

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG THUỐC BỘT PHA TIÊM CEFMETAZOL BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC) DÙNG ĐẦU DÒ PHOTODIODE ARRAY (PDA)

Mai Thanh Nhân*, Nguyễn Thị Thu Thảo

Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*Email: mtnhan@ntt.edu.vn

Ngày nhận bài: 13/9/2021; Ngày chấp nhận đăng: 07/3/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu hướng đến mục tiêu là xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định lượng được chất Cefmetazol trong thuốc bột pha tiêm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sử dụng đầu dò PDA. Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột HiQ Sil C18HS 4,6 mm (I.D) x 25 mm (L), 5 μ m, phát hiện bằng đầu dò diode quang (PDA) ở bước sóng 214 nm. Quá trình rửa giải đẳng dòng với tốc độ dòng 2 mL/phút. Mẫu được hòa tan trong thành phần pha động là dung dịch đệm acid phosphoric pH 4,5 $\pm$ 0,1. Quy trình phân tích đã xây dựng được thẩm định theo hướng dẫn của Thông tư 32/2018/TT-BYT về quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc. Kết quả định lượng thuốc bột pha tiêm Cefmetazol thu được khoảng nồng độ tuyến tính của phương pháp đạt từ 0,1-0,5 mg/mL. Độ đúng của phương pháp được xác định bằng tỷ lệ phục hồi trong khoảng 99,02-100,61%. Độ lặp lại có %RSD = 0,22%. Quy trình phân tích đạt chỉ tiêu tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác. Vì thế, có thể ứng dụng quy trình phân tích này trong việc kiểm soát chất lượng thường quy của Cefmetazol trong dược phẩm thuốc bột pha tiêm.

Từ khóa: Cefmetazol, HPLC, thẩm định quy trình.

1. GIỚI THIỆU

Cefmetazol là một Cephamycin kháng khuẩn thường được phân loại chung với các Cephalosporin thế hệ thứ hai. Tác dụng diệt khuẩn của thuốc là ức chế quá trình tổng hợp thành tế bào vi khuẩn. Cefmetazol có phổ tác dụng rộng, gồm nhiều chủng vi khuẩn Gram âm và Gram dương hiếu khí và kỵ khí như: *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Proteus vulgaris*, *Bacteroides fragilis*,... Cefmetazol được chỉ định cho các nhiễm khuẩn do các vi khuẩn còn nhạy cảm với thuốc như: Nhiễm khuẩn thứ phát của viêm bàng quang, viêm thận, bể thận, viêm phúc mạc, viêm túi mật, viêm đường mật, viêm tuyến Bartholin và phần phụ, nhiễm khuẩn tử cung, viêm kết mạc, viêm mô quanh xương hàm, viêm xương hàm [1, 2]. Chính vì tầm quan trọng của thuốc trong việc điều trị bệnh nên để đánh giá chất lượng thuốc, kiểm nghiệm thuốc phải nghiêm ngặt tránh tình trạng thuốc giả hoặc dùng quá liều bằng cách đối chiếu kết quả thu được với các chỉ tiêu trong tiêu chuẩn quy định. Định lượng thuốc bột pha tiêm Cefmetazol gồm các chỉ tiêu chất lượng là tính chất bột màu trắng, đóng trong lọ thủy tinh, đầy kín bằng nút cao su và niềng nhôm, độ đồng đều khối lượng đạt tiêu chuẩn của USP 43, pH từ 4,2 - 6,2, hàm lượng nước không quá 0,5%, giới hạn tiêu phân không nhìn thấy bằng mắt thường gồm tiểu phân kích thước $\geq$ 10 μ m (không được quá 6000/1 lọ) và tiểu phân kích thước $\geq$ 25 μ m (không được quá 600/1 lọ), định tính chế phẩm

phải có sự có mặt của Cefmetazol dựa vào thời gian lưu của thử so với chuẩn, định lượng hàm lượng Cefmetazol trong mỗi lọ phải đạt từ 90-120% so với hàm lượng nhãn (900-1200 mg) [3].

