

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LEVOFLOXACIN TRONG DƯỢC PHẨM
VÀ NƯỚC TIỂU NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

Đến tòa soạn 20-3-2017

Nguyễn Thu Hà, Từ Bình Minh, Tạ Thị Thảo

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐH Quốc gia Hà Nội

Nguyễn Thị Minh Diệp

Bộ môn Kiểm nghiệm thuốc, Trường cao đẳng dược Phú Thọ

Nguyễn Xuân Trường

Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

SUMMARY

**DETERMINATION OF LEVOFLOXACIN IN PHARMACEUTICALS AND
HUMAN URINE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

A reversed-phase HPLC method was developed and validated for quantification of levofloxacin (LEV) in pharmaceuticals and human urine sample. The optimal HPLC-conditions were as follows: C18 MRC-ODS (6 × 250 mm, 15 μm) column, mobile phase of acetonitrile: 20 mM phosphate buffer, pH=3 (30:70 v/v), flow rate at 0,8 ml/min, and detection wavelength of 295 nm at room temperature. LEV in pharmaceutical samples was extracted with acetonitrile in an ultrasonic bath for 15 min. The liquid – liquid and solid-phase extraction procedures for LEV in human urine samples were proposed. Dichloromethane was used for liquid – liquid extraction. Hydrophilic-lipophilic balance Oasis HLB cartridge was used for solid phase extraction. The recoveries of LEV determined by liquid-liquid and solid phase extraction method were 87 and 94 %, respectively. The detection limit of LEV was 0.03 ppm with a RSD < 1.3 % (n=3). The results of LEV analyses in pharmaceutical samples were consistent with those labelled in commercial formulations. LEV concentrations in urine samples of patients inoculated with dose of 750 mg/150 ml after 4-10 h ranged from 30 - 65 ppm.

1. MỞ ĐẦU

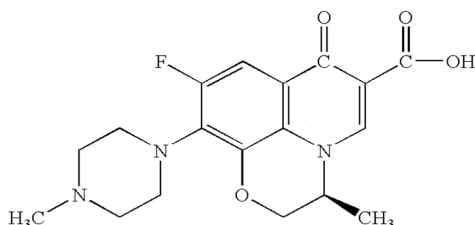
Levofloxacin (LEV) là kháng sinh

thuộc nhóm quinolone thế hệ 3, là đồng phân quang học của ofloxacin (OFL).

Ngày càng nhiều dược phẩm lưu hành trên thị trường chứa dạng đơn thành phần LEV vì hiệu lực kháng khuẩn của nó được chứng minh là mạnh gấp 8-128 lần R-OFL [1]. Ở Việt Nam, LEV được sử dụng dưới dạng thuốc viên, thuốc tiêm, truyền, thuốc nhỏ mắt... với nguồn gốc và giá thành khác nhau. Vì vậy, nghiên cứu xác định hàm lượng LEV rất cần thiết để kiểm tra chất lượng thuốc. LEV được hấp thu nhanh và hầu như hoàn toàn (99%) sau khi uống 1-2 giờ. Levofloxacin rất ít bị chuyển hóa trong cơ thể và thải trừ gần như hoàn toàn (~ 87%) qua nước tiểu ở dạng còn nguyên hoạt tính sau 2 ngày. Dưới 5% liều điều trị được tìm thấy trong nước tiểu dưới dạng chất chuyển hóa desmethyl và N-oxit ít có tác dụng dược lý [2]. Do đó, nghiên cứu xác định hàm lượng LEV trong dịch sinh học (như nước tiểu, huyết tương, mô, dịch não tủy...) sau khi dùng thuốc là rất quan

trọng trong các đánh giá sinh khả dụng, dược động học, ... Điều này đảm bảo người bệnh tùy từng trường hợp khác nhau nhận được phác đồ điều trị kháng sinh LEV phù hợp, hiệu quả và an toàn. LEV trong mẫu thuốc và dịch sinh học có thể được xác định bằng phương pháp điện hóa [4], phương pháp trắc quang [5] và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [6-8]. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào xác định LEV trong mẫu thuốc và trong mẫu nước tiểu nhằm đánh giá sự đào thải kháng sinh LEV. Hơn nữa, việc định lượng LEV trong mẫu nước tiểu khó do nền mẫu phức tạp.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu phân tích và xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp HPLC định lượng LEV trong một số mẫu thuốc đang lưu hành ở Việt Nam và mẫu nước tiểu người bệnh sử dụng kháng sinh chứa LEV.



