phóng dược chất nhanh, thể chất tương đối ổn định, không trơn nhờn và không cản trở hoạt động sinh lý bình thường của da. Tuy nhiên, dạng bào chế này lại có nhược điểm là dễ bị nấm mốc nên bắt buộc phải có thêm chất bảo quản. Acid benzoic là một trong các chất bảo quản phổ biến được dùng cho các chế phẩm chứa acid azelaic. Acid benzoic thường được sử dụng với nồng độ từ 0,02% đến 2,5% tùy thuộc vào pH chế phẩm [2]. Hàm lượng chất bảo quản trong các chế phẩm cần được kiểm soát để đạt nồng độ diệt nấm và phù hợp với các khuyến nghị về giới hạn chất bảo quản, qua đó đảm bảo chất lượng sản phẩm và bảo vệ người tiêu dùng. Quy trình định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic chưa có trong Dược điển Việt Nam và các dược điển tham chiếu [3 – 8]. Trong nước hiện chưa có công bố nào về phương pháp định lượng hai chất này. Trên thế giới, Mansour và cộng sự đã xây dựng phương pháp định lượng đồng thời hai chất này bằng phương pháp HPLC pha đảo, tuy vậy tác giả sử dụng cột C18 với kích thước hạt 4 μm , loại cột này không thực sự phổ biến ở Việt Nam [9].

Nhằm tối ưu phương pháp phân tích trong quá trình kiểm tra chất lượng mẫu gel chứa hai thành phần này, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic trong mẫu gel nghiên cứu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ đã được hiệu chuẩn, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters kết nối detector PDA; Máy đo pH Excellent Mettler Toledo; Cân phân tích Mettler MS105, độ chính xác 0,01 mg; Máy ly tâm lạnh Sigma 4-16KS; máy lắc siêu âm, micropipet 1000 μL và 5000 μL , các dụng cụ thủy tinh chính xác class A.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

- Chất chuẩn: Acid azelaic ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$) hàm lượng: 99,2% (nguyên trạng), SKS: 39757, NSX: LGC, GmbH, Germany và Acid benzoic ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$), hàm lượng: 99,9% (nguyên trạng), SKS: R144C0 của USP.

- Hóa chất: amoni acetat của Scharlau, acid acetic của VWR.

- Dung môi: Methanol (HPLC) của Merck, nước RO đạt tiêu chuẩn ĐDVN V của VKNTTW.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu gel nghiên cứu chứa acid azelaic (AA) 2,25 g; acid benzoic (AB) 0,015 g và tá dược (gồm: carbopol, propylen glycol, tween 80, isopropyl, natri hydroxyd, nước) trong vừa đủ 15 g gel. Các mẫu placebo với thành phần như sau:

- Placebo 1: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có acid azelaic, acid benzoic.

- Placebo 2: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có acid azelaic.

- Placebo 3: Mẫu giả dược được chuẩn bị như mẫu thử nhưng không có acid benzoic.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Dung môi pha mẫu: dung dịch đệm amoni acetat pH $4,5 \pm 0,1$ (Cân 1,0 g amoni acetat vào cốc 1000 mL, thêm 500 mL nước và 380 mL methanol, chỉnh pH đến $4,5 \pm 0,1$ bằng acid acetic. Thêm nước vừa đủ 1000 mL, trộn đều).

- Các dung dịch chuẩn gốc: Pha riêng biệt 02 dung dịch chuẩn, dung dịch chuẩn acid azelaic (6,0 mg/mL) và dung dịch chuẩn acid benzoic (0,2 mg/mL) trong dung môi pha mẫu.

- Dung dịch chuẩn acid azelaic: Hút 5,0 mL dung dịch chuẩn gốc acid azelaic vào bình định mức 10 mL, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc kỹ thu được dung dịch chuẩn acid azelaic 3,0 mg/mL.

