

DOI: 10.59715/pntjimp.2.3.20

Xây dựng quy trình định lượng thuốc tiêm nhóm Beta - Lactam (Ertapenem, Ampicillin và Sulbactam) bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA dùng kỹ thuật phân tích xanh

Trương Quốc Kỳ¹, Trần Thị Phương Anh¹

¹Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Mục tiêu chính của hóa học phân tích xanh (GAC) là phát triển các phương pháp phân tích thân thiện với môi trường và sức khỏe bằng cách thay thế hoặc không sử dụng các dung môi độc trong quy trình phân tích. Trong nghiên cứu này, phương pháp phân tích xanh đã được áp dụng để định lượng thuốc bột pha tiêm nhóm β -lactam gồm ertapenem natri (ETP), ampicillin natri (APC) và sulbactam natri (SUL) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò dây diod quang (PDA).

Đối tượng - Phương pháp: Ethanol được dùng làm dung môi xanh thay thế cho các dung môi độc thường được sử dụng trong phân tích sắc ký, chẳng hạn như methanol và acetonitril. Các điều kiện sắc ký khác nhau đã được khảo sát để đạt được các điều kiện tối ưu. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của ICH Q2 (R1) và được áp dụng để định lượng một số chế phẩm trên thị trường.

Kết quả: Đã xây dựng được quy trình định lượng ETP, APC và SUL bằng phương pháp HPLC sử dụng cột C18 (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm) ở 30°C, pha động gồm ethanol - amoni acetat 25 mM (9:91, tt/tt), pH pha động là 6,0 cho ETP và 5,0 cho APC và SUL, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, bước sóng phát hiện là 294 nm cho ETP và 210 nm cho APC và SUL. Các phương pháp đạt tất cả các thông số thẩm định và đã được ứng dụng để phân tích các chế phẩm có chứa ETP hoặc dạng kết hợp hai hoạt chất APC và SUL trên thị trường.

Kết luận: Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình định lượng thuốc bột pha tiêm nhóm β -lactam gồm ertapenem natri, ampicillin natri và sulbactam natri bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò PDA sử dụng kỹ thuật phân tích xanh.

Từ khóa: Ertapenem natri, ampicillin natri, sulbactam natri, hóa học phân tích xanh, HPLC-PDA.

Abstract

Determination of some β -lactam powder for injection (Ertapenem, Ampicillin and Sulbactam) by RP-HPLC with PDA method using a green analytical technique

Background: Green analytical chemistry (GAC) primary goal is to develop environmental and health - friendly analytical methods by eradicating or replacing hazardous substances from analytical procedures. In this research, the application of GAC to quantify some β -lactam powders for injection include ertapenem sodium (ETP), ampicillin sodium (APC) and sulbactam sodium (SUL) by high - performance liquid chromatography (HPLC) using photodiode arrays (PDA) detector was developed.

Ngày nhận bài:

20/5/2023

Ngày phân biện:

20/6/2023

Ngày đăng bài:

20/7/2023

Tác giả liên hệ:

Trương Quốc Kỳ

Email:

kytq@pnt.edu.vn

ĐT: 0936723672

Methods: Ethanol was used as a green alternative to commonly used but hazardous solvents in chromatographic analysis, such as methanol and acetonitrile. Several chromatographic conditions were investigated to accomplish the optimal conditions. The developed method was validated on the basis of the ICH Q2 (R1) guideline and applied for quantifying some pharmaceutical products.

Results: The chromatographic conditions appropriate for the determination of ETP, APC and SUL have been developed by HPLC method using the Sunfire C18 (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) column set at 30°C, the mobile phase consisted of ethanol and ammonium acetate 25 mM (9:91, v/v), pH of mobile phase was 6.0 for ETP and 4.0 for APC and SUL, the flow rate was 1.0 ml per minute, the injection volume was 10 μ L and the detection wavelength was 294 for ETP and 210 nm for APC and SUL. The proposed method achieved all recommended validation criteria and was successfully employed to analyze commercial products containing ETP or combinations of APC and SUL.

Conclusions: An HPLC-PDA method using green analytical chemistry was successfully developed to determine some β -lactam powders for injection, including ertapenem sodium, ampicillin sodium, and sulbactam sodium.

