

DOI: 10.59715/pntjmp.2.1.6

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng viên nén bao phim chứa hoạt chất Cefditoren pivoxil bằng phương pháp HPLC

Trần Thị Phương Anh¹, Nguyễn Đăng Thoại¹, Nguyễn Thị Xuân Thùy¹, Trương Quốc Kỳ¹

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Cefditoren pivoxil là kháng sinh thuộc nhóm cephalosporin thế hệ 3, được bào chế dạng viên nén bao phim. Phương pháp định lượng viên nén bao phim cefditoren pivoxil chưa được quy định trong Dược điển Việt Nam V. Do đó xây dựng quy trình định lượng viên nén bao phim cefditoren pivoxil là một vấn đề cần thiết.

Đối tượng - Phương pháp: Viên nén bao phim chứa hoạt chất cefditoren pivoxil được định lượng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo với đầu dò PDA. Quy trình được tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert 12, thẩm định theo hướng dẫn của ICH và Sổ tay đăng ký thuốc của Bộ Y tế và áp dụng để định lượng mẫu chế phẩm trên thị trường.

Kết quả: Đã xây dựng quy trình định lượng cefditoren pivoxil trong viên nén bao phim bằng phương pháp HPLC. Sau khi được tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert, điều kiện sắc ký gồm cột Sunfire C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), pha động gồm methanol: nước (62:38, tt/tt), bước sóng phát hiện 240nm, tốc độ dòng 1,0ml/phút và nhiệt độ cột 30°C. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình có tính chọn lọc cao, khoảng tuyến tính từ 10 - 400 μ g/ml, tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 98 - 102% và độ chính xác có RSD < 2%. Đã áp dụng quy trình vào việc định lượng viên nén bao phim chứa cefditoren pivoxil trên thị trường. Kết quả hàm lượng cefditoren pivoxil trong khoảng 90 - 110%.

Kết luận: Đề tài này đã xây dựng thành công quy trình định lượng viên nén bao phim cefditoren pivoxil bằng phương pháp HPLC. Quy trình này đã được thẩm định và áp dụng để phân tích mẫu chế phẩm trên thị trường Việt Nam.

Từ khóa: Cefditoren pivoxil, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), viên nén bao phim.

Abstract

Development and validation of an hplc method for the quantification of film - coated tablets containing cefditoren pivoxil

Background: Cefditoren pivoxil is a 3rd generation of the cephalosporin, available commercially in film - coated tablet formulations. Method for the determination of cefditoren pivoxil is not yet available in the 5th Vietnamese Pharmacopoeia. Therefore, it is necessary to develop and validate a method for the quantification of film - coated tablets containing cefditoren pivoxil.

Methods: Cefditoren pivoxil in film - coated tablets was determined by high - performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array (PDA) detector. The method was optimized using Design Expert 12 program, validated based on ICH guideline, and applied to commercial formulations.

Ngày nhận bài:

14/11/2022

Ngày phản biện:

12/12/2022

Ngày đăng bài:

20/01/2023

Tác giả liên hệ:

Trương Quốc Kỳ

Email: kytq@pnt.edu.vn

ĐT: 0936723672

Results: The optimal chromatographic conditions for the quantification of cefditoren pivoxil were found out by Design Expert 12 program: a Sunfire C18 (150 × 4.6 mm; 5µm), mobile phase consisting of methanol and water (62:38, v/v), flow rate of 1.0ml/min, detection wavelength of 240 nm and column temperature of 30°C. The method was shown high selectivity, a wide linearity range from 10 - 400µg/ml. Intra-day standard deviation was below 2% and the recovery range was 98 - 102%. The method was applied to commercial formulations, and the assay results were within 90 - 110%.

Conclusions: The method for the quantification of cefditoren pivoxil in film - coated tablet formulations by HPLC was successfully developed. This method was validated and applied to analyze commercial products in Vietnam market.