- Dung dịch chuẩn acid benzoic: Hút 2,0 mL dung dịch chuẩn gốc acid benzoic vào bình định mức 20 mL, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc kỹ, thu được dung dịch chuẩn acid benzoic 0,02 mg/mL.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Cân chính xác khoảng 60,0 mg acid azelaic chuẩn vào bình định mức 20 mL. Hút 2,0 mL dung dịch chuẩn gốc acid benzoic vào bình định mức trên, thêm khoảng 15 mL dung môi pha mẫu, siêu âm 15 phút, để nguội, thêm dung môi pha mẫu vừa đủ đến vạch, lắc kỹ, thu được dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm acid azelaic 3,0 mg/mL và acid benzoic 0,02 mg/mL.

- Dung dịch thử: Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng với 150 mg acid azelaic cho vào bình định mức 50 mL. Thêm 30 mL dung môi pha mẫu, lắc siêu âm trong 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng rồi thêm dung môi pha mẫu đến vạch, lắc kỹ. Lấy dịch đem ly tâm ở 7000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy dịch trong phía trên đem lọc qua màng 0,45 μm , loại bỏ vài mL dịch lọc đầu. Sử dụng dịch lọc [10].

- Các dung dịch placebo được chuẩn bị tương tự như dung dịch thử.

2.2.2.2. Phương pháp phân tích

Sử dụng sắc ký lỏng pha đảo với cột sắc ký C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); pha động là hỗn hợp methanol và dung dịch đệm amoni acetat pH 4,5 $\pm$ 0,1.

Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn hỗn hợp; yêu cầu độ phân giải giữa các pic lớn hơn 1,5; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích mỗi pic từ 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp không được lớn hơn 2,0% [3].

Tiêm 20 μL các dung dịch placebo, dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch thử vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng của các pic chính trong dung dịch chuẩn hỗn hợp và dung dịch.