Keywords: Ertapenem sodium, ampicillin sodium, sulbactam sodium, green analytical chemistry, HPLC-PDA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kháng sinh nhóm β -lactam cho tác động bằng khả năng ức chế tổng hợp thành vi khuẩn gây ly giải tế bào [1]. Ampicillin natri là kháng sinh β -lactam phân nhóm penicillin, được chỉ định trong bệnh viêm đường hô hấp trên, phối hợp với các kháng sinh khác trong điều trị viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết,... Ertapenem natri là kháng sinh β -lactam phân nhóm carbapenem, được chỉ định trong điều trị nhiễm khuẩn ổ bụng có biến chứng, nhiễm khuẩn vùng chậu cấp, nhiễm khuẩn da và tổ chức dưới da ở bệnh nhân đái tháo đường, và dự phòng phẫu thuật đại trực tràng [2]. Trong các cơ sở khám chữa bệnh, thuốc tiêm ertapenem natri cũng như thuốc tiêm dạng phối hợp ampicillin natri và sulbactam natri được sử dụng để điều trị các tình trạng nhiễm khuẩn còn nhạy cảm.

Hiện nay, theo dược điển Việt Nam và dược điển Mỹ, thuốc tiêm ampicillin natri và sulbactam natri được kiểm nghiệm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography - HPLC) [3, 4]. Ertapenem natri chưa được trình bày trong các dược điển trên, tuy nhiên đã có một số nghiên cứu trình bày quy trình định lượng ertapenem natri bằng HPLC [5, 6, 7]. Điểm chung của các phương pháp này là sử dụng pha động có chứa acetonitril hoặc methanol.

Acetonitril và methanol là dung môi phổ biến trong sắc ký lỏng pha đảo. Tuy nhiên, những vấn đề liên quan đến môi trường và sức khỏe con người của methanol và acetonitril cần phải được quan tâm. Theo ICH, những dung môi này thuộc nhóm 2: "Những dung môi cần hạn chế sử dụng", liên quan tới tác nhân gây ung thư không độc gen, gây độc thần kinh hoặc dị tật bào thai [8]. Độc tính của methanol là do chất chuyển hóa formate trong gan, gây nhiễm toan và tổn thương võng mạc. Nhiễm độc methanol có thể gây ra phù võng mạc, tổn thương mắt, mất tế bào hạch, khử men võng mạc vùng thái dương, hoại tử các tế bào có hoặc không kèm theo xuất huyết. Acetonitril gây ngộ độc do hít phải hoặc qua tiếp xúc qua da và mắt. Độc tính do acetonitril gây ra tác động lên đa cơ quan: trên hệ hô hấp, acetonitril gây tức ngực, suy hô hấp, trên hệ tim mạch acetonitril gây rối loạn tim mạch, trụy tim mạch và tử vong, trên hệ thần kinh, acetonitril gây lú lẫn, suy nhược và hôn mê [9].

Do đó, việc giảm thiểu sử dụng hoặc thay thế những dung môi hữu cơ độc như acetonitril và methanol đang là mục tiêu của nhiều nghiên cứu liên quan tới hóa học phân tích xanh - lĩnh vực nghiên cứu nhằm xây dựng và phát triển những quy trình phân tích ít độc hơn [10]. Những nguyên tắc của hóa học phân tích xanh như

không dùng hoặc thay thế những dung môi độc, tăng cường an toàn lao động là những nguyên tắc nằm trong 12 nguyên tắc của hóa học xanh [11]. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu ứng dụng phân tích xanh vào kỹ thuật HPLC để phân tích, định lượng mẫu dược phẩm. Tuy nhiên, tại Việt Nam, phân tích xanh vẫn còn là một lĩnh vực mới.

Vai trò phát triển của hóa học phân tích xanh trên thế giới cũng như sự quan tâm của xã hội về vấn đề bảo vệ môi trường và sức khỏe con người, cho thấy việc xây dựng quy trình định lượng thuốc tiêm ertapenem natri, ampicillin natri và sulbactam natri bằng phương pháp

HPLC với đầu dò PDA dùng kỹ thuật phân tích xanh là một vấn đề cần thiết.

2. ĐỐI TƯỢNG – PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm thuốc bột pha tiêm chứa đồng thời hoạt chất ampicillin natri và sulbactam natri và chế phẩm thuốc bột đông khô pha tiêm chỉ chứa hoạt chất ertapenem natri đang lưu hành trên thị trường.