Theo các tài liệu nghiên cứu, các phương pháp phân tích khác nhau được dùng để xác định hàm lượng Cefmetazol như định lượng Cefmetazol trong thuốc tiêm bằng sắc ký loại cỡ HPSEC (High - performance size - exclusion), hoặc xác định đồng thời hàm lượng vết của Cefmetazol và Cefpodoxim Proxetil bằng sắc ký khối phổ ghép với đầu dò hệ ba tứ cực (LC-MS/MS) [4, 5]. Tuy nhiên, Cefmetazol là hợp chất phân cực mạnh ($\text{Log}_{K_{O/W}} = -0,6$) và yêu cầu định lượng hàm lượng Cefmetazol trong mỗi lọ phải đạt từ 90-120% so với hàm lượng nhãn (900-1200 mg) nên ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC) để định lượng. Sắc ký lỏng thường sử dụng nhất trong định lượng riêng lẻ các chất trong hỗn hợp phức tạp của dịch chiết được liệu khi so sánh diện tích đỉnh với chất chuẩn trong cùng điều kiện phân tích. Phương pháp này còn có thể dễ dàng phân tích các chất trong hỗn hợp ở mức mg/L tới mg/mL và sử dụng đầu dò PDA, các điốt (diode) đóng vai trò là các phần tử dò giúp cho việc theo dõi đồng thời các hợp chất hấp thụ ở các bước sóng khác nhau và đầu dò này có thể ghi nhận cùng lúc độ hấp thụ của cả dãy sóng (array) nên sắc ký đồ thu được có dạng 3D (với 3 trục là thời gian lưu, độ hấp thụ và bước sóng) nên phù hợp với yêu cầu phân tích Cefmetazol [6]. Chính vì thế, tác giả tiến hành thực hiện đề tài: *“Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định lượng thuốc bột pha tiêm Cefmetazol bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sử dụng đầu dò PDA”* với mục tiêu thực hiện thẩm định lại quy trình định lượng Cefmetazol theo tiêu chuẩn Dược điển USP để phù hợp với đối tượng mẫu là thuốc bột pha tiêm và điều kiện phòng thí nghiệm, từ đó cung cấp dữ liệu cho việc áp dụng quy trình phân tích này tại các cơ sở sản xuất dược phẩm trong nước.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

Cefmetazol chuẩn: Độ tinh khiết 94,20% (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.HCM)

Cefmetazol thử: Thuốc bột pha tiêm chứa hoạt chất Cefmetazol, khối lượng 1 g

Thiết bị và dụng cụ

Máy sắc ký lỏng Shimadzu LC - 20A sử dụng đầu dò photodiode array (PDA)

Bộ lọc chân không Glassco

Màng lọc 0,45 μm Syringe Millex - HV Filter Uni

Máy siêu âm Daihan Labtech LUC - 420 có tần số: 40 kHz, công suất 700 W

Máy đo pH điện cực thủy tinh Mettler Toledo S220 - K có độ chính xác: $\pm 0,002$

Cân phân tích chính xác đến 0,0001 g GS Shinko GS - 623W

Bình định mức 10 mL (có độ chính xác 0,025 mL), 20 mL (có độ chính xác 0,04 mL), 100 mL (có độ chính xác 0,10 mL)

Pipet bầu 1 mL (có độ chính xác 0,008 mL), pipet bầu 2 mL (có độ chính xác 0,01 mL), pipet bầu 3 mL (có độ chính xác 0,01 mL), pipet bầu 5 mL (có độ chính xác 0,01 mL), pipet bầu 10 mL (có độ chính xác 0,02 mL)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

Cột: HiQ Sil C18HS 4,6 mm (I.D) x 25 mm (L), 5 μm

Đầu dò PDA của hãng Shimadzu với model LC - 20 A Series: 214 nm

Tốc độ dòng: 2 mL/phút

Thể tích tiêm: 20 μ L

Nhiệt độ cột: 40 °C

Thành phần pha động: Hòa tan 5,75 g monobasic ammonium phosphate trong 700 mL, thêm 3,2 mL dung dịch tetrabutylamonium hydroxide 40%, 280 mL methanol, 25 mL tetrahydrofuran và trộn đều. Điều chỉnh pha động về pH $4,5 \pm 0,1$ bằng acid phosphoric, lọc qua màng lọc Milipore 0,45 μ m và khử khí bằng cách siêu âm.

Dung dịch chuẩn được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng 50 mg Cefmetazol chuẩn vào bình định mức 50 mL, hoà tan và pha loãng bằng pha động đến vạch, trộn đều. Hút 2 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng với pha động đến vạch và trộn đều. Lọc qua màng lọc milipore 0,45 μ m.

Dung dịch thử chuẩn bị gồm cân và tính khối lượng trung bình của 20 lọ. Sau đó, lấy 6 lọ để đi phân tích thực hiện bằng cách hoà tan lượng bột trong 1 lọ với 10 mL nước cất và lắc đều để hoà tan. Sau đó, dùng xi lanh hút hết tất cả dung dịch thuốc trong lọ cho vào bình định mức 100 mL, pha loãng và định mức tới vạch bằng pha động. Hút chính xác 1 mL dung dịch này cho vào bình định mức 50 mL, định mức tới vạch bằng pha động, lọc qua màng lọc milipore 0,45 μ m.

2.2.2. Khảo sát tính tương thích hệ thống

Thăm định tính tương thích hệ thống nhằm đảm bảo hệ thống máy sắc ký đủ độ tin cậy để tiến hành phân tích. Các thử nghiệm được dựa trên các yếu tố về thiết bị vận hành phân tích và các mẫu đưa vào phân tích tạo thành hệ thống tương thích với nhau.

Thực hiện trên một mẫu chuẩn có nồng độ 0,2 mg/mL được pha theo quy trình định lượng.

Tiêm lặp 6 lần liên tiếp dung dịch chuẩn có nồng độ 0,2 mg/mL vào hệ thống sắc ký.

Yêu cầu:

Số đĩa lý thuyết $N \geq 1250$ đĩa.

Hệ số kéo đuôi peak Cefmetazol $0,94 \leq A_s \leq 1,60$.

%RSD ($n = 6$) của diện tích peak $< 2,0 \%$ [7, 8].