3. KẾT QUẢ

3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

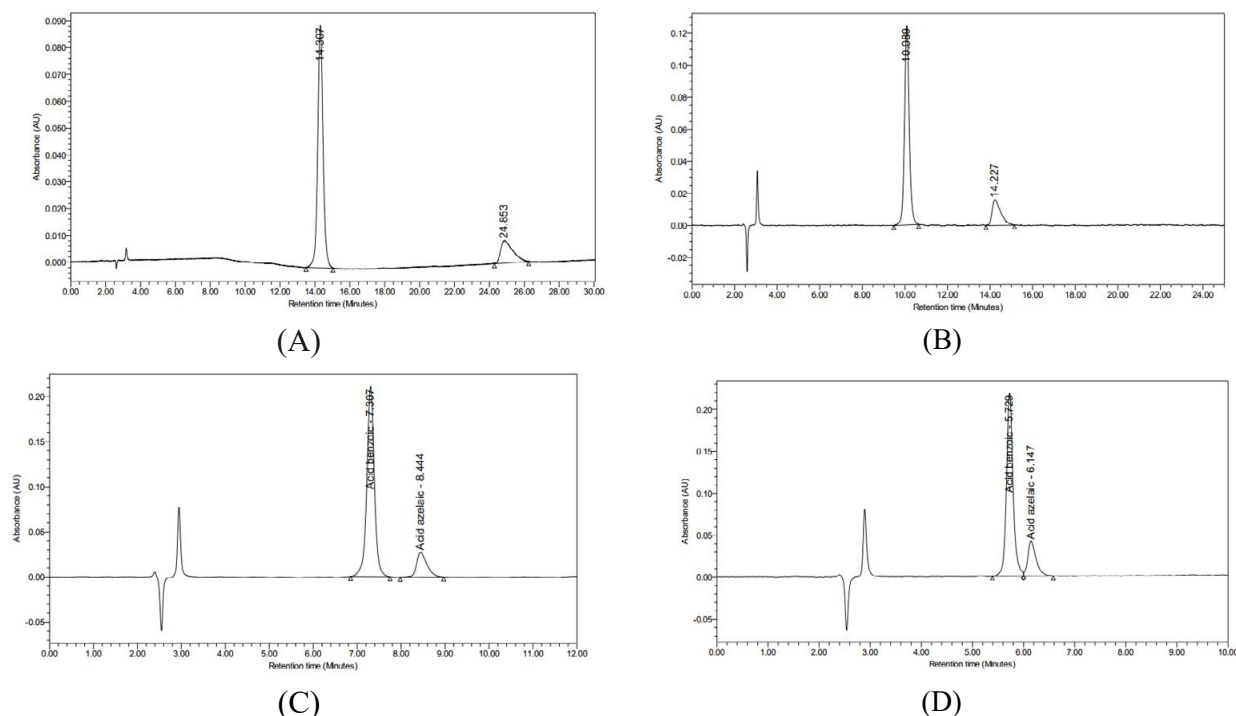
3.1.1. Lựa chọn cột sắc ký

Qua nghiên cứu các tài liệu về định lượng acid azelaic và acid benzoic, cùng các đặc điểm về tính chất lý hóa và công thức cấu tạo của các chất, với điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm, tiến hành khảo sát với cột sắc ký C18 (4,6 x 250 mm, 5 μm) [10 – 12].

3.1.2. Lựa chọn pha động

Dựa vào tính chất phân cực log P (1,57; 1,87) tương ứng với acid azelaic và acid benzoic đều là 2 chất có độ phân cực trung bình, có thể lựa chọn sắc ký phân bố pha đảo để phân tích. Bên cạnh đó, acid azelaic và acid benzoic là những acid yếu có pKa lần lượt 4,55 và 4,2; lựa chọn pha động có thành phần đệm pH trong khoảng từ 4,2 đến 4,55 để acid azelaic chuyển dạng ion (A^-), còn acid benzoic tồn tại dưới dạng phân tử (HA) trong dung dịch, từ đó 2 chất phân tích có thể được lưu giữ và rửa giải theo thời gian khác nhau.

Qua các tài liệu nghiên cứu được kết hợp với sự phổ biến của hóa chất, dung môi hiện có của phòng thí nghiệm, nhóm nghiên cứu lựa chọn pha động gồm methanol (MeOH) và đệm amoni acetat để tiến hành khảo sát ban đầu [10, 12]. Kết quả thu được như hình 1.



Hình 1. Kết quả khảo sát lựa chọn pha động gồm methanol – dung dịch đệm tỷ lệ lần lượt từ trên xuống dưới là (A) 0 : 100, (B) 10 : 90, (C) 20 : 80, (D) 30 : 70 (tt/tt)

Bảng 1. Kết quả khảo sát lựa chọn pha động

Pha động	Pic acid azelaic	Pic acid benzoic	Độ phân giải
	Hệ số đối xứng	Hệ số đối xứng	
Đệm amoni acetat pH 4,5 (100%)	1,86	1,07	11,83
MeOH – đệm amoni acetat pH 4,5 tỷ lệ 10 : 90	1,80	1,09	7,47
MeOH – đệm amoni acetat pH 4,5 tỷ lệ 20 : 80	1,37	0,98	3,23
MeOH – đệm amoni acetat pH 4,5 tỷ lệ 30 : 70	-	1,14	1,68

Kết quả cho thấy, khi tăng dần tỷ lệ methanol thì các pic ra sớm hơn, ở tỷ lệ 20 : 80 hình dạng các pic cân đối nhất, 2 pic tách nhau hoàn toàn (độ phân giải đạt 3,23) và thời gian lưu (t_R) phù hợp (7,3 phút và 8,4 phút). Pha động gồm methanol và dung dịch đệm amoni acetat pH

4,5 ở tỷ lệ 20 : 80 được lựa chọn để tiếp tục khảo sát và thẩm định.

3.1.3. Lựa chọn tốc độ dòng

Tiến hành khảo sát các tốc độ dòng 0,8; 1,0 và 1,5 mL/phút thu được kết quả như bảng 2.