2.2. Trang thiết bị, hóa chất, dung môi

Trang thiết bị

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

Bảng 1. Trang thiết bị sử dụng trong đề tài

Thiết bị	Model	Hãng sản xuất
Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao	e2695	Waters
Cột sắc ký	Sunfire C18 (5 µm, 150 mm × 4,6 mm)	Waters
Máy đo pH	Orion star A211	Thermo Scientific
Cân phân tích	QUINTIX224	Sartorius
Bể siêu âm	Elmasonic S100H	Elma

Hóa chất dung môi

Hóa chất, dung môi sử dụng trong đề tài được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Hóa chất, dung môi sử dụng trong đề tài

Hóa chất, dung môi	Hãng sản xuất
Chất chuẩn ampicillin natri	Sigma - Aldrich
Chất chuẩn sulbactam natri	Sigma - Aldrich
Chất chuẩn ertapenem natri	Sigma - Aldrich
Ethanol (HPLC)	Scharlau
Acid acetic	Merck
Amoni acetat	Merck

2.3. Khảo sát điều kiện sắc ký

Dựa vào cấu trúc của các chất phân tích và tài liệu tham khảo, kỹ thuật sắc ký lỏng pha đảo được áp dụng với pha động bao gồm ethanol và dung dịch đệm acetat với pH = 5 tỉ lệ 6:94 (tt/tt), sắc ký đồ được ghi ở bước sóng 210 nm trong phân tích đồng thời ampicillin natri và sulbactam natri và ở 294 nm với ertapenem natri. Tốc độ dòng là 1,0 ml/phút với nhiệt độ cột là 35°C. Trong quá trình thực nghiệm, các

yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách và độ chọn lọc của phương pháp như pH pha động, nồng độ dung dịch đệm, tỉ lệ pha động và nhiệt độ cột được khảo sát và tối ưu để thu được thời gian lưu tối ưu, hệ số bất đối As từ 0,8 - 1,5 và có hệ số phân giải $R_s \geq 1,5$.

Điều kiện khảo sát pha động

- pH pha động: thử nghiệm với các pH khác nhau: 4,0; 5,0 và 6,0.

- Nồng độ của dung dịch đệm: thử nghiệm

với các nồng độ amoni acetat lần lượt là 15 mM/l, 25 mM/l và 35 mM/l.

- Tỷ lệ pha động: thử nghiệm với các tỷ lệ ethanol trong pha động lần lượt là 3%, 6% và 9%.

- Nhiệt độ khảo sát 25, 30 và 35°C.

2.4. Chuẩn bị mẫu và dung dịch đệm

Dung dịch đệm

Dung dịch đệm acetat: Hòa tan một lượng amoni acetat với nước cất để thu được dung dịch amoni acetat ở nồng độ mong muốn. Tiến hành đo pH dung dịch thu được. Điều chỉnh bằng dung dịch acid acetic đến khi thu được pH mong muốn.

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc

Các dung dịch chuẩn gốc của ampicillin natri, sulbactam natri và ertapenem natri được hòa tan trong nước cất 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

Dung dịch chuẩn đơn: được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc để đạt được nồng độ định lượng.

Dung dịch chuẩn hỗn hợp ampicillin natri và sulbactam natri: hỗn hợp của 2 chất chuẩn được hòa tan trong nước ở nồng độ thích hợp từ dung dịch chuẩn gốc, dùng xây dựng quy trình phân tích và thẩm định quy trình.

3. KẾT QUẢ

3.1. Điều kiện sắc ký

Khảo sát điều kiện sắc ký của ertapenem natri

Tiến hành khảo sát các điều kiện pH, nồng độ đệm, tỷ lệ pha động và nhiệt độ cột khác nhau. Các thông số sắc ký của từng điều kiện được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Khảo sát điều kiện sắc ký của ertapenem natri