2.2.3. Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu hay tính chọn lọc của một quy trình phân tích là khả năng cho phép xác định chính xác và đặc hiệu chất cần phân tích mà không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của chất khác (tạp chất, sản phẩm phân hủy,...) có trong mẫu thử. Để đảm bảo tính đặc hiệu của mẫu thử, cần khẳng định dựa vào kết quả dương tính với mẫu thử, bằng cách so sánh thời gian lưu của chất chuẩn với chất phân tích (mẫu thử) và kết quả âm tính đối với mẫu không có chất thử và đồng thời, dựa vào so sánh hình dạng phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử.

Mẫu chuẩn: Pha dung dịch chuẩn theo quy trình định lượng. Tiêm lặp dung dịch chuẩn 6 lần.

Mẫu thử: Pha 6 mẫu thử. Tiêm dung dịch thử vào hệ thống sắc ký, mỗi mẫu tiêm 3 lần.

Mẫu trắng: Thành phần là pha động.

Yêu cầu:

Phương pháp có tính đặc hiệu khi sắc ký đồ mẫu trắng không cho peak tại vị trí tương ứng với Cefmetazol trong sắc ký đồ mẫu chuẩn và thử và so sánh hình dạng phổ UV của mẫu chuẩn và mẫu thử phải có sự tương đồng.

2.2.4. Khoảng tuyến tính

Mục đích của khảo sát là tìm khoảng làm việc tuyến tính của chất phân tích có độ tin cậy cao đối với quy trình phân tích.

Cân khoảng ($50 \pm 10\%$) mg (53,9 mg) Cefmetazol vào bình định mức 50 mL, thêm pha động, lắc (hoặc đánh siêu âm) cho tan hoàn toàn và định mức tới vạch. Lấy 1 bình định mức 20 mL và 6 bình định mức 10 mL. Hút chính xác 1 mL vào bình định mức 20 mL và lần lượt lấy chính xác 1; 2; 3; 4; 5; 8 mL vào bình định mức 10 mL, thêm pha động, lắc (hoặc đánh siêu âm) cho tan hoàn toàn và định mức tới vạch, lọc qua giấy lọc milipore 0,45 μm . Các dung dịch chuẩn có nồng độ tương ứng là 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 0,5; 0,8; 1 mg/mL. Mỗi nồng độ tiêm 3 lần, lấy kết quả trung bình và vẽ đồ thị.

Yêu cầu:

Khảo sát sự tương quan giữa đại lượng y (diện tích đỉnh) và x (nồng độ), hệ số tương quan trong khoảng giá trị $0,99 \leq R^2 \leq 1$ [7, 8].

Sử dụng phân tích hồi quy với trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy và trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy.

2.2.5. Độ đúng

Xác định độ đúng của quy trình phân tích thực hiện bằng cách chuẩn bị 9 mẫu thử theo quy trình định lượng: Thêm dung dịch chuẩn vào mẫu thử và xác định lại nồng độ của chất chuẩn có trong mẫu được thực hiện trên 3 nồng độ Cefmetazol là 20%; 30%; 40% (so với nồng độ lý thuyết).

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng ($50 \pm 10\%$) mg (53,9 mg) Cefmetazol chuẩn vào bình định mức 50 mL, hoà tan, pha loãng bằng pha động đến vạch và trộn đều được dung dịch có nồng độ 1 mg/mL.

Độ đúng 20% (so với nồng độ lý thuyết): Hoà tan lượng bột trong 1 lọ với 10 mL nước cất. Lắc đều để hoà tan. Dùng xi lanh hút hết tất cả dung dịch thuốc trong lọ cho vào bình định mức 100 mL, pha loãng bằng pha động vừa đủ thể tích. Hút chính xác 1 mL dung dịch này và 2 mL dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung pha động vừa đủ đến vạch và trộn đều. Lọc qua màng lọc milipore 0,45 μm .

Độ đúng 30% (so với nồng độ lý thuyết): Hoà tan lượng bột trong 1 lọ với 10 mL nước cất. Lắc đều để hoà tan. Dùng xi lanh hút hết tất cả dung dịch thuốc trong lọ cho vào bình định mức 100 mL, pha loãng bằng pha động vừa đủ thể tích. Hút chính xác 1 mL dung dịch này và 3 mL dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung pha động vừa đủ đến vạch và trộn đều. Lọc qua màng lọc milipore 0,45 μm .

Độ đúng 40% (so với nồng độ lý thuyết): Hoà tan lượng bột trong 1 lọ với 10 mL nước cất. Lắc đều để hoà tan. Dùng xi lanh hút hết tất cả dung dịch thuốc trong lọ cho vào bình định mức 100 mL, pha loãng bằng pha động vừa đủ thể tích. Hút chính xác 1 mL dung dịch này và 4 mL dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung pha động vừa đủ đến vạch và trộn đều. Lọc qua màng lọc milipore 0,45 μm .

Tiêm 20 μL các dung dịch độ đúng 20%; 30%; 40% vào hệ thống sắc ký, mỗi mẫu tiêm 3 lần.

Yêu cầu:

% Tỷ lệ phục hồi phải trong khoảng 98,0 - 102,0% [7, 8].