Keywords: Cefditoren pivoxil, HPLC, film - coated tablets.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cơ chế tác động của kháng sinh nhóm β -lactam là ức chế tổng hợp thành vi khuẩn gây ly giải tế bào. Kháng sinh β -lactam được chia thành 4 phân nhóm, gồm penicillin, cephalosporin, carbapenem và monobactam, trong đó các kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 đã được phát triển để cho tác dụng tốt trên vi khuẩn Gram (-) [1]. Cefditoren pivoxil là một kháng sinh thuộc nhóm cephalosporin thế hệ 3, được chỉ định trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do các vi khuẩn nhạy cảm gây ra, bao gồm: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae* nhạy cảm với penicilin, *Moraxella catarrhalis*, viêm họng (*Streptococcus pyogenes*), nhiễm trùng da và tổ chức dưới da không biến chứng (*Staphylococcus aureus* không có đa kháng, *Streptococcus pyogenes*). Cefditoren pivoxil được hấp thu theo đường tiêu hóa và thủy phân bởi các enzyme esterase để giải phóng thành cefditoren có hoạt tính [2]. Phương pháp định lượng cefditoren pivoxil chưa được quy định trong Dược điển Việt Nam V (DĐVN V) cũng như Dược điển Hoa Kỳ (USP 44 - NF 39), Dược điển Anh (BP 2022) và Dược điển Châu Âu (EP 10.0).

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High - performance liquid chromatography - HPLC) là kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm dược phẩm do có nhiều ưu điểm: độ nhạy và độ chính xác cao, phù hợp để phân tích những chất khó bay hơi và ổn định nhiệt [3]. Để phát triển phương

pháp HPLC mới, cần khảo sát và kiểm soát các thông số sắc ký để thu được điều kiện sắc ký tối ưu. Việc khảo sát một yếu tố tại một thời điểm theo phương pháp cổ điển có nhược điểm là tốn nhiều thời gian, công sức và chi phí [4]. Việc tối ưu hóa quy trình thông qua sử dụng phần mềm tối ưu như Design Expert, Minitab, JUMP giúp giải quyết vấn đề này, giảm số lượng thí nghiệm và tiết kiệm chi phí [5].

Trong nghiên cứu này, quy trình định lượng viên nén bao phim chứa cefditoren pivoxil bằng phương pháp HPLC được tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert. Quy trình tối ưu được thẩm định theo hướng dẫn của Hội nghị Quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (International Conference on Harmonization - ICH) [6] và “Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc” của Bộ Y tế, sau đó được ứng dụng để định lượng mẫu chế phẩm đang lưu hành trên thị trường Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm viên nén bao phim chứa hoạt chất cefditoren pivoxil đang lưu hành trên thị trường Việt Nam. Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch.

2.2. Trang thiết bị, hóa chất, dung môi

Trang thiết bị

Các trang thiết bị dùng trong đề tài được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Trang thiết bị, dụng cụ	Model	Nhà sản xuất
Máy HPLC	Waters e2695	Waters
Đầu dò PDA	2998 PDA Detector	Waters
Cột sắc ký	Sunfire C18,5 μm , 150 mm \times 4,6 mm	Waters
Máy siêu âm	Elmasonic S100H	Elma
Máy đo pH	Orion star A211	Thermo Fisher
Cân phân tích	Sartorius QUINTIX224	Sartorius
Các dụng cụ thủy tinh và dụng cụ hỗ trợ khác		

Hóa chất, dung môi

Các hóa chất và dung môi sử dụng trong đề tài được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Hóa chất, dung môi sử dụng trong nghiên cứu

Hóa chất, dung môi	Tiêu chuẩn	Nhà sản xuất/ Nước sản xuất
Methanol	HPLC	Scharlau
Ethanol	Phân tích	Merck
Chất chuẩn cefditoren pivoxil	Hàm lượng > 98%	TCI

2.3. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch gốc

Các dung dịch gốc của cefditoren pivoxil được hòa tan trong ethanol để được nồng độ 2000 ppm và các dung dịch này được bảo quản trong tủ mát ở nhiệt độ 2°C.

Dung dịch chuẩn

Từ dung dịch gốc, tiến hành pha loãng với pha động để đạt được nồng độ thích hợp dùng cho tối ưu hóa và thẩm định quy trình.

Dung dịch thử

Cân 20 viên, loại bỏ lớp bao và nghiền thành bột mịn. Cân một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 50 mg cefditoren pivoxil cho vào bình định mức 100 ml, thêm 30 ml ethanol, siêu âm 15 phút, để nguội, sau đó thêm ethanol vừa đủ 100 ml, lắc đều. Lọc lấy 2 ml dịch lọc vào bình định mức 10 ml và thêm pha động đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi phân tích.

