

Thẩm định qui trình phân tích đồng phân quang học lansoprazol trên cột sắc kí lux cellulose

Nguyễn Thảo Hạnh Ngân^{2*}, Lê Thị Thu Cúc¹

¹ Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh

² Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

*nthngan@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) đã được triển khai để nghiên cứu phân tách đồng phân quang học của lansoprazol. Quá trình khảo sát thực hiện trên 3 cột tách đồng phân Lux cellulose-1, Lux cellulose-2 và Lux cellulose-3. Hai đồng phân đã được phân tách hoàn toàn trên cột Lux Cellulose-1. Pha động sử dụng là axit n-hexan-isopropanol axit formic (80: 20: 0.1) (v/v/v), phát hiện bằng đầu dò UV tại bước sóng 285nm. Độ phân giải của các giá trị lớn hơn 3,5. Phạm vi định lượng cho hai đồng phân quang học là từ 150 đến 1200g/ml. Độ lệch chuẩn tương đối của phương pháp là dưới 2% (n = 6), phạm vi phục hồi nằm trong khoảng 98 đến 102%. Phương pháp đạt yêu cầu thẩm định về tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng theo hướng dẫn ICH (International Council for Harmonisation) và phù hợp để ứng dụng kiểm tra chất lượng các chế phẩm chứa hoạt chất lansoprazol trên thị trường.

Nhận 03.12.2019

Được duyệt 06.02.2020

Công bố 30.03.2020

Từ khóa

HPLC, phân tích đồng phân, sắc kí lỏng, lansoprazol, dexlansoprazol

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Lansoprazol là dẫn chất benzimidazol có tác dụng chống tiết acid dạ dày, ức chế bơm proton[1,2,7,10].

Do cấu trúc của lansoprazol có carbon bất đối nên chúng có hai đồng phân đối quang dạng (*S*) - là dạng có hoạt tính. Mặt khác, còn có sự hiện diện của dạng (*R*) gây tác dụng phụ. Các biệt dược của lansoprazol trên thị trường phần lớn là dạng racemic. Tuy nhiên, do dạng đồng phân (*S*) có hoạt tính mạnh hơn dạng racemic, nên hiện nay

cũng đã xuất hiện các chế phẩm dạng đồng phân riêng lẻ trên thị trường.

Tiếp theo công trình nghiên cứu về lĩnh vực tách đồng phân quang học, nghiên cứu này giới thiệu kết quả phân tích đồng phân quang học dexlansoprazol bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2 Nguyên liệu và phương pháp

Chất đối chiếu, trang thiết bị, dung môi và hóa chất
Chất đối chiếu

Bảng 1 Các chất đối chiếu

Chất đối chiếu	Hàm lượng (%) tính trên chế phẩm nguyên trạng	Số lô	Nguồn gốc
Lansoprazol	98,80	QT161 080718	VKN thuốc TP.HCM
Dexlansoprazol	98,00	L175015	Toronto

Trang thiết bị

- Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao SHIMADZU UFLC 20A, đầu dò PDA
- Cột Lux Cellulose-1 (cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamat) (250 x 4,6mm; 5µm).
- Cột Lux Cellulose-2 (cellulose tris(3-cloro-4-methylphenyl carbamat) (250 x 4,6mm; 5µm).
- Cột Lux Cellulose-3 (cellulose tris(5-cloro-2-methyl-

phenyl carbamat) (250 x 4,6mm; 5µm).

- Cân phân tích điện tử Mettler Toledo AT200, bể siêu âm Hwashin, bình định mức, pipet chính xác, ống đong, cốc có mỏ...

Các thiết bị phân tích và dụng cụ phân tích đã được hiệu chuẩn đạt qui định theo GLP và ISO/IEC 17025.

Dung môi và hóa chất:



n-hexan, 2-propanol (IPA), acid formic (FA): dùng cho HPLC (J.T.Baker)

Đối tượng nghiên cứu:

- Viên nén nang lansoprazol 30mg
- Viên nang Dexilant (dexlansoprazol) 60mg

Phương pháp nghiên cứu:

Thay đổi thành phần và tỉ lệ pha động nhằm chọn được điều kiện phân tích đáp ứng các yêu cầu với các thông số: hai peak đồng phân phải tách nhau hoàn toàn với độ phân giải $R_s > 1,5$; đáp ứng đầu dò cao, hệ số bất đối A_s của peak nằm trong khoảng 0,8-1,5[3,8,9].