		Chất phân tích	tR	S pic	As	N	Rs	K'
pH	pH 4	Ertapenem natri	24,261	406969	0,99	11488	-	15,1
	pH 5	Ertapenem natri	10,569	442216	1,03	9695	-	6,05
	pH 6	Ertapenem natri	7,705	428700	1,09	8734	-	4,14
Nồng độ đệm (mM/l)	15	Ertapenem natri	8,427	400656	1,12	8758	-	4,61
	25	Ertapenem natri	7,705	428700	1,09	8734	-	4,14
	35	Ertapenem natri	7,280	413159	1,09	413159	-	3,85
Tỷ lệ etOH-đệm	3 - 97	Ertapenem natri	11,029	1215692	1,32	532	-	6,35
	6 - 94	Ertapenem natri	7,705	428700	1,09	8734	-	4,14
	9 - 91	Ertapenem natri	3,409	303524	1,11	6,566	-	1,27

Dung dịch thử

Dung dịch thử ertapenem natri: cân lượng bột thuốc tương ứng 10 mg ertapenem natri cho vào bình định mức 100 ml. Thêm 70 ml nước cất, lắc để hòa tan và thêm pha động đến vạch, lắc đều, sau đó lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi phân tích bằng HPLC với đầu dò PDA.

Dung dịch thử ampicillin natri và sulbactam natri: Cân lượng bột thuốc trong 10 lọ sau đó tính khối lượng bột thuốc trung bình trong một lọ. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 10 mg ampicillin và 5 mg sulbactam vào bình định mức 100 ml. Thêm 70 ml nước cất, lắc để hòa tan và thêm nước cất đến vạch, lắc đều, sau đó lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi phân tích bằng HPLC với đầu dò PDA.

Mẫu trắng: Nước cất.

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 Q2 (R1) [12] và Sổ tay đăng ký thuốc của Cục quản lý Dược [13], bao gồm khảo sát tính phù hợp hệ thống, độ chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng. Sau khi được thẩm định, quy trình được ứng dụng để định lượng chế phẩm thuốc bột pha tiêm trên thị trường có chứa các chất này.

		Chất phân tích	tR	S pic	As	N	Rs	K'
Nhiệt độ cột	25	Ertapenem natri	4,230	303491	1,09	5491	-	1,82
	30	Ertapenem natri	3,771	397654	1,10	6048	-	1,51
	35	Ertapenem natri	3,409	303524	1,11	6,566	-	1,27

Với những kết quả trên, điều kiện sắc ký được chọn để định lượng ertapenem natri:

Pha động: ethanol - dung dịch đệm acetat 25 mM/l (pH = 6) (9:91, tt/tt)

Cột sắc ký: Sunfire C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)

Nhiệt độ cột: 30°C

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Thể tích bơm mẫu: 10 µl

Bước sóng phát hiện: 294 nm.

Khảo sát điều kiện sắc ký đồng thời ampicillin natri và sulbactam natri

Tiến hành khảo sát các điều kiện pH, nồng độ đệm, tỷ lệ pha động và nhiệt độ cột khác nhau.

Các thông số sắc ký của từng điều kiện được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký đồng thời ampicillin natri và sulbactam natri

		Chất phân tích	tR	S pic	As	N	Rs	K'
pH	pH 4	Ampicillin natri	12,673	22173	1,02	13090	35,3	7,45
		Sulbactam natri	3,361	34888	1,15	8270		7,45
	pH 5	Ampicillin natri	14,549	887987	0,99	12600	35	8,70
		Sulbactam natri	3,257	137180	1,14	11000		1,17
	pH 6	Ampicillin natri	21,601	876311	1,03	12990	43,01	13,4
		Sulbactam natri	2,967	137242	1,03	11400		0,98
Nồng độ đệm (mM/l)	15	Sulbactam natri	3,236	139546	1,24	9916	31,7	1,16
		Ampicillin natri	13,513	907889	1,02	10781		8,01
	25	Sulbactam natri	3,257	131836	1,17	11273	34,8	1,17
		Ampicillin natri	14,328	920673	1,02	12258		8,55
	35	Sulbactam natri	3,051	122362	1,14	10374	34,3	1,03
			14,038	835666	1,04	11649		8,36
Tỷ lệ etOH-đệm	3 - 97	Sulbactam natri	4,906	144928	1,21	10972		2,27
		Ampicillin natri	Không hiện pic sau khi chạy 30 phút					
	6 - 94	Sulbactam natri	3,257	131836	1,17	11273	34,8	1,17
		Ampicillin natri	14,328	920673	1,02	12258	34,8	8,55
	9 - 91	Sulbactam natri	2,695	147689	1,2	9348	22,7	0,8
		Ampicillin natri	7,313	931976	1,04	9556	22,7	3,88
Nhiệt độ cột (°C)	25	Sulbactam natri	2,968	147210	1,18	8115	22,5	0,98
		Ampicillin natri	8,672	925898	1,02	8348	22,5	4,78
	30	Sulbactam natri	2,818	147514	1,18	8734	22,6	0,88
		Ampicillin natri	7,961	936084	1,04	8854	22,6	4,31
	35	Sulbactam natri	2,695	147689	1,22	9348	22,7	0,79
		Ampicillin natri	7,313	931976	1,04	9556	22,7	3,88