Mẫu trắng: pha động.

2.4. Thiết kế và tối ưu hóa thực nghiệm

Quy trình định lượng viên nén chứa hoạt chất cefditoren pivoxil được tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert version 12 (StatEase) sử dụng mô hình Face - centered CCD (CCF).

Hai biến độc lập là nhiệt độ cột và tỷ lệ methanol trong pha động, mỗi yếu tố có 3 mức, chi tiết trong Bảng 3. Các điều kiện sắc ký còn lại duy trì cố định như sau: Cột Sunfire C18 (150 \times 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl , bước sóng phát hiện 230 nm. Ba biến phụ thuộc là những thông số để đánh giá hiệu quả của quá trình tách và hiệu lực cột như hệ số dung lượng (k'), hệ số đối xứng (As) và số đĩa lý thuyết (N).

Bảng 3. Các mức của từng biến độc lập

	-1	0	+1
Nhiệt độ cột (°C)	25	30	35
Tỷ lệ methanol (%)	50	70	90

Dựa vào các dữ liệu thực nghiệm, phần mềm Design Expert sử dụng phân tích phương sai (ANOVA) để đánh giá ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc và đề xuất điều kiện sắc ký tối ưu.

2.5. Thẩm định quy trình

Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, sẽ tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của ICH 6 và “Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc” của Bộ Y tế, bao gồm khảo sát tính phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng. Sau khi được thẩm định, quy trình được ứng dụng để định lượng chế phẩm viên nén bao phim trên thị trường có chứa hoạt chất cefditoren pivoxil.

Áp dụng quy trình để định lượng mẫu chế phẩm trên thị trường

Mẫu là chế phẩm viên nén bao phim chứa hoạt chất cefditoren pivoxil đang lưu hành trên thị trường Việt Nam. Tiến hành chuẩn bị mẫu như trình bày ở phần 2.3. Mẫu sau khi chuẩn bị được tiến hành sắc ký theo điều kiện tối ưu và tính toán kết quả định lượng.

Hàm lượng hoạt chất trong 1 viên được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{St}{Sc} \times \frac{P}{m} \times \text{Độ pha loãng} \times C$$

X: hàm lượng hoạt chất trong 1 viên

St: Diện tích pic trung bình của hoạt chất trong mẫu thử.

Sc: Diện tích pic trung bình của hoạt chất trong mẫu chuẩn.

P: Khối lượng trung bình của bột thuốc trong mỗi viên (mg).

m: Khối lượng bột thuốc cân (mg).

C: nồng độ hoạt chất trong dung dịch mẫu chuẩn

3. KẾT QUẢ

3.1. Khảo sát và tối ưu hóa điều kiện sắc ký

Khảo sát điều kiện sắc ký

Tiến hành cài đặt giới hạn dưới, giới hạn trên của từng biến độc lập và thực hiện thí nghiệm theo các điều kiện phần mềm đề xuất. Dữ liệu của 13 thực nghiệm được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Dữ liệu thực nghiệm theo mô hình CCF

Số thứ tự thí nghiệm	Biến độc lập		Biến phụ thuộc		
	Nhiệt độ cột (°C)	Tỷ lệ methanol trong pha động (%)	k'	As	N
1	30	70	1,0838	1,0849	4827
2	25	90	0,1664	0,9967	5504
3	25	70	1,1551	1,0545	4885
4	30	70	1,0836	1,0886	4826
5	30	70	1,0844	1,0911	4750
6	30	90	0,1581	0,8900	4946
7	30	70	1,0850	1,0983	4686
8	30	50	14,6856	1,0666	6834
9	35	90	0,1464	0,8654	3800
10	35	50	12,8159	1,0618	7244
11	25	50	16,5056	0,9817	7715
12	30	70	1,0841	1,1033	4607
13	35	70	1,0102	1,1238	4944