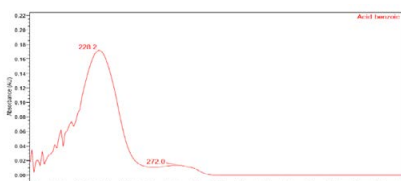
Bảng 2. Kết quả khảo sát lựa chọn tốc độ dòng

Tốc độ dòng	Acid azelaic		Acid benzoic		Độ phân giải
	Thời gian lưu (phút)	Hệ số đối xứng	Thời gian lưu (phút)	Hệ số đối xứng	
0,8 mL/phút	11,102	1,67	9,253	1,11	4,30
1,0 mL/phút	8,882	1,37	7,307	0,98	3,23
1,5 mL/phút	6,049	1,14	4,992	1,02	4,08

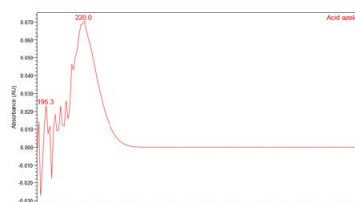
Từ kết quả thu được, ta thấy sắc ký đồ ở tốc độ dòng 1,5 mL/phút có hệ số đối xứng đẹp nhất, hệ số phân giải tốt, tuy nhiên trong quá trình phân tích, áp suất cột cao nên chúng tôi chọn tốc độ dòng 1,0 mL/phút.

3.1.4. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Thực hiện quét phổ UV mẫu chuẩn đơn của hai chất ở dải bước sóng 200 – 800 nm. Kết quả thu được như sau:



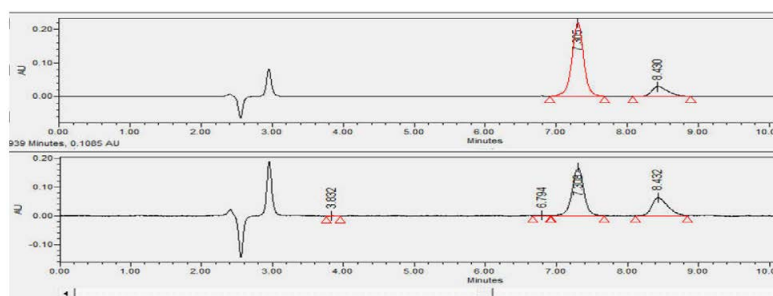
(a)



(b)

Hình 2. Hình ảnh quét phổ của dung dịch chuẩn acid azelaic (a) và acid benzoic (b)

Kết quả cho thấy acid azelaic có cực đại hấp thụ tại bước sóng khoảng 220 nm, trong khi đỉnh cực đại hấp thụ của acid benzoic ở 228 nm. Từ kết quả vừa thu được kết hợp với tham khảo tài liệu [10], tiếp tục tiến hành khảo sát mẫu chuẩn hỗn hợp ở 2 bước sóng 220 nm và 228 nm thu được kết quả sau:



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp bước sóng 228nm (trên) và 220nm (dưới)

Sắc ký đồ của mẫu chuẩn hỗn hợp tại bước sóng 220 nm bị nhiễu đường nền hơn so với sắc ký đồ mẫu chuẩn hỗn hợp tại bước sóng 228 nm. Vậy ta chọn 228 nm là bước sóng để xây dựng phương pháp định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic.

Sau khi khảo sát và đánh giá các chương trình, chúng tôi lựa chọn chương trình phân tích:

Điều kiện sắc ký:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters kết nối detector PDA

- Cột sắc ký Waters Reliant C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5 µm); Nhiệt độ cột: 40°C

- Pha động: Methanol – đệm amoni acetat pH 4,5 tỷ lệ thể tích tương ứng 20 : 80

- Bước sóng: 228 nm; Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; Thể tích tiêm: 20 µL

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Theo hướng dẫn của ICH và AOAC, phương pháp phân tích cần được thẩm định các chỉ tiêu: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và khoảng xác định.