Điều kiện sắc ký được chọn để định lượng đồng thời ampicillin natri và sulbactam natri là:

Pha động: ethanol - dung dịch đệm acetat 25 mM/l (pH = 5) (9:91, tt/tt)

Cột sắc ký: Sunfire C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m)

Nhiệt độ cột: 30°C

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút

Thể tích bơm mẫu: 10 μ l

Bước sóng phát hiện: 210 nm.

3.2. Thẩm định quy trình

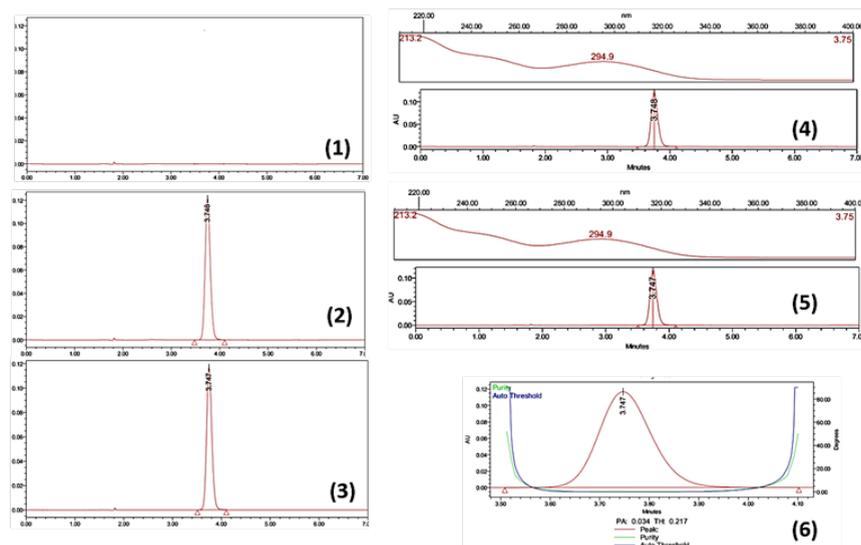
Thẩm định quy trình định lượng ertapenem natri

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn ertapenem natri 100 ppm, sau 6 lần tiêm mẫu thu được các kết quả sau: RSD% của tR là 0,10%, RSD% của S pic là 0,21%, As trung bình là 1,14, N trung bình là 5794,17. Các số liệu thu được cho thấy: RSD (%) của diện tích pic và thời gian lưu của chất phân tích nhỏ hơn 2,0%. Hệ số bất đối của pic của chất phân tích nhỏ hơn 0,8 đến 1,5. Như vậy điều kiện sắc ký phù hợp cho việc định tính, định lượng ertapenem natri.

Tính 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 1.



Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu trắng (1), mẫu chuẩn ertapenem natri (2), mẫu thử ertapenem natri (3); Phổ UV-Vis của mẫu chuẩn ertapenem natri (4), mẫu thử ertapenem natri (5); Phổ tinh khiết pic của mẫu thử (6)

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

Khoảng tuyến tính

Pha 6 dung dịch chuẩn ertapenem natri có nồng độ từ 20 - 500 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 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 3. Quy trình đạt tính tuyến tính.

Độ đúng và độ chính xác

Độ phục hồi trung bình của ertapenem natri từ 99,86 - 101, 55%, độ phục hồi của phương pháp đều nằm trong khoảng cho phép từ 98 - 102% và có $RSD \leq 2,0\%$, và quy trình có độ chính xác cao ($RSD \leq 2,0\%$). Từ kết quả bảng 5 ta thấy rằng quy trình đạt độ đúng và độ chính xác cao.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác và tính tuyến tính của ertapenem natri

Chỉ tiêu thẩm định	Ertapenem natri
Phương trình hồi quy	$y = 10223x - 80116$ $R^2 = 0,9997$
Khoảng tuyến tính	20 - 500 ppm
Độ lặp lại (n = 6)	0,21%
Độ đúng	99,86 - 101, 55%

Thẩm định quy trình định lượng đồng thời ampicillin natri và sulbactam natri

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần với dung dịch hỗn hợp chuẩn có nồng độ ampicillin natri và sulbactam natri tương ứng là 100 ppm và 50 ppm. Kết quả thu được trong bảng 6.