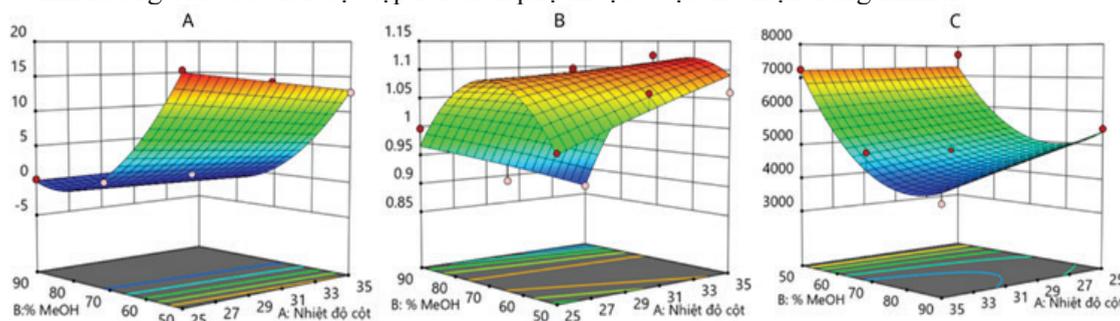
Phân tích kết quả

Kết quả phân tích phương sai được trình bày trong Bảng 5. Trị số p-value < 0,005 với tất cả các biến, cho thấy mô hình có ý nghĩa về mặt thống kê. Các thông số còn lại trong giới hạn cho phép.

Bảng 5. Kết quả phân tích phương sai của các biến phụ thuộc

Biến phụ thuộc	p-value của mô hình	R2 hiệu chỉnh (Adjusted R2)	Độ chính xác thích hợp (Adequate precision)	% CV
k'	1,0796 x 10 ⁻¹⁰	0,9968	75,5008	8,72
As	0,0007	0,8797	11,6922	2,74
N	0,0002	0,9190	14,3075	6,10

Ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ cột và tỉ lệ methanol tới:

(A): Hệ số dung lượng k', (B): Hệ số đối xứng As (C): Số đĩa lý thuyết (N)

Dựa vào các dữ liệu thực nghiệm, kết hợp với điều kiện ràng buộc cho các biến độc lập và phụ thuộc, các thực nghiệm tối ưu với các chỉ số mong muốn khác nhau được phân mềm đề xuất. Chỉ số mong muốn càng cao phản ánh khả năng tái lập càng cao khi so sánh giữa các dữ liệu được đề xuất bởi phần mềm và các dữ liệu thực nghiệm kiểm chứng. Thực nghiệm có chỉ số mong muốn (desirability value) cao nhất (0,702) có nhiệt độ cột và tỷ lệ methanol trong pha động tương ứng là 30 °C và 62%.

Thực nghiệm kiểm chứng

Tiến hành lặp lại 6 lần thực nghiệm tối ưu đã được đề xuất. Dữ liệu đánh giá được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thực nghiệm kiểm chứng

Biến phụ thuộc	Giá trị trung bình dự đoán	Khoảng tin cậy 95% cho giá trị dự đoán		Giá trị trung bình thực nghiệm
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên	
k'	5	4,1435	5,8565	4,28
As	1,0986	1,0255	1,1717	1,106
N	5487,2	4686,1	6288,3	4845

Giá trị trung bình thực nghiệm nằm trong khoảng tin cậy của giá trị dự đoán, do đó mô hình được kiểm chứng.

Điều kiện sắc ký tối ưu

Các kết quả khảo sát và tối ưu hóa thực nghiệm cho thấy điều kiện sắc ký tối ưu để định lượng cefditoren pivoxil như sau: cột Sunfire C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm), nhiệt độ cột 30°C, pha động gồm methanol - nước (62: 38), tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl, bước sóng phát hiện 230 nm.