Hình 1: Công thức cấu tạo của Levofloxacin

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Chất chuẩn Levofloxacin của Viện kiểm nghiệm thuốc TW, theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam, độ tinh khiết 96,8%. Công thức hóa học $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ ($M = 361,368$), công thức cấu tạo là (S)-9-fluoro - 2,3 - dihydro - 3 - methyl - 10 - (4 - methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de] -1,4 - benzoxazine - 6 - cacboxylic axit (hình 1).

Các hóa chất khác và dung môi đều thuộc loại tinh khiết phân tích gồm: KH_2PO_4 , CH_3COONH_4 , $HCOOH$,

triethylamin (TEA), dicloromethan (Merck); CH_3COOH (VWR CHEMICALS); acetonitril (ACN), H_3PO_4 , methanol (MeOH), cloroform, etylacetat (Fisher).

Thiết bị HPLC-PDA-M10A (Shimadzu). Cột chiết pha rắn: C18 500 mg, 6ml; Water Oasis HLB, 6 ml; và Agilent Bond Elut PLEXA, 500 mg, 6 ml.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thuốc viên và thuốc nhỏ mắt lưu hành trên thị trường Hà Nội được thu thập ngẫu nhiên tại các cửa hàng thuốc. Mẫu nước tiểu thu thập của một số bệnh nhân được tiêm truyền Cravit hàm

lượng Levofloxacin là 750 mg/150 ml tại Trung tâm chống độc, Bệnh viện Bạch Mai.

2.3. Quy trình phân tích

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc 500 ppm: cân chính xác $0,0250 \pm 0,0001$ g LEV trên cân phân tích, hòa tan bằng nước deion trong cốc, rung siêu âm 15 phút, chuyển vào bình định mức 50,00 ml, định mức đến vạch bằng nước deion, lọc qua màng $0,45 \mu\text{m}$. Dung dịch được bảo quản ở 4°C và tránh ánh sáng.

Phân tích LEV trong mẫu dược phẩm:

Mẫu thuốc viên nén: cân 10 viên thuốc, xác định khối lượng trung bình 1 viên, nghiền mịn, trộn đều. Cân $\sim 0,05$ g thuốc trên cân phân tích, chuyển vào cốc, hòa tan bằng dung môi ACN, rung siêu âm 15 phút sau đó chuyển hỗn hợp vào bình định mức 25,00 ml, thêm ACN định mức đến vạch. Lọc dung dịch qua màng $0,45 \mu\text{m}$, pha loãng bằng pha động và phân tích trên HPLC.

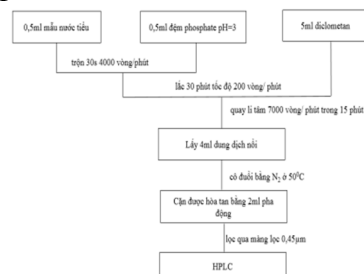
Mẫu thuốc nhỏ mắt: lấy 5 lọ thuốc nhỏ mắt levofloacin 5% đổ dồn vào 1 lọ sạch, xác định thể tích trung bình của 1 lọ, lắc trộn. Lấy chính xác 1,00 ml dung dịch thuốc nhỏ mắt chuyển vào bình định mức 25,00 ml và định mức bằng nước deion. Pha loãng bằng pha động trước khi phân tích.