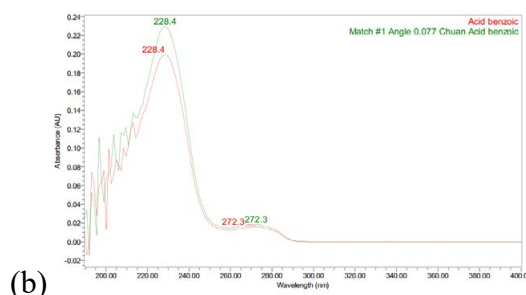
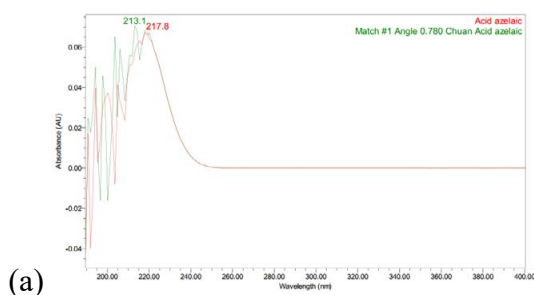
3.2.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành tiêm vào hệ thống sắc ký lần lượt các dung dịch placebo; dung dịch thử và dung dịch chuẩn hỗn hợp. Kết quả được trình bày ở dưới đây.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu dung dịch placebo, chuẩn, thử

Sắc ký đồ	Lượng cân (mg)	Thời gian lưu (t _R) của pic acid azelaic (phút)	Thời gian lưu (t _R) của pic acid benzoic (phút)	Ảnh hưởng của placebo
Chuẩn hỗn hợp 1.1 Acid azelaic Acid benzoic	62,68 21,51	8,428	7,304	
Thử 1	1011,19	8,427	7,303	
Placebo 1	862,19	Không có	Không có	Không ảnh hưởng
Placebo 2	868,97	Không có	7,306	Không ảnh hưởng
Placebo 3	994,24	8,420	Không có	Không ảnh hưởng

So sánh phổ dung dịch thử trên với thư viện phổ chuẩn đã lập từ các chuẩn acid azelaic, acid benzoic thu được kết quả:



Hình 4. Chồng phổ định tính acid azelaic (a) với hệ số Match Angle = 0,780 và Match Threshold = 2,185, acid benzoic (b) với hệ số Match Angle = 0,077 và Match Threshold = 1,097

Kết quả cho thấy phương pháp có tính đặc hiệu để định tính và định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic trong chế phẩm gel.

3.2.2. Độ thích hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần chuẩn hỗn hợp chứa acid azelaic

và acid benzoic với nồng độ tương ứng là 3,0 mg/mL và 0,02 mg/mL vào hệ thống sắc ký theo chương trình đã được lựa chọn ở trên. Kết quả đánh giá độ thích hợp của hệ thống được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống

STT	Pic acid azelaic			Pic acid benzoic		
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu AU.s$)	Hệ số đối xứng	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu AU.s$)	Hệ số đối xứng
Trung bình	8,426	466985	1,41	7,296	1995140	0,98
RSD (%)	0,02	0,87		0,04	0,14	

Hệ thống thích hợp để định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic.

3.2.3. Độ tuyến tính

Từ các dung dịch chuẩn gốc acid azelaic (6,0 mg/mL) và acid benzoic (0,2 mg/mL), pha loãng bằng dung môi pha mẫu để thu được 04 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng

độ các chất chính xác khoảng 50%, 80%, 120%, 150% so với nồng độ định lượng. Sử dụng dung dịch chuẩn hỗn hợp ở phần 3.2.2. Độ thích hợp hệ thống làm dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ chính xác khoảng 100% so với nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký theo điều kiện phân tích đã chọn. Kết quả được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ tuyến tính

Tên hoạt chất	Acid azelaic	Acid benzoic
Phương trình hồi quy	$Y = 155403x - 95,081$	$Y = 92380627x + 16379,228$
Hệ số tương quan	0,9987	0,9994
% Hệ số chặn	0,02	0,82

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ từng chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan $r > 0,998$.