Sau khi tìm được điều kiện phân tích thích hợp, tiến hành thẩm định qui trình phân tích bao gồm: khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện, độ chính xác và độ đúng[4].

Chuẩn bị mẫu :

- Dung dịch mẫu chuẩn lansoprazol (1200 μ g/ml): Cân chính xác 30mg lansoprazol chuẩn, cho vào bình định mức 25ml, thêm 15ml methanol, siêu âm 10 phút, lắc đều, để nguội, thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μ m.
- Dung dịch mẫu chuẩn dexlansoprazol (600 μ g/ml): Cân chính xác 30mg dexlansoprazol chuẩn, cho vào bình định mức 50ml, thêm 35ml methanol, siêu âm 10 phút, lắc đều,

để nguội, thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μ m.

- Dung dịch mẫu thử dexlansoprazol: Cân 20 viên nang dexlansoprazol, xác định khối lượng trung bình thuốc trong nang. Cân lượng thuốc đã nghiền mịn tương ứng với khoảng 30mg dexlansoprazol, cho vào bình định mức 50ml, thêm 35ml methanol, siêu âm 10 phút, lắc đều, để nguội, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μ m.

- Dung dịch mẫu thử lansoprazol: Cân 20 viên nang lansoprazol, xác định khối lượng trung bình thuốc trong nang. Cân lượng thuốc đã nghiền mịn tương ứng với khoảng 30mg metoprolol, cho vào bình định mức 25ml, thêm 15ml methanol, siêu âm 10 phút, lắc đều, để nguội, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 μ m.

- Dung dịch mẫu placebo: chuẩn bị như dung dịch mẫu thử nhưng thay lượng bột thuốc bằng lượng tá dược tương ứng trong mẫu thử.

- Dung dịch mẫu trắng: Dung môi hòa tan mẫu là methanol.

3 Kết quả và bàn luận

Khảo sát điều kiện sắc kí

Bảng 2 Các điều kiện sắc kí khảo sát[3,5,6]

	Pha động	Cột sắc kí
Điều kiện 1	<i>n</i> -hexan-IPA (80:20)	Cột Lux Cellulose-3
Điều kiện 2	<i>n</i> -hexan-IPA (80:20)	Cột Lux Cellulose-2
Điều kiện 3	<i>n</i> -hexan-IPA (80:20)	Cột Lux Cellulose-1
Điều kiện 4	<i>n</i> -hexan-IPA-FA (80:20:0,1)	Cột Lux Cellulose-1

Nhận xét: - Điều kiện 1, 2: không phân biệt được các dạng đồng phân

- Điều kiện 3: xuất hiện 2 peak đồng phân lansoprazol với độ phân giải $R_s = 1,7$

- Điều kiện 4: hai peak đồng phân tách hoàn toàn với $R_s = 3,7$

Điều kiện 3 và điều kiện 4 cả hai peak đồng phân lansoprazol đều tách hoàn toàn. Tuy nhiên, ở điều kiện 4 với sự hiện diện của acid formic trong pha động thì đã cải

thiện được độ doãng của peak, cũng như tăng độ phân giải giữa hai peak đồng phân.

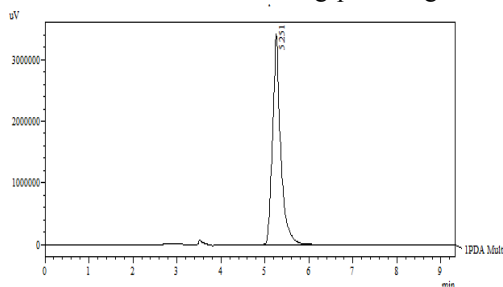
Như vậy, điều kiện thích hợp để phân tích đồng phân quang học của lansoprazol là:

- Cột sắc kí Lux Cellulose-1 (250 x 4,6mm; 5 μ m).