Bảng 6. Tính phù hợp hệ thống của ampicillin natri và sulbactam natri.

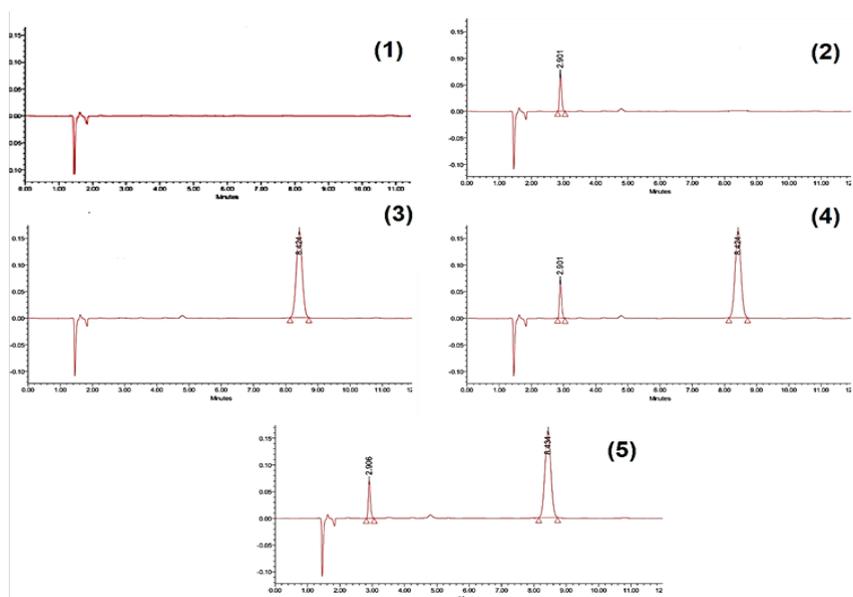
	RSD% của tR	RSD% của S pic	As trung bình	Rs trung bình	N trung bình
Ampicillin natri	0,07	0,60	1,01	24,06	9793,17
Sulbactam natri	0,11	1,03	1,28	24,06	9089,50

Các số liệu thu được cho thấy: RSD (%) của diện tích pic các chất phân tích nhỏ hơn 2,0%. Hệ số bất đối của pic các chất phân tích từ 0,8 đến 1,5. Độ phân giải giữa hai pic ampicillin natri và sulbactam natri là 24,06. Như vậy điều kiện sắc ký phù hợp cho việc định lượng đồng thời ampicillin natri và sulbactam natri.

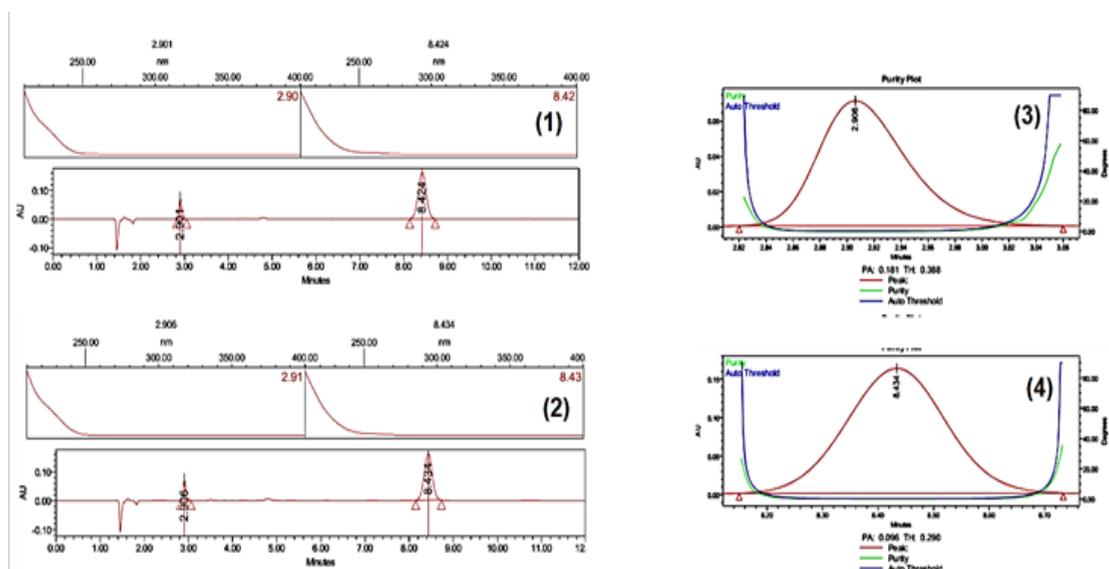
Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử, thu được sắc ký đồ như hình 2 và các dữ liệu phổ thể hiện ở hình 3.