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu thử theo quy trình phân tích, tiến hành 2 ngày khác nhau, mỗi ngày tiến hành định lượng trên 06 thử độc lập. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Tên hợp chất	Độ lặp lại (n = 6)		Độ chính xác trung gian (n = 12)	
	Hàm lượng so với nhãn (%)	RSD	Hàm lượng so với nhãn (%)	RSD
Acid azelaic	101,35	0,56 % (< 2%)	101,47	0,53 % (< 3%)
Acid benzoic	101,71	0,48 % (< 2%)	101,66	0,48 % (< 3%)

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại, độ chính xác trung gian tốt với cả 2 hoạt chất (RSD của hàm lượng các chất trong mẫu không lớn hơn các giá trị tham chiếu theo hướng dẫn của AOAC International) [13].

3.2.5. Độ đúng

Chuẩn bị các mẫu tự tạo bằng cách thêm chính xác lượng chất chuẩn của chất cần phân tích vào các mẫu

placebo. Lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng với các mức 70%, 100% và 130% so với nồng độ định lượng, ở mỗi mức nồng độ chuẩn bị 03 mẫu độc lập.

Tiến hành xử lý mẫu và sắc ký theo các điều kiện đã chọn. Tính lượng thu hồi của các chất phân tích. Kết quả được trình bày trong bảng sau.

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Độ đúng trong định lượng acid azelaic						
TT	Mức nồng độ	Lượng cân placebo 2 (g)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic ($\mu AU.s$)	Lượng tìm lại (mg)	Độ thu hồi (%)
1	70%	0,85119	109,36	328681	109,41	100,05
2	70%	0,85918	109,14	333805	111,11	101,81
3	70%	0,85586	110,82	332620	110,72	99,91

1	100%	0,85491	158,66	477938	159,09	100,27
2	100%	0,85787	159,40	479328	159,55	100,09
3	100%	0,85280	159,31	486602	161,98	101,68
1	130%	0,85652	207,49	622117	207,09	99,81
2	130%	0,85489	207,23	623391	207,51	100,14
3	130%	0,85395	206,26	625160	208,10	100,89
Trung bình (n = 9) (%)						100,52
RSD (n = 9) (%)						0,76
Độ đúng trong định lượng acid benzoic						
TT	Mức nồng độ	Lượng cân placebo 3 (g)	Lượng chuẩn thêm vào * (mg)	Diện tích pic (μ AU.s)	Lượng tìm lại (mg)	Độ thu hồi (%)
1	70%	0,99489	0,7491	1386260	0,7435	99,26
2	70%	0,99871	0,7477	1384765	0,7427	99,34
3	70%	1,00011	0,7383	1371559	0,7357	99,64
1	100%	0,99857	1,07012	1989380	1,0670	99,71
2	100%	0,99578	1,06813	1981571	1,0628	99,50
3	100%	0,99033	1,05470	1968780	1,0560	100,12
1	130%	0,99934	1,3912	2568765	1,3778	99,04
2	130%	0,99457	1,3886	2567016	1,3769	99,16
3	130%	0,99334	1,3711	2557189	1,3716	100,03
Trung bình (n = 9) (%)						99,53
RSD (n = 9) (%)						0,38

* Lượng chuẩn thêm vào được tính toán từ lượng cân chuẩn, hàm lượng chuẩn và thể tích hút dung dịch chuẩn gốc thêm vào mẫu placebo.

Kết quả ở trên cho thấy, phương pháp có độ đúng cao với phần trăm tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ đều nằm trong khoảng từ 98,0 – 102,0% (theo yêu cầu của AOAC [13]) và RSD < 2,0%. Do đó, đảm bảo cho việc định lượng acid azelaic và acid benzoic trong chế phẩm.