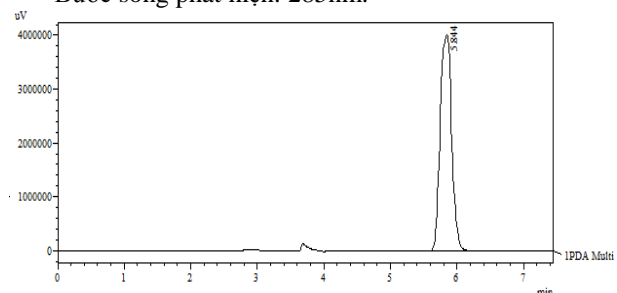
- Pha động *n*-hexan-IPA: FA (80:20:0,1).

- Tốc độ dòng: 1,5ml/phút. Nhiệt độ cột: 30°C. Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l.

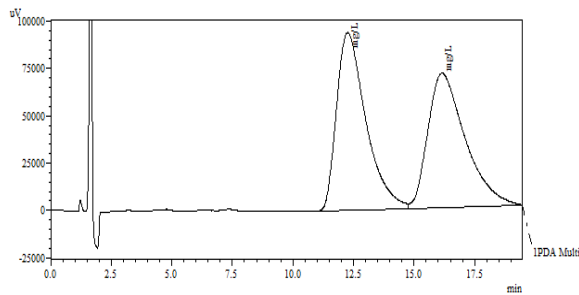
- Bước sóng phát hiện: 285nm.



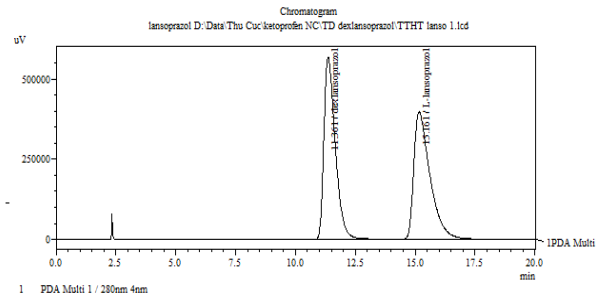
Điều kiện 1



Điều kiện 2



Điều kiện 3



Điều kiện 4

Hình 1 Các sắc kí đồ khảo sát điều kiện sắc kí

Thẩm định phương pháp:

Khảo sát tính phù hợp của hệ thống:

Bảng 3 Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của phương pháp đối với mẫu chuẩn lansoprazol (n=6)

STT	S (Diện tích pic) (mAU) (RSD ≤ 2%)		T _R (Thời gian lưu) (phút) (RSD ≤ 2%)		A _S (Hệ số bất đối) 0,8 ≤ A _S ≤ 1,5		R _S (Độ phân giải)
	S _{DEX}	S _{S-LAN}	S _{DEX}	S _{S-LAN}	S _{DEX}	S _{S-LAN}	R _S ≥ 1,5
1	12180058	12209251	10,235	12,330	0,966	0,968	2,603
2	12198891	12223899	10,244	12,342	0,968	0,966	2,607
3	12160140	12187269	10,245	12,343	0,964	0,963	2,609
4	12146444	12173934	10,240	12,338	0,965	0,966	2,608
5	12145855	12171543	10,237	12,336	0,962	0,967	2,611
6	12132977	12163599	10,240	12,340	0,966	0,965	2,612
TB	12160728	12188249	10,240	12,338	0,965	0,966	2,608
SD	22456	21620	0,004	0,004	0,002	0,002	0,003
RSD (%)	0,185	0,177	0,034	0,035	0,193	0,163	0,112

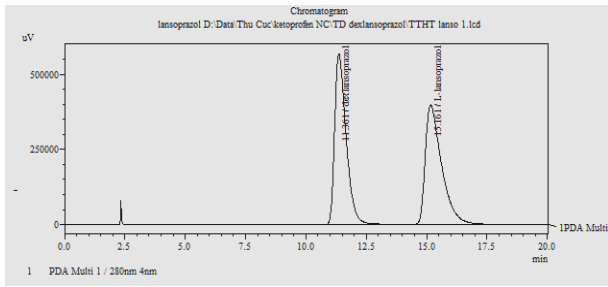
Bảng 4 Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của phương pháp đối với mẫu chuẩn dexlansoprazol (n=6)