% Tỷ lệ phục hồi được tính theo công thức:

$$\frac{M - m_M}{m_T} \times 100\%$$

Trong đó:

m_M : Lượng của thành phần định lượng có trong mẫu (suy từ lượng mẫu và hàm lượng đã được xác định)

m_T : Lượng thêm vào (suy từ khối lượng cân và hàm lượng trên nhãn của chất đối chiếu).

M: Kết quả định lượng hỗn hợp trên.

2.2.6. Độ chính xác

Độ chính xác được khảo sát trong các điều kiện giống nhau (phương pháp, phòng thí nghiệm, người phân tích, dụng cụ).

Tiến hành pha 6 dung dịch mẫu thử và tiêm vào hệ thống HPLC theo quy trình định lượng, tính hàm lượng Cefmetazol có trong mẫu.

Yêu cầu:

Độ lệch chuẩn tương đối cho hàm lượng hoạt chất phải không quá 2,0% [7, 8].

2.2.7. Phân tích, xử lý số liệu

Phương pháp tiến hành thẩm định khoảng tuyến tính tiến hành thực nghiệm để xác định các giá trị đo được A (diện tích đỉnh) theo C (nồng độ) [9].

Để khảo sát tính tuyến tính: Tiến hành tối thiểu 5 mức nồng độ khác nhau, đo và xác định độ đáp ứng của đại lượng đo (diện tích đỉnh) theo từng nồng độ bằng cách thiết lập phương trình hồi quy và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa tính hiệu đáp ứng (diện tích đỉnh) theo nồng độ.

Đánh giá tính tuyến tính bằng cách:

Quan sát đường biểu diễn của tín hiệu đáp ứng (diện tích) theo nồng độ và xác định bằng phương pháp thống kê thích hợp dựa vào tương quan hồi quy: $A = aC + b$ (a: Độ dốc, b: Tung độ gốc).

Sử dụng phân tích hồi quy với trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy và trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy.

Trắc nghiệm thống kê: Trắc nghiệm t (phân phối Student):

Giả thuyết:

$H_0: B_j = 0$ “Hệ số B_j không có ý nghĩa thống kê”

$H_A: B_j \neq 0$ “Hệ số B_j có ý nghĩa thống kê”

Giá trị thống kê: $t = \frac{B}{S_b}$

Biện luận:

Nếu $t_0 < t_{0,05} (N - 2)$ suy ra chấp nhận giả thuyết H_0

Nếu $t_0 > t_{0,05} (N - 2)$ suy ra chấp nhận giả thuyết H_A , ($t_{0,05} = \text{TINV} (0,05, \gamma)$, với $\gamma = N - 2$)

Trắc nghiệm F (phân phối Fisher):

Giả thuyết:

$H_0: B_j = 0$ “Phương trình hồi quy không tương thích”.

$H_A: B_j \neq 0$ “Phương trình hồi quy tương thích”.

Giá trị thống kê $F = \frac{S_f^2}{S_r^2}$

S_f^2 : Phương sai của yếu tố khảo sát

S_r^2 : Phương sai của yếu tố ngẫu nhiên

Biện luận:

Nếu $F < F_{0,05}$ suy ra chấp nhận giả thuyết H_0

Nếu $F > F_{0,05}$ suy ra chấp nhận giả thuyết H_A ($F_{0,05} = \text{FINV}(0,05, \gamma_1, \gamma_2)$, $\gamma_1 = k$, $\gamma_2 = N - k - 1$)

So sánh độ chính xác của hai dãy thí nghiệm: So sánh độ chính xác của hai dãy số liệu, sử dụng F test bằng cách thiết lập tỉ số về phương sai của hai phương pháp:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} (F > 1)$$

Biện luận:

Nếu $F(tn) < F(It)$ thì độ chính xác của hai dãy thí nghiệm là đồng nhất hoặc hai phương pháp hay hai người làm là tương đương.

Nếu $F(tn) > F(It)$ thì độ chính xác của hai dãy thí nghiệm là không đồng nhất.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống khi tiêm lặp 6 lần dung dịch chuẩn Cefmetazol có nồng độ 0,2 mg/mL vào hệ thống máy sắc ký lỏng, sau đó ghi nhận lại hình dạng và kết quả sắc ký đồ được thể hiện ở Bảng 1:

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

STT	Thời gian lưu	Diện tích đỉnh (mAu)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số kéo đuôi	Hệ số phân giải
1	7,403	3204000	7104,9	1,094	14,102
2	7,409	3207539	7119,1	1,096	14,087
3	7,408	3206107	7113,0	1,096	14,096
4	7,402	3204521	7091,5	1,098	14,085
5	7,404	3200611	7092,1	1,098	14,105
6	7,406	3195938	7095,5	1,098	14,118
TB	7,405	3203119,3	7102,7	1,097	14,099
%RSD	0,04	0,13	0,16	0,15	0,09