Phân tích LEV trong mẫu nước tiểu:

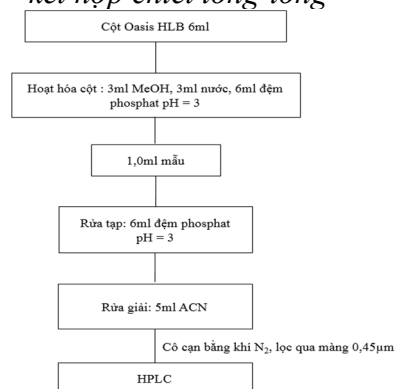
Chuẩn bị mẫu thử: lấy một thể tích xác

định dung dịch chuẩn gốc, bốc hơi dung môi (khí N_2 , 50°C) thu lấy cặn. Hòa tan cặn trong nước tiêu trắng. Sau đó thực hiện quy trình chiết lỏng-lỏng và lỏng rắn như mô tả ở sơ đồ hình 2 và 3.

Tất cả các mẫu được phân tích trên hệ thống HPLC với các điều kiện như ở bảng 1



Hình 2: Sơ đồ quy trình phân tích LEV trong mẫu nước tiểu bằng HPLC kết hợp chiết lỏng-lỏng



Hình 3: Sơ đồ quy trình phân tích LEV trong mẫu nước tiểu bằng HPLC kết hợp chiết pha rắn

Bảng 1: Điều kiện phân tích trên hệ thống HPLC-PDA-M10A- Shimadzu

Cột sắc ký	Shimp-pack MRC-ODS C18 (3,9 mm ID × 300 mm, 5µm – Shimadzu)
Bước sóng hấp thụ	295 nm
Pha động	ACN-đệm phosphate 20 mM pH=3,5 (30:70)
Chế độ rửa giải	Đẳng dòng
Tốc độ dòng	0,8 ml/phút
Thể tích bơm mẫu	20 µl

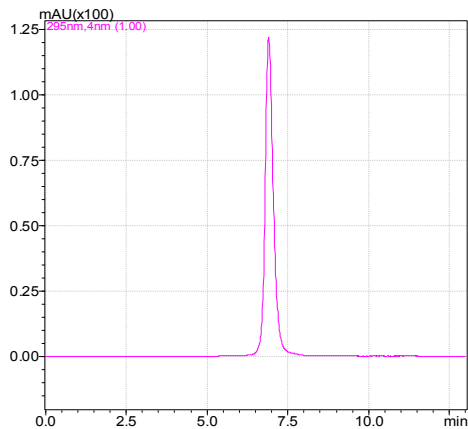
3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện phân tích

Các điều kiện phân tích được khảo sát

lựa chọn theo phương pháp đơn biến. Kết quả được trình bày ở bảng 1. Pic sắc ký của LEV thu được (hình 5) cân đối ở thời gian lưu $t_R = 6,8 \pm 0,3$ phút

phù hợp cho mục đích phân tích.



Hình 5: Sắc ký đồ khi phân tích LEV
([LEV] = 10 ppm)

với pha động ACN-đệm phosphat**3.2.**

Khảo sát lựa chọn các điều kiện chiết

LEV trong mẫu dược phẩm

Kết quả khảo sát dung môi chiết và thời gian siêu âm mẫu thuốc viên thể hiện ở bảng 2. LEV trong dược phẩm được chiết tốt nhất với dung môi ACN sau 15 phút rung siêu âm.

Bảng 2: Ảnh hưởng của các điều kiện chiết LEV trong mẫu dược phẩm

Chiết LEV trong thuốc viên		S _{pic}
Dung môi chiết	MeOH	6906495
	ACN	8716810 ✓
	H ₂ O	1605912
Thời gian siêu âm	10 phút	7877051
	15 phút	8716809 ✓
	20 phút	7875716
	30 phút	6782243

Bảng 3: Khảo sát lựa chọn điều kiện chiết lỏng-lỏng và chiết pha rắn LEV trong mẫu nước tiểu