STT	S (Diện tích pic) (mAU) (RSD ≤ 2%)	T _R (Thời gian lưu) (phút) (RSD ≤ 2%)	A _S (Hệ số bất đối) 0,8 ≤ A _S ≤ 1,5	N (Số đĩa lí thuyết)
1	11458710	10,227	0,976	29914,60
2	11462915	10,223	0,978	29972,60
3	11454164	10,229	0,974	30083,45
4	11457987	10,231	0,975	30058,48
5	11453553	10,229	0,972	29946,32
6	11461735	10,228	0,976	30024,76
TB	11458177	10,228	0,975	30000
SD	3486	2	0,002	60
RSD (%)	0,03	0,024	0,191	0,20

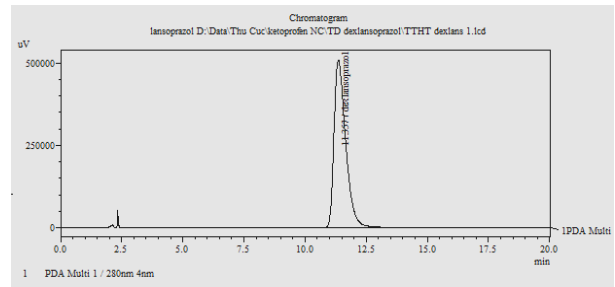
Kết quả thống kê cho thấy, sau 6 lần sắc kí thông số thời gian lưu (R_t) và diện tích peak (S) của mỗi peak đồng phân có RSD < 2%; giá trị độ phân giải (R_S) lớn hơn 1,5 và hệ số đối xứng (A_S) nằm trong khoảng 0,8 – 2,0. Vậy phương pháp đạt tính phù hợp của hệ thống.

Tính đặc hiệu:

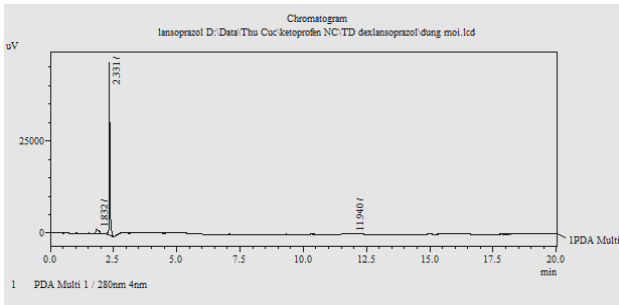
Tiến hành sắc kí các mẫu trắng, mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu thử.



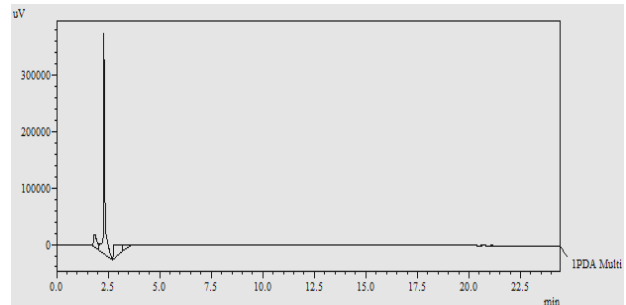
Hình 2 Sắc kí đồ của mẫu chuẩn lansoprazol



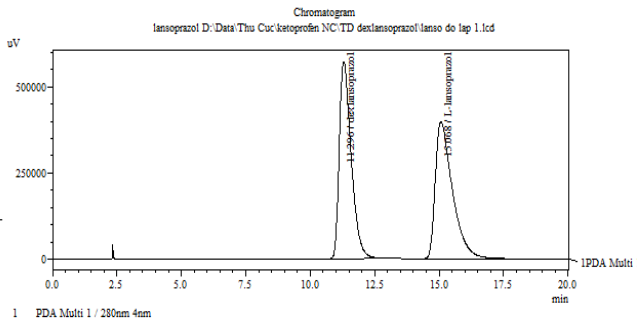
Hình 3 Sắc kí đồ của mẫu chuẩn dexlansoprazol