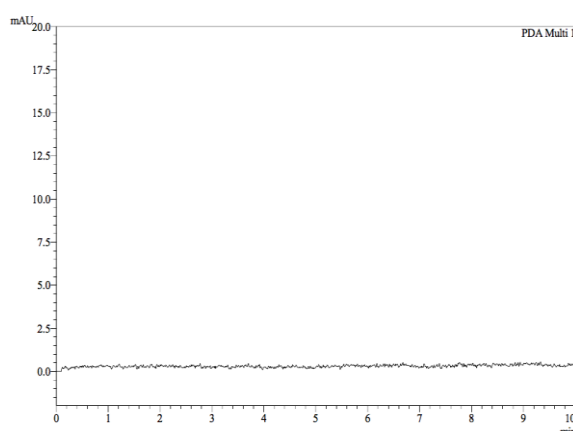
Nhìn vào kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống ở Bảng 1 cho thấy % độ lệch chuẩn tương đối thời gian lưu và diện tích đỉnh có %RSD = 0,04 và 0,13 (< 2,0 %). Hệ số kéo đuôi của các peak sắc ký khoảng 1,094-1,098 (khoảng chấp nhận $0,94 \leq A_s \leq 1,60$), số đĩa lý thuyết là 7102,7 (≥ 1250 đĩa). Như vậy, phương pháp đạt về tính tương thích hệ thống.

3.2. Tính đặc hiệu

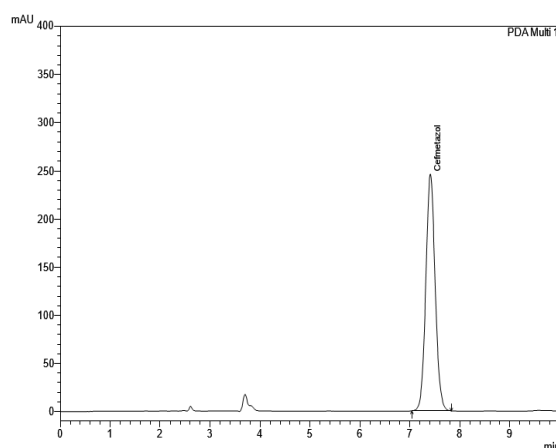
Tiêm riêng biệt dung dịch mẫu trắng, chuẩn, thử vào hệ thống. Thực hiện 6 lần, sau đó ghi nhận lại sắc ký đồ. Kết quả cho thấy, trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện peak sắc ký, sắc ký đồ giữa mẫu thử và mẫu chuẩn cho peak sắc ký tương ứng với thời gian lưu (Bảng 2).

Bảng 2. Giá trị thời gian lưu mẫu chuẩn và mẫu thử

STT	Thời gian lưu của mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu của mẫu thử (phút)
1	7,403	7,418
2	7,409	7,417
3	7,408	7,421
4	7,402	7,413
5	7,404	7,420
6	7,406	7,422
TB	7,405	7,418
%RSD	0,038	0,046

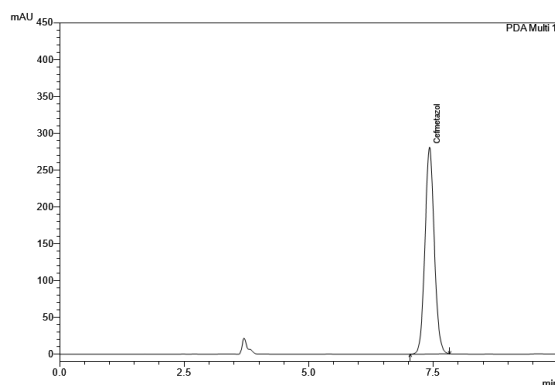


Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng

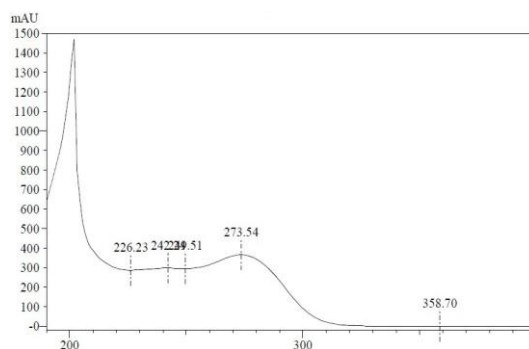


Hình 2. Sắc ký đồ Cefmetazol chuẩn tại nồng độ 0,2031 mg/mL

Điều kiện sắc ký: Cột pha đảo (HIQ Sil C18HS 4,6 mm (I.D), 5 μ m); Bước sóng phát hiện 214 nm; Tốc độ dòng 2 mL/phút; Thể tích tiêm: 20 μ L; Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}$ C; Pha động gồm 5,75 g monobasic ammonium phosphate trong 700 mL H₂O, 3,2 mL tetrabutylammonium hydroxide 40%, 280 mL methanol, 25 mL tetrahydrofuran và trộn đều. Điều chỉnh pha động về pH 4,5 $\pm$ 0,1 bằng acid phosphoric.