Chiết lỏng-lỏng		H %	Chiết pha rắn		H %
Dung môi chiết	Diclorometan	87,0 ✓	Cột chiết	C18	78,7
	Cloroform	14,4		HBL	97,7 ✓
	Etylacetat	18,8		PLEXA	79,7
	Metanol/diclorometan (1:9)	96,1			
Tỷ lệ trộn mẫu:dung dịch đậm	3:1	74,5	Dung dịch rửa tạp	H ₂ O	82,4
	2:1	80,0		axit CH ₃ COOH, pH 3	89,9
	1:1	87,0 ✓		đệm phosphat, pH 3	93,3 ✓
	1:2	86,4		nước deion/MeOH (95:5)	53,2
	1:3	82,2		MeOH 5% và đệm phosphat pH 3 (1:1)	65,5
pH của dung dịch đậm	2.0	30,5	Dung dịch rửa giải	ACN	- ✓
	2.5	67,0		MeOH	-
	3.0	87,0 ✓		Diclorometan	-
	3.5	87,0		Cloroform	-
	4.0	57,0		Etylacetat	-

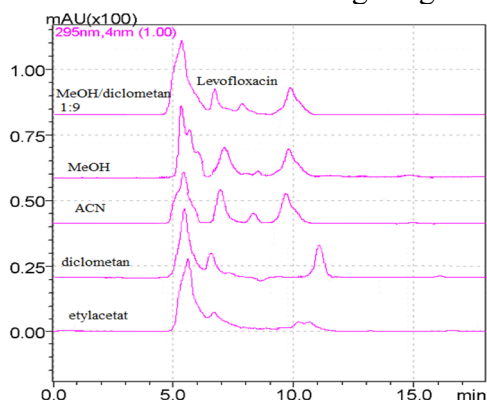
Chiết lỏng-lỏng		H %	Chiết pha rắn		H %
				Metanol/diclorometan (1:9)	-
Thể tích dung môi chiết	3 ml	63,9	Thể tích dung dịch rửa giải	3 ml	73,0
	4 ml	71,7		4 ml	83,8
	5 ml	87,0 ✓		5 ml	93,3 ✓
	6 ml	87,1		6 ml	93,3
				7 ml	93,4

3.3. Khảo sát quy trình chiết lỏng - lỏng

Kết quả khảo sát lựa chọn điều kiện chiết LEV trong mẫu nước tiểu thể hiện ở bảng 3. Yếu tố quang trọng nhất – dung môi chiết được lựa chọn là diclorometan (H ~ 87 %). Hỗn hợp dung môi MeOH/diclorometan (1:9 v/v) cho hiệu suất chiết cao nhất ~ 96 %, tuy nhiên, pic của LEV bị ảnh hưởng bởi nền mẫu. Quy trình chiết lỏng-lỏng tối ưu phân tích LEV được đưa ra như ở hình 2.

3.4. Khảo sát quy trình chiết pha rắn

Kết quả khảo sát lựa chọn điều kiện chiết pha rắn phân tích LEV trong mẫu nước tiểu thể hiện ở bảng 3. Hình 6 cho thấy, pic sắc ký của LEV thu được cân đối và có độ phân giải tốt nhất với dung dịch rửa giải là ACN. Từ đó, quy trình chiết pha rắn tối ưu phân tích LEV được đưa ra như ở hình 3. Nhận thấy, hiệu suất chiết LEV với cột chiết pha rắn HBL cao hơn so với chiết lỏng-lỏng.



Hình 6: Sắc ký đồ chiết pha rắn phân tích LEV ([LEV] = 10 ppm) với các dung dịch rửa giải khác nhau

3.5. Xác nhận giá trị sử dụng phương pháp phân tích Levofloxacin trong mẫu nước tiểu

3.5.1. Tính đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng (mẫu nước tiểu của người khỏe mạnh không dùng kháng sinh) và mẫu trắng thêm chuẩn ([LEV] = 10 ppm) theo quy trình phân tích đã khảo sát (hình 2 và hình 3). Kết quả hình 7 cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu trắng, tại vị trí tương ứng xuất hiện pic của LEV không thấy xuất hiện pic lạ. Như vậy, phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cao.