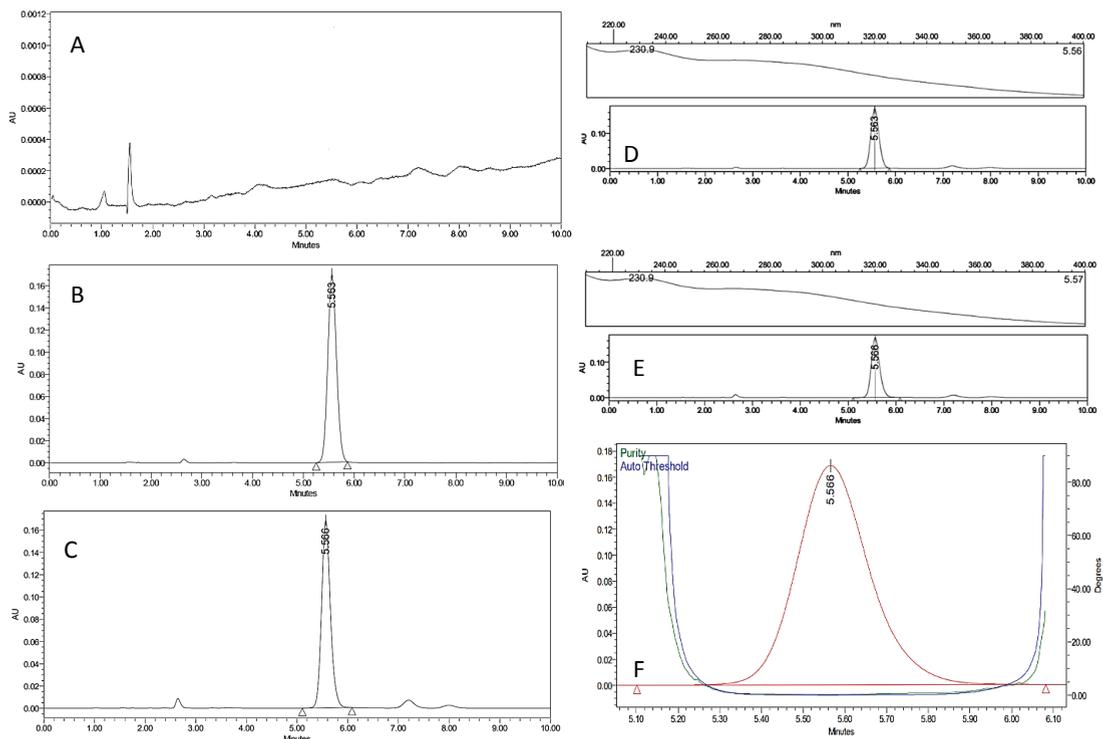
3.2. Thẩm định quy trình

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn cefditoren pivoxil 100 ppm, sau 6 lần tiêm mẫu thu được các kết quả sau: RSD% của tR là 0,10%, RSD% của S pic là 1,09%, As trung bình là 1,11 và N trung bình là 4845,17. Các số liệu thu được cho thấy: RSD (%) của diện tích pic các chất phân tích nhỏ hơn 2,0%. Hệ số bất đổi của pic các chất phân tích nhỏ hơn 0,8 đến 1,5. Như vậy điều kiện sắc ký phù hợp cho việc định tính, định lượng cefditoren pivoxil.

Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký, mẫu trắng (pha động), mẫu chuẩn và mẫu thử, thu được sắc ký đồ và các dữ liệu phổ như Hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ của các mẫu: (A) Mẫu trắng, (B) Mẫu chuẩn, (C) Mẫu thử; Phổ UV-Vis của các mẫu: (D) Mẫu chuẩn, (E) Mẫu thử; (F): Phổ tinh khiết pic chính mẫu thử

Sắc ký đồ cũng như dữ liệu về phổ và các thông số sắc ký cho thấy, thời gian lưu của pic chính trên mẫu thử và mẫu chuẩn tương đương nhau. Trong sắc ký đồ của mẫu trắng không phát hiện pic có thời gian lưu trùng với pic của mẫu chuẩn. Phổ UV-Vis của mẫu thử giống phổ UV-Vis của mẫu chuẩn. Pic chính trong mẫu thử tinh khiết. Do đó, quy trình có tính đặc hiệu.

Khoảng tuyến tính

Pha 5 dung dịch chuẩn cefditoren pivoxil có nồng độ từ 10 - 400 ppm. Tiến hành sắc ký ở điều kiện khảo sát thu được diện tích pic tương ứng với từng nồng độ. Xử lý dữ liệu bằng Excel 2016 cho thấy sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích đỉnh. Với hệ số tương quan $R^2 \geq 0,999$. Kết quả được thể hiện trong Bảng 7. Quy trình đạt tính tuyến tính.