Sắc ký đồ cũng như dữ liệu về phổ cho thấy, thời gian lưu của pic chính trên mẫu thử và mẫu chuẩn tương đương nhau đối với cả 2 hoạt chất. Mẫu trắng không phát hiện pic có thời gian lưu trùng với pic của mẫu chuẩn. Phổ UV của mẫu thử giống phổ UV của mẫu chuẩn đối với cả 2 hoạt chất. Pic chính trong mẫu thử tinh khiết đối với cả 2 hoạt chất. Do đó quy trình có tính đặc hiệu.



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu trắng (1), chuẩn sulbactam natri (2), mẫu chuẩn ampicillin natri (3), mẫu hỗn hợp chuẩn (4) và mẫu thử (5)



Hình 3. Phổ UV-Vis của mẫu chuẩn ampicillin natri và sulbactam natri (1), mẫu thử ampicillin natri và sulbactam natri (2), phổ tinh khiết của pic sulbactam natri của mẫu thử (3) và phổ tinh khiết của pic ampicillin natri của mẫu thử (4)

Khoảng tuyến tính

Pha 6 dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ khoảng 20 - 500 ppm cho ampicillin natri và từ 10 - 250 ppm cho sulbactam natri. 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 cho thấy sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích đỉnh với hệ số tương quan $R2 \geq 0,999$. Kết quả được thể hiện trong bảng 5. Quy trình đạt tính tuyến tính.

Độ đúng và độ chính xác

Độ phục hồi trung bình của ampicillin natri 99,97 - 100,93% và của sulbactam natri từ 99,83 - 101,20%, độ phục hồi của phương pháp đều nằm trong khoảng cho phép từ 98 - 102% và có RSD $\leq 2,0\%$, và quy trình có độ chính xác cao (RSD $\leq 2,0\%$). Từ kết quả bảng 7 ta thấy rằng quy trình đạt độ đúng và độ chính xác cao.

Bảng 7. Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác và tính tuyến tính của ampicillin natri và sulbactam natri

Chỉ tiêu thẩm định	Giá trị thống kê	
	Ampicillin natri	Sulbactam natri
Phương trình hồi qui	$y = 20692x + 19492$ $R2 = 0,9997$	$y = 6518x + 2388,6$ $R2 = 0,9998$
Khoảng tuyến tính	20 - 500 ppm	10 - 250 ppm
Độ lặp lại (n = 6)	0,29%	0,70%
Độ đúng	99,97 - 100,93%	99,83 - 101,20%

3.3. Ứng dụng quy trình để định lượng thuốc bột pha tiêm chứa ertapenem natri, thuốc bột pha tiêm chứa đồng thời hai hoạt chất ampicillin natri và sulbactam natri đang lưu hành trên thị trường.

Quy trình phân tích sau khi thẩm định đã được ứng dụng để định lượng: Chế phẩm 1 là thuốc bột pha tiêm chứa ertapenem natri (1,0 g), chế phẩm 2 là thuốc bột pha tiêm chứa đồng thời ampicillin natri (1,0 g) và sulbactam natri (0,5 g) đang lưu hành trên thị trường. Kết quả định lượng được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8. Kết quả định lượng một số chế phẩm trên thị trường

Chế phẩm	Hoạt chất	Hàm lượng trung bình so với hàm lượng nhãn (%)
Chế phẩm 1	Ertapenem natri	99,05%
Chế phẩm 2	Ampicillin natri	100,17%
	Sulbactam natri	100,90%

4. BÀN LUẬN

HPLC là kỹ thuật phân tích có nhiều ưu điểm và rất phổ biến trong ngành Dược. Tuy nhiên, lượng dung môi sử dụng lớn là vấn đề cần được lưu tâm, nhất là đối với các dung môi độc, cần có quy trình xử lý chất thải nghiêm ngặt. Việc thay thế những dung môi độc bằng những dung môi xanh là một giải pháp mạnh mẽ giúp giải quyết những vấn đề về môi trường mà HPLC gây ra.