3.5.2. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

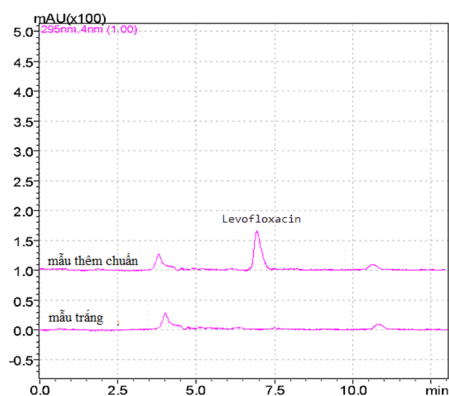
Kết quả xác định MDL, MQL khi phân tích LEV trong mẫu nước tiểu bằng phương pháp HPLC sau khi tiến hành chiết lỏng-lỏng và chiết pha rắn được trình bày ở bảng 4.

Tại nồng độ 5 ppm và 50 ppm, độ lặp lại của phép thử tốt với RSD < 1,3 % (n = 3), độ thu hồi của phép thử đạt từ 86,6 % - 94,1 %. Như vậy phương pháp phân tích có độ chính xác cao theo qui định của AOAC [3].

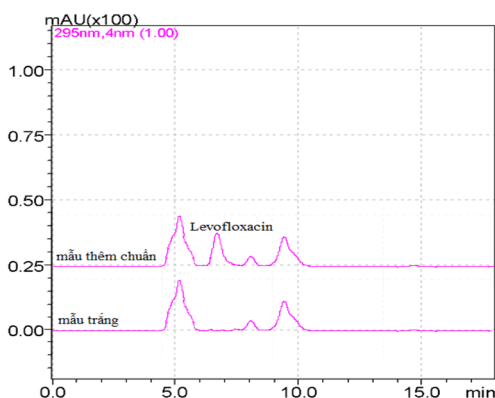
3.6. Phân tích Levofloxacin trong một số mẫu được phẩm và nước tiểu

3.6.1. Kết quả phân tích Levofloxacin trong mẫu được phẩm

Kết quả định lượng LEV trong 5 loại thuốc (bảng 5) cho thấy, sự sai khác giữa hàm lượng ghi trên nhãn và hàm lượng chất phân tích tìm thấy tương đối nhỏ (< 6%). Như vậy, quy trình phân tích có thể được áp dụng để xác định hàm lượng LEV trong được phẩm.



(a)



(b)

Hình 7: Sắc ký đồ của mẫu trắng và mẫu trắng thêm chuẩn ($[LEV] = 10\text{ppm}$) khi tách chất bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng (a) và chiết pha rắn (b).

Bảng 4: Phương trình đường chuẩn, MDL, MQL và khoảng tuyến tính phân tích LEV trong mẫu nước tiểu

Phương pháp xử lý mẫu	Phương trình đường chuẩn ^a	Hệ số tương quan (R^2)	MDL (ppm)	MQL (ppm)	Khoảng tuyến tính (ppm)
Chiết lỏng-lỏng	$Y = 213650X - 454,22$	0,9998	0,03	0,10	0,10 – 20
Chiết pha rắn	$Y = 207778X + 26100$	0,9999	0,03	0,09	0,09 – 100

^a Y: diện tích pic; X: nồng độ LEV (ppm)

Bảng 5: Kết quả phân tích một số mẫu thuốc chứa LEV trên thị trường

Tên thuốc	Xuất xứ	Hàm lượng ghi trên nhãn	Hàm lượng phân tích	Sai khác (%)
CHONCYLOX	Ấn Độ	500 mg/ viên	$493,24 \pm 4,57$ mg/viên	1,36
STADA	Việt Nam		$474,92 \pm 6,78$ mg/viên	5,02
LEVOX	Việt Nam		$480,68 \pm 5,71$ mg/viên	3,86
Dược TW3	Việt Nam		$481,15 \pm 8,05$ mg/viên	3,76
Eylevox	Hàn Quốc	5 mg/ml	$4,91 \pm 0,06$ mg/ml	1,38