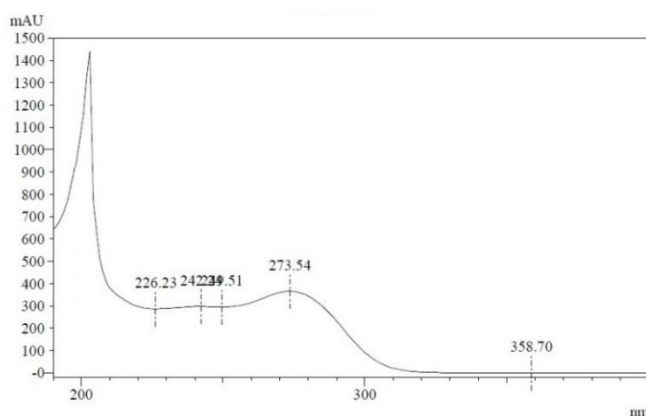


Hình 3. Sắc ký đồ Cefmetazol thử



Hình 4. Phổ chuẩn UV của Cefmetazol tại nồng độ 0,2031 mg/mL

Dung dịch chuẩn được hòa tan trong thành phần pha động gồm 5,75 g monobasic ammonium phosphate trong 700 mL H₂O, 3,2 mL tetrabutylamonium hydroxide 40%, 280 mL methanol, 25 mL tetrahydrofuran và trộn đều. Điều chỉnh pha động về pH $4,5 \pm 0,1$ bằng acid phosphoric.



Hình 5. Phổ thử UV của Cefmetazol

Trên sắc ký đồ HPLC mẫu chuẩn và mẫu thử có peak Cefmetazol tách hoàn toàn các pic khác và dung dịch thử xuất hiện một peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của mẫu chuẩn là 7,4 phút. Mẫu trắng (thành phần pha động) không có peak ở vị trí này.

Phổ tử ngoại (UV) tại thời gian lưu của peak Cefmetazol trong mẫu thử giống phổ UV tại thời gian lưu của peak Cefmetazol trong mẫu chuẩn. Như vậy, phương pháp HPLC khảo sát đạt về chỉ tiêu tính đặc hiệu.

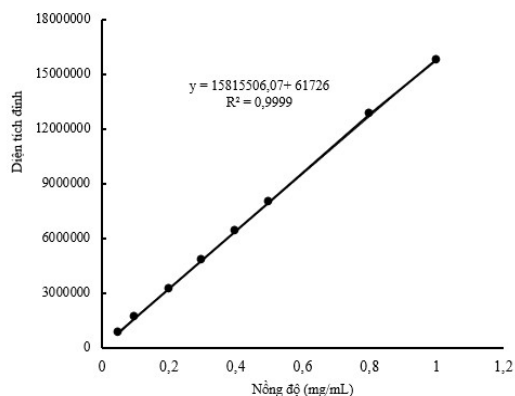
3.3. Khoảng tuyến tính

Khảo sát khoảng tuyến tính bằng cách tiến hành sắc ký 8 mức nồng độ khác nhau, đo và xác định diện tích đỉnh ở từng nồng độ, thiết lập phương trình hồi quy và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích đỉnh và nồng độ được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Giá trị diện tích đỉnh theo nồng độ của Cefmetazol

Nồng độ Cefmetazol (mg/mL)	Diện tích đỉnh (mAu)			TB
0,05	828405	828345	827339	828029,8
0,1	1656801	1656642	1654699	1656047,3
0,2	3204000	3207539	3206107	3205882,0
0,3	4793261	4788849	4786640	4789583,3
0,4	6403445	6405492	6404215	6404384,0
0,5	7995378	7986545	7985632	7989185,0
0,8	12806978	12810974	12808558	12808836,7
1,0	15768010	15766420	15846990	15793806,7

Xây dựng đường chuẩn $A = aC + b$ (Hình 6), trong đó: (C) biểu thị nồng độ Cefmetazol, (A) là diện tích đỉnh trung bình mỗi mẫu chuẩn.



Hình 6. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích đỉnh và nồng độ của Cefmetazol

Đánh giá tính tuyến tính của Cefmetazol bằng cách sử dụng trắc nghiệm Student (t) để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số và trắc nghiệm F (phân phối Fischer) để chứng minh là có tính tương thích trong phương trình hồi quy. Qua trắc nghiệm F, phương trình hồi quy chứng minh có tính tương thích với $F = 65874,43 > F_{0,05} = 10,12$ và qua trắc nghiệm t, hệ số a (độ dốc) có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 256,66 > t_{0,05} = 2,45$), hệ số b (tung độ gốc) không có ý nghĩa thống kê nên bị loại ($t = 1,91 < t_{0,05} = 2,45$). Vậy phương trình hồi quy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích đỉnh trong khoảng nồng độ từ 0,05 đến 1,0 mg/mL với $R^2 = 0,9999$ (yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$). Nhằm mục đích mở rộng khoảng nồng độ tuyến tính nên khảo sát từ 0,05 đến 1,0 mg/mL để biết khả năng của phương pháp. Do quy trình áp dụng định lượng Cefmetazol trong thuốc bột pha tiêm có nồng độ khoảng 0,2 mg/mL và khoảng nồng độ của độ đúng từ 0,24-0,28 mg/mL, được thực hiện bằng cách thêm chính xác khoảng 20%; 30%; 40% tương ứng Cefmetazol chuẩn vào mẫu thử nên chỉ sử dụng đường chuẩn trong một khoảng nồng độ hẹp từ 0,1-0,5 mg/mL.