Hiện nay, các dung môi hữu cơ xanh ngày càng thu hút nhiều sự quan tâm. Các kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy mỗi dung môi đều có ưu nhược điểm riêng và thể hiện những đặc điểm khác nhau khi ứng dụng vào sắc ký. Do đó, việc chọn dung môi xanh phù hợp với chất phân tích đòi hỏi nhiều nỗ lực tìm hiểu, nghiên cứu và thử nghiệm. Các điều kiện sắc ký khác nhau cần được khảo sát để chọn ra điều kiện tối ưu cả về các thông số sắc ký cũng như tổng thời gian phân tích.

Đề tài sử dụng dung môi thay thế là ethanol-dung môi được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về hóa học phân tích xanh hiện nay. Đề tài xây dựng được phương pháp chính xác có độ nhạy cao, khoảng xác định rộng để định lượng ertapenem natri, ampicillin natri và sulbactam natri thuộc nhóm kháng sinh β -lactam bằng HPLC - PDA với kỹ thuật phân tích xanh.

5. KẾT LUẬN

Các kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp HPLC - PDA với kỹ thuật phân tích xanh đã thành công trong việc xây dựng quy trình định lượng một số thuốc tiêm nhóm β -lactam (ertapenem natri, ampicillin natri và sulbactam natri). Phương pháp đã được thẩm định có tính đặc hiệu, độ chính xác và độ đúng cao. Khoảng tuyến tính phù hợp nồng độ định lượng trong thành phẩm với độ tương quan tuyến tính chặt

chẽ giữa nồng độ và diện tích pic trong khoảng nồng độ đã khảo sát. Phương pháp đã được áp dụng để định lượng thuốc bột pha tiêm chứa ertapenem natri (1g), thuốc bột pha tiêm chứa ampicillin natri (1g) và sulbactam natri (0,5g) đang lưu hành trên thị trường.

6. CẢM ƠN

Đề tài nghiên cứu khoa học này được Trường Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch cấp kinh phí thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lima, L.M., Silva, B.N., Barbosa, G., & Barreiro, E (2020), “ β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective”, European journal of medicinal chemistry. 208, p. 112829
- Bộ Y Tế (2015), Dược thư Quốc gia Việt Nam, NXB khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 1666 trang.
- Bộ Y Tế (2017), Dược điển Việt Nam, Tái bản lần 5, NXB Y học, Hà Nội.
- United States Pharmacopeial Convention (2020), USP 43 NF 38, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 8760 pages.
- Briscoe, S. E., McWhinney, B. C., Lipman, J., Roberts, J. A., & Ungerer, J. P. (2012). A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 907, 178–184.
- Çubuk Demiralay, E., Koç, D., Daldal, Y.D., Alsancak, G. and Ozkan, S.A. (2014), Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of

- these compounds in human urine. *Biomed. Chromatogr.*, 28: 660-666.
7. Abdel - Moety, Ezzat & Elragehy, Nariman & Hassan, Nagiba & Rezk, Mamdouh. (2010). Selective Determination of Ertapenem and Imipenem in the Presence of Their Degradants. *Journal of chromatographic science.* 48. 624-30.
 8. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2021), Impurities: guideline for residual solvents Q3C (R8), Switzerland.
 9. Dirgha Raj Joshi, Nisha Adhikari (2019), “An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity”, *Journal of Pharmaceutical Research International.* 28(3), pp. 1 -18.
 10. Yabré M, Ferey L, Somé IT, Gaudin K (2018), “Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solvents for pharmaceutical analysis.”, *Molecules.* 23(5), p. 1065.
 11. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.*50: pp.78-84.
 12. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005), ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Switzerland.
 13. Bộ Y Tế (2018), *Sổ tay đăng ký thuốc*, Hà Nội.