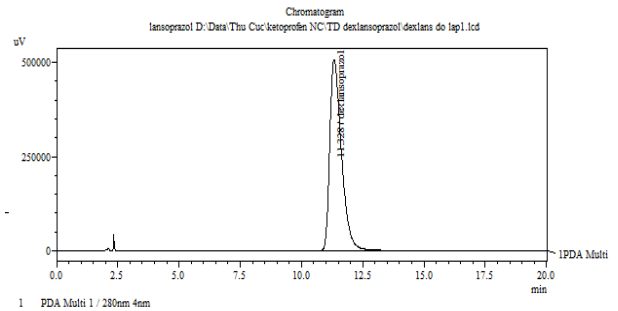
Hình 4 Sắc kí đồ của dung môi



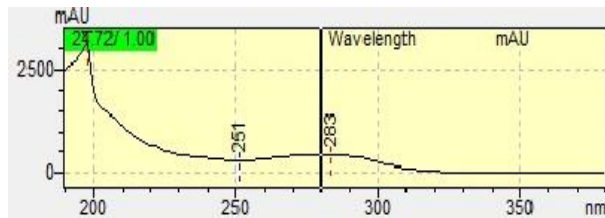
Hình 5 Sắc kí đồ của mẫu trắng(Placebo)



Hình 6 Sắc kí đồ của mẫu thử lansoprazol



Hình 7 Sắc kí đồ của mẫu thử dexlansoprazol



Hình 8 Phổ UV tại thời gian lưu của peak dexlansoprazol trong mẫu chuẩn

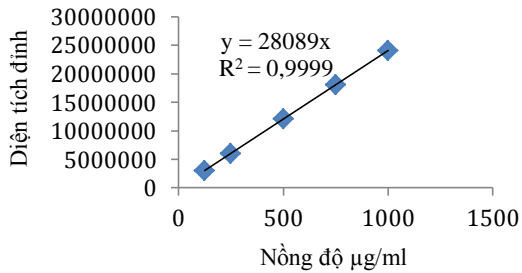
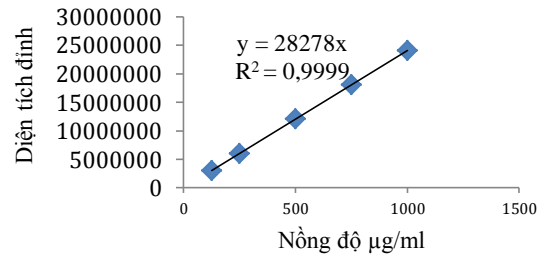
Nhận xét:

- Kết quả cho thấy mẫu trắng, mẫu placebo không có peak trùng với peak chất phân tích.
- Mẫu chuẩn lansoprazol xuất hiện hai peak đồng phân có độ phân giải >1,5. Trong hai peak đồng phân thì peak có thời gian lưu ngắn hơn là peak của đồng phân dexlansoprazol và trùng với thời gian lưu của peak chính trong mẫu chuẩn dexlansoprazol.

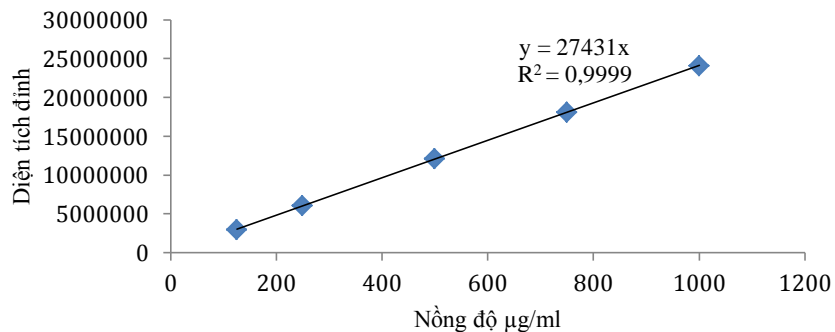
- Thời gian lưu của peak chính trong mẫu thử dexlansoprazol tương ứng với thời gian lưu của peak chính trong mẫu chuẩn dexlansoprazol.
- Phổ tử ngoại của các peak tại thời gian lưu của các peak trong mẫu thử giống phổ tử ngoại của các peak trong mẫu chuẩn. Độ tinh khiết của các peak lớn hơn 99%. Hai peak của hai dạng đồng phân có phổ UV giống nhau. Vậy phương pháp có tính đặc hiệu. Khoảng tuyến tính

Bảng 5 Kết quả khảo sát tính tuyến tính của mẫu chuẩn lansoprazol

STT	Khối lượng (mg)	Thể tích (ml)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích dexlansoprazol	Diện tích (S)-lansoprazol
TT-125	6,20	50	124,00	2994648	3000059
TT-250	12,50	50	250,00	6040011	6053617
TT-500	24,90	50	499,80	12087705	12112083
TT-750	37,30	50	746,00	18062199	18101533
TT-1000	49,80	50	996,00	24044292	24092908