Độ đúng và độ chính xác

Độ phục hồi trung bình của cefditoren pivoxil từ 98,73 - 100,28%, độ phục hồi của phương pháp đều nằm trong khoảng cho phép từ 98 - 102% đồng thời có $RSD \leq 2,0\%$, và quy trình có độ chính xác cao ($RSD \leq 2,0\%$). Từ kết quả Bảng 8 và Bảng 9 ta thấy rằng quy trình đạt độ đúng và độ chính xác.

Bảng 7. Kết quả thẩm định tính tuyến tính

Chỉ tiêu thẩm định	Cefditoren pivoxil
Phương trình hồi quy	$y = 20578x + 4502,5$ $R^2 = 0,9999$
Khoảng tuyến tính	10 - 400 ppm

Bảng 8. Kết quả thẩm định độ chính xác

Thời gian lưu	Diện tích pic	Hàm lượng mẫu thử (RSD%)
$5,576 \pm 0,0009$	$2016668,8300 \pm 0,0109$	1,0938

Bảng 9. Kết quả thẩm định độ đúng

Nồng độ chuẩn thêm vào	Thời gian lưu	Diện tích pic	Tỷ lệ phục hồi (%)
80%	$5,5667 \pm 0,0011$	$3709184 \pm 0,0053$	$100,1389 \pm 0,5361$
100%	$5,5663 \pm 0,0002$	$4127341,34 \pm 0,0019$	$100,2853 \pm 0,1954$
120%	$5,5700 \pm 0,0006$	$4469503,34 \pm 0,0160$	$98,726446 \pm 1,5813$

3.3. Ứng dụng quy trình để định lượng viên nén chứa hoạt chất cefditoren pivoxil đang lưu hành trên thị trường

Quy trình phân tích sau khi được tối ưu hóa và thẩm định, đã được ứng dụng để định lượng thuốc viên nén bao phim chứa hoạt chất cefditoren pivoxil (200 mg) đang lưu hành trên thị trường. Kết quả định lượng được trình bày trong Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả định lượng mẫu chế phẩm trên thị trường

Thời gian lưu	Diện tích pic	Hàm lượng cefditoren pivoxil trung bình trong chế phẩm
$5,575 \pm 0,0009$	$2002705 \pm 0,0033$	$100,7896 \pm 0,0099$

4. BÀN LUẬN

Cefditoren pivoxil là kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 3, đóng vai trò quan trọng trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Việc xây dựng quy trình định lượng thuốc viên nén bao phim chứa cefditoren pivoxil giúp kiểm soát hàm lượng hoạt chất này trong chế phẩm, nhằm bảo vệ an toàn cho người sử dụng thuốc.

HPLC là kỹ thuật phân tích có nhiều ưu điểm và rất phổ biến trong ngành Dược. Để thu được quy trình định lượng chính xác, đặc hiệu, cần kiểm soát các điều kiện sắc ký để thu được sắc ký đồ phù hợp và các thông số sắc ký tối ưu. Việc tối ưu hóa quy trình phân tích bằng phần mềm giúp thiết kế điều kiện thí nghiệm một cách khoa học, tiết kiệm thời gian và chi phí. Đề tài đã sử dụng phần mềm Design Expert, với mô hình CCF

để thực hiện tối ưu hóa quy trình định lượng viên nén bao phim chứa hoạt chất cefditoren pivoxil bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Điều kiện sắc ký tối ưu cho sự lưu giữ và số đĩa lý thuyết phù hợp, pic đối xứng. Quy trình đạt các chỉ tiêu thẩm định, được ứng dụng để định lượng trên mẫu chế phẩm trên thị trường, qua đó khẳng định khả năng ứng dụng trong thực tế.

5. KẾT LUẬN

Các kết quả thực nghiệm cho thấy đã xây dựng thành công quy trình định lượng viên nén bao phim chứa hoạt chất cefditoren pivoxil. Phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng. Kết quả cũng cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic trong khoảng nồng độ khảo sát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lima LM, da Silva BNM, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;208: 112829.
2. Bộ Y Tế. Dược thư Quốc Gia Việt Nam. 2 ed. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật 2015.
3. Dong MW. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. John Wiley & Sons; 2019.
4. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:590-611.
5. Wahid Z, Nadir N. Improvement of one factor at a time through design of experiments. 2012.
6. International Conference of Harmonization. Validation of analytical procedures Q2 (R1). Switzerland: Geneva 2005.