

DOI: 10.59715/pntjimp.2.3.21

Xây dựng quy trình định lượng một số kháng sinh nhóm Cephalosporin thế hệ 2 bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA dùng kĩ 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: Cefuroxime natri (CFRX) và cefaclor (CFC) là kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 2, được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) dùng pha động chứa methanol hoặc acetonitril theo Dược điển Việt Nam V. Methanol và acetonitril là dung môi độc theo phân loại của ICH. Do đó phát triển phương pháp phân tích xanh để định lượng CFRX và CFC là vấn đề cần thiết.

Đối tượng - Phương pháp: Pha động sử dụng dung môi hữu cơ là ethanol - một dung môi xanh, an toàn cho kiểm nghiệm viên và thân thiện với môi trường. Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký khác nhau để thu được điều kiện sắc ký 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 CFRX và CFC 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 CFRX và 4,0 cho CFC, nồng độ đệm là 25 mM/l đối với CFRX và 15 mM/l với CFC, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, bước sóng phát hiện lần lượt là 273 và 265 nm cho CFRX và CFC. Các phương pháp đạt tất cả các thông số thẩm định và đã được ứng dụng để phân tích một số chế phẩm đang lưu hành trên thị trường có chứa các chất phân tích.

Kết luận: Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình định lượng hai kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 2 (cefuroxime natri và cefaclor) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò PDA sử dụng kĩ thuật phân tích xanh.

Từ khóa: Cefuroxime natri, cefaclor, hóa học phân tích xanh, HPLC - PDA.

Abstract

Determination of some 2nd cephalosporin antibiotics by HPLC-PDA method using a green analytical technique

Background: Cefuroxime sodium (CFRX) and cefaclor (CFC) belong to the 2nd generation of cephalosporin antibiotics. According to the 5th Vietnamese Pharmacopoeia, CFRX and CFC are quantified by HPLC using methanol or acetonitrile as organic modifier in the mobile phase. As the ICH categorizes methanol and acetonitrile as toxic solvents, it is critical to develop green analytical methods for the determination of CFRX and CFC.

Methods: This research used ethanol as a green organic modifier in the mobile phase, which is safe for the analysts and the environment. Different

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

chromatographic conditions were investigated to obtain 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 appropriate conditions for the determination of CFRX and CFC by HPLC - PDA were conducted on the Sunfire C18 (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) column at 30°C, the mobile phase consisted of ethanol and ammonium acetate (9:91, v/v), pH of mobile phase was 6.0 for CFRX and 4.0 for CFC, the buffer's concentration was 25 mM/l for CFRX and 15 mM/l for CFC, the flow rate was 1,0 ml per minute, the injection volume was 10 μ l and the detection wavelength was 273 and 265 nm for CFRX and CFC, respectively. The proposed method achieved all recommended validation criteria and was successfully employed to analyze commercial products containing the studied analytes.

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

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography - HPLC) đã trở thành một trong những kỹ thuật phổ biến nhất trong phân tích, kiểm nghiệm dược phẩm. Trong đó, sắc ký lỏng pha đảo thường sử dụng methanol và acetonitril làm dung môi pha động do các đặc điểm phù hợp cho sắc ký của hai dung môi này, như khả năng rửa giải tốt, độ nhớt thấp, ít hấp thụ UV [1]. 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 [2]. Độc tính của hai dung môi này gây nên những tác động nghiêm trọng đối với sức khỏe. 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 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 [3].

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. 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 [4 - 6]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, phân tích xanh vẫn còn là một lĩnh vực mới.