**Hình 9** Mối quan hệ giữa nồng độ và diện tích đỉnh dexlansoprazol trong mẫu chuẩn lansoprazol**Hình 10** Mối quan hệ giữa nồng độ và diện tích đỉnh (S)-lansoprazol trong mẫu chuẩn lansoprazol**Bảng 6** Kết quả khảo sát tính tuyến tính của mẫu chuẩn lansoprazol

STT	Khối lượng (mg)	Thể tích (ml)	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích dexlansoprazol
62,5	3,12	50	62,40	2722170
125	6,20	50	124,00	5567438
250	12,50	50	250,00	11503642
375	18,80	50	376,00	17405059
500	24,90	50	498,00	23411437

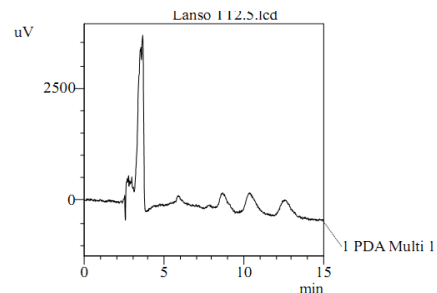
**Hình 11** Mối quan hệ giữa nồng độ và diện tích đỉnh dexlansoprazol trong mẫu chuẩn dexlansoprazol

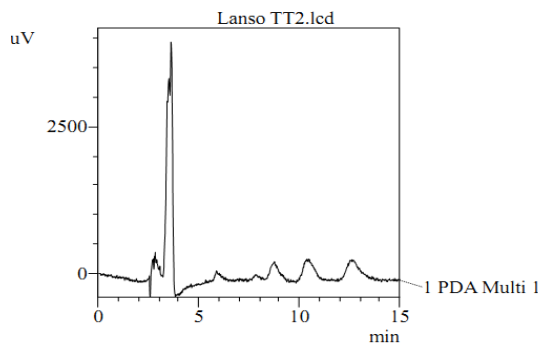
Sử dụng trắc nghiệm t và trắc nghiệm F đã xác định được:

- Hệ số b không có ý nghĩa
- Hệ số a có ý nghĩa
- Phương trình hồi qui của 2 đồng phân lansoprazol có tính tương thích giữa nồng độ và diện tích đỉnh

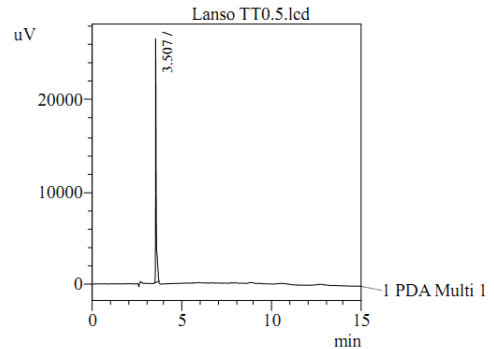
Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện được xác định dựa vào phương pháp pha loãng nồng độ lansoprazol lần lượt là: 0,25; 0,20; 0,10; 0,05; 0,025 $\mu\text{g/ml}$

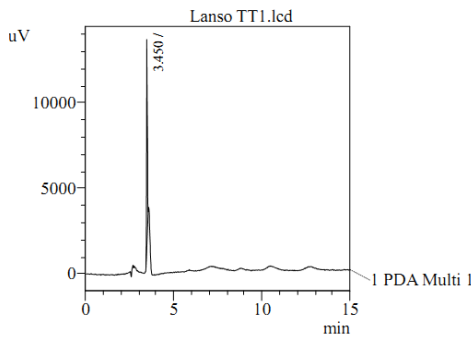
**Hình 12** Sắc ký đồ mẫu chuẩn lansoprazol nồng độ 0.50 $\mu\text{g/ml}$



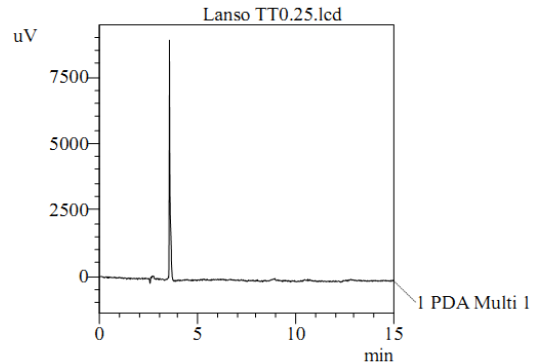
Hình 13 Sắc kí đồ mẫu chuẩn lansoprazol nồng độ 0,20µg/ml