3.6.2. Kết quả phân tích Levofloxacin trong mẫu nước tiểu bệnh nhân

Bảng 8 trình bày kết quả xác định LEV trong mẫu nước tiểu. Nhận thấy rằng, phương pháp phân tích HPLC kết hợp với chiết lỏng-lỏng hoặc chiết pha rắn cho kết quả tương đồng. Tuy nhiên, do độ thu hồi của HPLC kết hợp chiết pha rắn tốt hơn nên hàm lượng LEV thu

được cao hơn. Mặt khác, kết quả phân tích chỉ ra rằng, tùy từng bệnh nhân và thời gian lấy mẫu sau khi truyền hàm lượng LEV đào thải qua nước tiểu là khác nhau. Do đó dựa trên việc định lượng LEV, từng trường hợp bệnh nhân cụ thể sẽ nhận được phác đồ điều trị kháng sinh phù hợp, hiệu quả và an toàn.

Bảng 6: Kết quả phân tích LEV trong một số mẫu nước tiểu bệnh nhân

STT	Tên bệnh nhân	Giờ lấy mẫu sau khi truyền (h)	Kết quả phân tích (ppm)	
			HPLC chiết lỏng-lỏng	HPLC chiết pha rắn
1	Nguyễn Văn A	10	33,06 ± 0,08	34,68 ± 0,13
2	Phạm Văn C	10	34,90 ± 0,12	36,12 ± 0,07
3	Chu Văn D	12	30,68 ± 0,11	34,02 ± 0,07
4	Nguyễn Huy H	4	61,30 ± 0,09	65,56 ± 0,10
5	Phạm Thu Q	8	31,66 ± 0,10	32,46 ± 0,09

4. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu xây dựng được quy trình chiết phân tích LEV trong mẫu dược phẩm và nước tiểu người trên thiết bị HPLC. Phương pháp phân tích có độ chọn lọc và độ chính xác cao với hiệu suất thu hồi đạt ~ 87 – 94 %. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,03 ppm với độ lệch chuẩn tương đối RSD < 1,3 % (n = 3). Đã áp dụng quy trình phân tích LEV cho một số mẫu dược phẩm trên thị trường và mẫu nước tiểu của bệnh nhân sử dụng thuốc tiêm truyền. Kết quả phân tích mẫu dược phẩm sai khác với hàm lượng ghi trên nhãn là thấp (<6%). Lượng LEV đào thải qua nước tiểu tùy thuộc vào từng bệnh nhân và thời điểm lấy mẫu. Các mẫu lấy sau 4 – 10 h tiêm truyền Cravit (750 mg/150 ml) có hàm lượng LEV dao động từ 30 – 65 ppm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dược điển Việt Nam IV (2009), nhà xuất bản Y học, Hà Nội, PL 9.6.
2. Hướng dẫn sử dụng thuốc LEFVOX. Ngày sản xuất 08/2015, Lô 15008, Công ty TNHH DP Đạt Vi Phú, Việt Nam.
3. Trần Cao Sơn (2010), Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học & vi sinh vật, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
4. A.Radi, Z. El - Sherif (2002), Determination of levofloxacin in human

urine by adsorptive square - wave anodic stripping voltammetry on a glassy carbon electrode, *Talanta*, 58, 319-324.

5. Juan Antonio Ocaña González, Manuel Callejón Mochón, Francisco José Barragán dela Rosa (2000), Spectrofluorimetric determination of levofloxacin in tablets, human urine and serum, *Talanta*, 52, 49-56.

6. FA Wong, SJ Juzwin, SC Flor (1996), Rapid stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 765-71.

7. Hanwen Sun, Hongliu Wang, Xusheng Ge and Xiaolan Qin (2011), Simultaneous determination of the combined drugs of ceftriaxone sodium, metronidazole, and levofloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography, *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 26, 216-225.

8. Xinxing Gao, Guocan Yao, Na Guo, Fang An, Xingjie Guo, (2007), A simple and rapid high performance liquid chromatography method to determine levofloxacin in human plasma and its use in a bioequivalence study, *Drug Discov Ther*, 1 (2), 136-140.