3.4. Độ đúng

Thêm chuẩn Cefmetazol vào mẫu thử và xác định nồng độ có trong mẫu. Thực hiện trên 3 nồng độ Cefmetazol là 20%, 30%, 40% (so với nồng độ lý thuyết), mỗi nồng độ thực hiện 3 lần với cách tiến hành tương tự và xác định lại lượng hoạt chất Cefmetazol có trong mẫu. Kết quả được trình bày ở Bảng 4 như sau:

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

Độ đúng	Nồng độ có sẵn (mg/mL)	Nồng độ thêm vào (mg/mL)	Diện tích đỉnh (mAu)	Nồng độ tìm thấy (mg/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)
20%	0,214	0,0406	4011572,00	0,254	99,02
	0,214	0,0406	4007715,33	0,254	99,22
	0,201	0,0406	3807476,00	0,241	99,82
30%	0,214	0,0609	4334618,33	0,275	100,17
	0,213	0,0609	4331580,33	0,275	100,61
	0,208	0,0609	4234589,67	0,268	99,35
40%	0,213	0,0812	4651137,67	0,295	100,54
	0,214	0,0812	4661390,00	0,296	100,34
	0,213	0,0812	4640516,33	0,294	100,31
Trung bình					99,79
%RSD					0,55

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp định lượng Cefmetazol có % tỷ lệ độ phục hồi của 9 mẫu trong khoảng 99,02-100,61% và nằm trong khoảng yêu cầu 98-102,0%. Đồng thời, giá trị %RSD = 0,55 < 2,0%. Như vậy, quy trình định lượng đạt về độ đúng.

3.5. Độ chính xác

Tiến hành trên 6 mẫu thử, mỗi mẫu tiêm 3 lần. Xác định diện tích đỉnh trung bình, từ đó xác định hàm lượng %Cefmetazol có trong mẫu. Kết quả hàm lượng %Cefmetazol trong mẫu so với hàm lượng ghi nhãn (1 g) được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Hàm lượng Cefmetazol có trong mẫu

STT	Lượng cân thử (mg)	Diện tích đỉnh (mAu)	Hàm lượng (mg)	Hàm lượng % so với hàm lượng nhãn	Số liệu thống kê
Mẫu 1	1115,6	3383422,7	1072,64	100,50	n = 6 X _{tb} = 100,8% SD = 0,22 %RSD = 0,22% $\epsilon = \pm 0,23$ (với t = 2,57 tại P = 95% và n = 6) Khoảng tin cậy: $\mu = 100,8\% \pm 0,23$
Mẫu 2	1105,6	3369389,3	1068,19	100,99	
Mẫu 3	1031,6	3129594,0	992,17	100,53	
Mẫu 4	1025,9	3127350,3	991,46	101,02	
Mẫu 5	1121,5	3410783,0	1081,31	100,78	
Mẫu 6	1036,5	3149528,0	998,49	100,70	

Áp dụng quy trình phân tích để xác định hàm lượng hoạt chất Cefmetazol trong thuốc bột pha tiêm đang lưu hành trên thị trường.

Xử lý mẫu và phân tích 6 mẫu thử độc lập, lặp lại trong 2 ngày. Hàm lượng Cefmetazol (so với nhãn) đạt yêu cầu theo USP 43.

Biểu thị kết quả áp dụng phương pháp để định lượng Cefmetazol trong mẫu thử được tiến hành trong 2 ngày khác nhau trên cùng một điều kiện phân tích cho kết quả ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả áp dụng phương pháp để định lượng Cefmetazol trong mẫu thử

Mẫu	Ngày 1			Ngày 2			Thống kê
	Lượng cân thử (mg)	Diện tích đỉnh (mAu)	Hàm lượng % so với nhãn	Lượng cân thử (mg)	Diện tích đỉnh (mAu)	Hàm lượng % so với nhãn	TB = 100,53 $F_{tn} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$ $F_{tn} < F_{lt}$ (3,54<5,05) P = 95%
1	1115,6	3383422,7	100,50	1120,2	3399916,7	100,58	
2	1105,6	3369389,3	100,99	1200,1	3636047,3	100,40	
3	1031,6	3129594,0	100,53	1035,6	3141326,4	100,52	
4	1025,9	3127350,3	101,02	1060,0	3205063,4	100,20	
5	1121,5	3410783,0	100,78	1190,8	3614194,6	100,58	
6	1036,5	3149528,0	100,70	1076,5	3232379,3	99,50	
TB			100,75	1113,9	3371487,9	100,30	
SD			0,2196	0,4147			
%RSD			0,22	0,42			
%RSD = 0,40%							

Khảo sát độ chính xác thu được hàm lượng Cefmetazol trong thuốc bột pha tiêm đạt yêu cầu về hàm lượng hoạt chất trong khoảng 90-120% và %RSD ($n = 6$) là $0,22 < 2,0\%$. Định lượng 6 dung dịch mẫu thử khác nhau nhưng có nồng độ tương đương nhau với khoảng tin cậy là $100,8\% \pm 0,23$. Đồng thời, áp dụng phương pháp để định lượng Cefmetazol trong thuốc bột pha tiêm có %RSD = $0,40\% < 2,0\%$ và dùng thống kê theo chuẩn Fischer (F) để đánh giá độ chính xác của 2 ngày khác nhau dựa trên 2 dãy dữ liệu có $F_m = 3,54 < F_{lt} = 5,05$ thì có sự tương đồng với nhau. Chứng tỏ quy trình phân tích có tính ổn định và chính xác.