Hình 15 Sắc kí đồ mẫu chuẩn lansoprazol nồng độ 0,05µg/ml



Hình 14 Sắc kí đồ mẫu chuẩn lansoprazol nồng độ 0,10µg/ml



Hình 16 Sắc kí đồ mẫu chuẩn lansoprazol nồng độ 0,025µg/ml

Nồng độ thấp nhất của 2 peak đồng phân mà ở đó có thể phát hiện được là 0,10µg/ml
 Độ chính xác

Bảng 7 Kết quả khảo sát độ lặp lại của viên nén dexlansoprazol

Số lần	Hàm lượng nhãn (mg)	Ngày 1		Ngày 2	
		Diện tích dexlansoprazol	Hàm lượng (%)	Diện tích dexlansoprazol	Hàm lượng (%)
1	60	11525453	96,05	11547453	96,23
2		11490063	95,75	11494603	95,79
3		11485096	95,71	11483076	95,69
4		11492579	95,77	11492579	95,77
5		11482205	95,69	11484215	95,70
6		11474483	95,62	11476683	95,64
TB		11491646,5	95,77	11496434,8	95,80
RSD (%) (n=6)			0,33		0,33
RSD (%) (n=12)		0,24			

Phương pháp phân tích đạt độ chính xác do RSD đều không quá 2% ở hai ngày thực hiện khác nhau trong cùng 1 phòng thí nghiệm, cùng 1 thiết bị phân tích và thay đổi người phân tích.

Độ đúng

Bảng 8 Kết quả khảo sát độ đúng của viên nén dexlansoprazol

Tỉ lệ chất chuẩn thêm vào (%)	Lượng dexlansoprazol có sẵn ($\mu\text{g/ml}$)	Lượng dexlansoprazol thêm vào ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích peak	Lượng tìm lại ($\mu\text{g/ml}$)	Tỉ lệ phục hồi (%)
80	249,80	210,90	22211604	210,53	99,82
	250,10	208,70	22217053	210,34	100,79
	249,70	208,30	22210715	210,61	101,11
100	248,15	239,60	23596810	240,88	100,53
	248,27	239,45	23574199	240,29	100,35
	248,90	240,15	23569681	239,57	99,76
120	250,95	296,10	26384026	295,85	99,92
	250,80	296,54	26367813	295,66	99,7
	250,35	295,65	26322746	295,18	99,84
Trung bình					100,2022
RSD%					0,512781

Nhận xét: Phương pháp phân tích đạt độ đúng với tỉ lệ phục hồi nằm trong khoảng cho phép 98% - 102%.

Bảng 9 Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, độ chính xác, độ đúng

	Mẫu lansoprazol		Mẫu Dexlansoprazol
	Dexlansoprazol	R-lansoprazol	
Phương trình hồi qui	$y = 28089x$ $R^2 = 0,9999$	$y = 28278x$ $R^2 = 0,9999$	$y = 27431x$ $R^2 = 0,9999$
Khoảng tuyến tính	125 – 1000 $\mu\text{g/ml}$		
Giới hạn phát hiện	0,1 $\mu\text{g/ml}$		
Độ lặp lại (n = 6)	RSD = 0,334%		
Độ chính xác trung gian (n=12)	RSD = 0,404%		
Độ đúng (n = 9) %RSD	99,34%-100,51% 0,328%		

Kết quả thống kê cho thấy qui trình phân tích có khoảng tuyến tính rộng với hệ số tương quan cao, tỉ lệ hồi phục nằm trong khoảng 98% - 102% và $RSD \leq 2\%$ đối với độ chính xác.

4 Kết luận

Bằng phương pháp HPLC sử dụng pha tĩnh bất đối, nghiên cứu đã tiến hành xây dựng và thẩm định qui trình phân tích đồng phân quang học dexlansoprazol, với các điều kiện như sau: cột sắc kí Lux Cellulose-1, chiều dài 250mm, đường kính trong 4,6mm, kích thước hạt 5 μm . Pha động là hệ dung môi *n*-hexan-IPA-FA (80:20:0,1, v/v/v), tốc độ dòng 1ml/phút, nhiệt độ 30°C, thể tích tiêm mẫu 20 μl , bước sóng phát hiện 285nm. Qui trình này có tính đặc hiệu, độ chính xác và độ lặp cao.