3.2.6. Khoảng xác định

Từ kết quả khảo sát độ tuyến tính và độ đúng, suy ra khoảng xác định của quy trình định lượng đã xây dựng là từ 2,176 – 4,042 mg/mL acid azelaic và 0,015 – 0,028 mg/mL acid benzoic.

4. BÀN LUẬN

Trên thế giới đã có một số công bố về quy trình định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic [9], quy trình định lượng acid azelaic trong thuốc điều trị mụn trứng cá [10], quy trình định lượng acid benzoic [12]. Tuy nhiên, các quy trình công bố còn chưa thực sự phù hợp với nhu cầu phân tích mẫu (nền mẫu khác, mẫu chỉ có 1 thành

phần) hoặc điều kiện phòng thí nghiệm (sử dụng cột phân tích không phổ biến). Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành khảo sát để xây dựng phương pháp phù hợp với mẫu phân tích và điều kiện phòng thí nghiệm. Trong quy trình này, chúng tôi đã điều chỉnh tỷ lệ pha động, tốc độ dòng, bước sóng phát hiện để đạt được kết quả phân tích tốt nhất. Quy trình xử lý mẫu, điều kiện sắc ký đơn giản nhưng có khả năng phân tích hiệu quả với độ phân giải của 2 pic trên 3, thời gian phân tích phù hợp (12 phút/mẫu tiêm), độ tuyến tính cao, độ đúng và độ lặp tốt.

5. KẾT LUẬN

Qua thực nghiệm, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời acid azelaic và acid benzoic trong gel bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký đơn giản, dễ dàng, tiết kiệm có thể áp dụng rộng rãi ở các phòng thí nghiệm có máy HPLC. Phương pháp được thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn của ICH [10] và AOAC [9], có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính rộng để có thể phân tích đồng thời acid azelaic và acid benzoic trong các chế phẩm gel đang lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fitton A, Goa KL (1991), “Azelaic acid. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and hyperpigmentary skin disorders, *Drugs*, 1991 May;41(5):780-98. doi: 10.2165/00003495-199141050-00007. PMID: 1712709.
2. Johnson W, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA (2017), “Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and Benzyl Benzoate”, *Int J Toxicol.*, 2017 Nov/Dec; 36(3_suppl):5S-30S. doi: 10.1177/1091581817728996. PMID: 29243541.
3. Bộ Y tế (2018), *Dược Điển Việt Nam V*, NXB Y học.
4. European Pharmacopoeia Commission (2022), *European Pharmacopoeia 11*.
5. United States Pharmacopoeial Convention (2025), *The United States Pharmacopoeia 2025*.
6. Council of Europe, *British Pharmacopoeia 2024*.
7. World Health Organization (2022), *Pharmacopoeia Internationalis 11th Edition*.
8. Japan Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (2021), *Japanese Pharmacopoeia 18*.
9. Mykola Ye Blazheyevskiy (2015), “Quantitative Determination of Azelaic Acid in “Propolis” Gel with the Propolis Phenolic Hydrophobic Drug for Treating Acne”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015/02/28, doi: 10.17265/2328-2150/2015.02.004.
10. D. S. Malik and G. Kaur (2018), “A Validated Stability-indicating RP-HPLC Method for Analysis of Azelaic Acid in Pharmaceuticals”, *Indian J Pharm Sci* 2018;80(3):503-509
11. Mu G, Liu H, Gao Y, Luan F (2011), “Determination of benzoyl peroxide, as benzoic acid, in wheat flour by capillary electrophoresis compared with HPLC”, *J Sci Food Agric*, 2012 Mar 15;92(4):960-4. doi: 10.1002/jsfa.4677. Epub 2011 Oct 14. PMID: 21997699.
12. AOAC (2016), *Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements*.
13. ICH (2023), *Q2R2 Validation of Analytical Procedures*.