3.6. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của thiết bị

Giới hạn phát hiện (LOD) và định lượng (LOQ) có thể được xác định dựa vào độ dốc của đường chuẩn (a) và độ lệch chuẩn của tín hiệu đo (SD). Kết quả được xác định thông qua giá trị thống kê từ đường tuyến tính có LOD và LOQ tương ứng lần lượt là 0,016 mg/mL và 0,048 mg/mL.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Đề tài đã ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC), sử dụng cột HiQ Sil C18HS 4,6 mm (I.D) $\times$ 25 mm (L), 5 μ m để xác định hàm lượng Cefmetazol trong thuốc bột pha tiêm và kết quả đạt yêu cầu về hàm lượng theo USP 43. Phương pháp đã thẩm định các thông số theo hướng dẫn của theo hướng dẫn của Thông tư 32/2018/TT-BYT về quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc và ICH và đạt yêu cầu gồm độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại với phần trăm độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 2,0%, tỷ lệ phục hồi trong khoảng 99,02-100,61% và khoảng tuyến tính 0,1-0,5 mg/mL với $R^2 = 0,9999$. Do đó, phương pháp đề xuất có thể được áp dụng để xác định hàm lượng Cefmetazol có trong thuốc bột pha tiêm 1g hoặc 2g, nguyên liệu, thành phẩm chứa hoạt chất Cefmetazol ở dạng thuốc bột pha tiêm tại các công ty dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Công văn số 13398/QLD-ĐK ngày 13/7/2018 - Cập nhật thông tin hướng dẫn sử dụng đối với thuốc chứa Cefmetazol đường tiêm tĩnh mạch, tiêm truyền tĩnh mạch, Cục Quản lý Dược (2018) 1-3.
2. Bộ Y tế - Hóa Dược 1, NXB Giáo dục Việt Nam (2021) 183-184.
3. The United States Pharmacopoeia 43 - The United States Pharmacopoeial Convention, edition 27th 45 (3) (2020) 1-2.
4. Naoto Fukutsu, Yuich Sakamaki, Takao Kawasaki, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa - Verification of cefmetazol and cefpodoxime proxetil contamination to other pharmaceuticals by liquid chromatography-Tandem mass spectrometry, Pharmaceutical Society of Japan **54** (10) (2006) 1469-1472.
5. Naoto Fukutsu, Yuichi Sakamaki, Takao Kawasaki, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa - LC/MS/MS method for the determination of trace amounts of Cefmetazol and cefpodoxime proxetil contaminants in pharmaceutical manufacturing environments, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **41** (2006) 1243-1250.
6. Masato Kazusaki, Shinji Ueda, Naoto Takeuchi, Yasutaka Ohgami - Validation of analytical procedures by high performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis, Chromatography **33** (2) (2021) 65-73.
7. ICH (International Conference on Harmonization) - Guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (2005) 2-15.
8. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm - Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật, NXB Khoa học và Kỹ thuật (2010) 16-59.
9. Bộ Y tế - Kiểm nghiệm thuốc, NXB Giáo dục Việt Nam (2012) 137-180.

ABSTRACT

VALIDATION OF QUANTITATION ANALYTICAL PROCEDURE OF CEFMETAZOL IN POWDER FOR INJECTION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) WITH PDA DETECTOR

Mai Thanh Nhan, Nguyen Thi Thu Thao
Nguyen Tat Thanh University
Email: mtnhan@ntt.edu.vn

An accurate and sensitive method was developed for qualitative and quantitative analysis of Cefmetazol in powder for injection using high performance liquid chromatography (HPLC) with PDA detector. Chromatographic separation of Cefmetazol was performed on a HiQ Sil C18HS 4,6 mm (I.D) $\times$ 25 mm (L), 5 μ m column, PDA detection at 214 nm. The mobile phase component was phosphoric acid buffer (pH 4,5 $\pm$ 0,1) which used for the isocratic elution with flow rate of 2 mL/min. The sample was dissolved in the mobile phase component. Quantitative results of Cefmetazol powder for injection obtained a linear concentration range of 0,1-0,5 mg/mL. The accuracy of the method was determined by the recovery rate in the range of 99,02-100,61%, responding to 0,25-0,29 mg/mL and the repeatability (in %RSD) of 0,22%. The analytical procedure met the criteria of specificity, linearity, accuracy, and precision set by the guidance of Circular 32/2018/Circulars - The Ministry of Health on regulations on registration of circulation of drugs and medicinal ingredients. This analytical procedure can be applied in routine quality control of Cefmetazol in powdered pharmaceutical formulations for injection.

Keywords: Cefmetazol, HPLC, validation of quantitation analytical.