Đề tài có thể được mở rộng bằng cách nghiên cứu ứng dụng qui trình phân tích đồng phân lên các loại cột pha tĩnh bất

đối khác nhau để phù hợp với điều kiện cơ sở vật chất sẵn có của từng đơn vị nghiên cứu. Đề tài có thể được tiến hành thêm hướng phân tích đồng phân lansoprazol bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao sử dụng pha động chứa tác nhân đổi quang hoặc bằng phương pháp điện di trên cột mao quản phủ silica. Từ các phương pháp phân tích khác nhau có thể có được sự so sánh về ưu, nhược điểm của từng phương pháp, để có thể vận dụng trong công tác kiểm tra và quản lí chất lượng thuốc. Mỗi phương pháp có điều kiện phân tích khác nhau với độ nhạy, giới hạn phát hiện, giới hạn phân tích, khoảng tuyến tính khác nhau. Tùy theo từng loại mẫu phân tích khác nhau có thể lựa chọn phương pháp phù hợp.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành trong, đề tài mã số 2019.01.65/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y Tế (2017), “Lansoprazol”, Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
2. Trương Thế Kỳ (2006), Hóa hữu cơ- Hợp chất hữu cơ đơn chất và đa chức, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Dongmei Wang, Fang Li, Zhen Jiang, Li Yu, and Xingjie Guo (2014), “Chiral Recognition Mechanisms of four β -Blockers by HPLC with Amylose Chiral Stationary Phase”, *Iran J Pharm Res*, 13(2), pp.449-45.
4. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), “Validation of analytical procedures: text and methodology”, pp.1-13.
5. Morante-Zarcelero S, Sierra I (2012), “Comparative HPLC methods for β -blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes”, *J Pharm Biomed Anal.*, pp.33-41
6. Radu Cristian Moldovan, Gabriel Sorn Dascal, Valentin Mire, Ede Bodoki, Radu Oprean (2015), “Chiral separation of 16 beta blockers on immobilized polysaccharide chiral stationary phases”, *Farmacia*, Vol.63, pp.909-912.
7. Caner H., Groner E., Levy L., Agranat I. (2004), “Trends in the development of chiral drugs”, *Drug Discov. Today*, 9(3), 105.
8. Alberto Cavazzini, Luisa Pasti, Alessandro Massi, Nicola Marchetti, Francesco Dondi (2011), “Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review”, *Analytica Chimica Acta*, 706, pp.205-222.
9. P. Balamurugan et al, (2015), A simple rp-hplc method for simultaneous estimation of organic impurities and assay of dexlansoprazole, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(9), 347-352
10. Miura M et al, (2004), Simultaneous determination of lansoprazole enantiomers and their metabolites in plasma by liquid chromatography with solid-phase extraction, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, ;804(2):389-95

Method validation of lansoprazole optical isomer analysis on lux cellulose column

Nguyen Thao Hanh Ngan^{2,*}, Le Thi Thu Cuc¹

¹Ho Chi Minh City Institute of Drug Quality Control

²Faculty of pharmacy, Nguyen Tat Thanh university

*nthngan@ntt.edu.vn

Abstract A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the chiral separation of lansoprazole. The survey was carried out on 3 Lux cellulose-1, Lux cellulose-2 and Lux cellulose-3 isolate separating columns. The two enantiomers were separated on a the Lux Cellulose-1 column. The mobile phase was n-hexane-isopropanol - formic acid mixture (80:20:0.1) (v/v/v), UV detection was at 285nm. The resolution of the enantiomers was greater than 3.5. The range of quantification for both enantiomers was 150-1200 μ g/ml. Relative standard deviation of the method was below 2% (n=6), and the recovery range was 98-102%. The method meets the validation requirements for specificity, linear range, accuracy, detection limit and quantitative limit in accordance with ICH (International Council for Harmonization) guidelines and is suitable for lansoprazole active ingredient quality control.

Keywords HPLC , dexlansoprazole, chiral separation, enantiomers.