Kháng sinh nhóm β -lactam là nhóm thuốc quan trọng trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn, với các phân nhóm: penicillin, cephalosporin, carbapenem và monobactam. Nhóm cephalosporin thế hệ 2 được phát triển nhằm tăng hoạt tính trên vi khuẩn Gram (-). Trong đó, cefuroxim natri (CFRX) được bào chế dạng thuốc tiêm, được chỉ định trong điều trị nhiễm khuẩn thể nặng đường hô hấp dưới (kể cả viêm phổi), nhiễm khuẩn da và mô mềm, nhiễm khuẩn xương và khớp, nhiễm khuẩn thể nặng tiết niệu - sinh dục, nhiễm khuẩn máu và viêm màng não do các vi khuẩn nhạy cảm gây ra. Cefaclor (CFC) là kháng sinh cephalosporin thế hệ 2 được bào chế dạng viên nang, được chỉ định trong các trường hợp nhiễm khuẩn đường hô hấp trên và hô hấp dưới mức độ nhẹ và vừa: viêm tai giữa cấp, viêm xoang cấp, viêm họng, viêm amidan tái phát nhiều lần, viêm phế quản cấp có bội nhiễm, viêm phổi, đợt bùng phát của viêm phế quản mạn tính [7]. Hiện nay, theo Dược điển Việt Nam và Dược điển Mỹ, thuốc tiêm chứa hoạt chất CFRX và viên nang chứa hoạt chất CFC được kiểm nghiệm bằng phương pháp HPLC, sử dụng pha động có chứa acetonitril hoặc methanol [8, 9].

Xuất phát từ vai trò thực tiễn của CFRX và CFC trong điều trị, cũng như sự phát triển của hóa học phân tích xanh trên thế giới và sự quan tâm của xã hội về vấn đề bảo vệ môi trường và sức khỏe con người, từ đó cho thấy

việc xây dựng quy trình định lượng thuốc tiêm cefuroxim natri và viên nang cefaclor 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

Đối tượng nghiên cứu

Chế phẩm thuốc bột pha tiêm chứa hoạt chất CFRX và chế phẩm thuốc viên nang chứa hoạt chất CFC đang lưu hành trên thị trường.

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	Nhà sản xuất
Chất chuẩn cefuroxime natri	Viện kiểm nghiệm thuốc TPHCM
Chất chuẩn cefaclor	Viện kiểm nghiệm thuốc TPHCM
Ethanol (HPLC)	Scharlau
Acid acetic	Merck
Amoni acetat	Merck

Phương pháp nghiên cứu

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 273 nm đối với CFRX và 265 nm đối với CFC. 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.

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, 25 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: 25, 30 và 35°C.

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 CFRX và CFC 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 được pha loãng từ dung dịch chuẩn gốc để đạt được nồng độ định lượng dùng xây dựng quy trình phân tích và thẩm định quy trình.

Dung dịch thử

Dung dịch thử CFRX: Cân một lượng bột thuốc tương ứng với 10,0 mg cefuroxim natri cho vào bình định mức 100 ml, thêm nước cất tới vạch, lắc đều. Dung dịch thu được lọc qua màng lọc 0,45µm.

Dung dịch thử CFC: Cân bột thuốc trong 20 viên nang, tính khối lượng bột thuốc trung bình (m_{tb}) trong một viên. Cân một lượng bột thuốc tương ứng với 10 mg cefaclor cho vào bình định mức 100 ml, thêm nước cất tới vạch, lắc đều. Dung dịch thu được có nồng độ là 100 ppm. Dung dịch này được lọc qua màng lọc 0,45µm.

Mẫu trắng: Nước cất.

Thẩm định quy trình

Sau khi tìm được điều kiện sắc ký thích hợp, sẽ tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của ICH [10] và Sổ tay đăng ký thuốc của Cục quản lý Dược [11], bao gồm khảo sát tính phù hợp hệ thống, độ chọn lọc, tính 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.

3. KẾT QUẢ

Điều kiện sắc ký

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

Điều kiện khảo sát		Chất phân tích	tR	S pic	As	N	K'
pH	pH 4	CFRX	20,233	2121296	1,27	11620	12,48
		CFC	10,668	1133849	0,982	11465	6,11
	pH 5	CFRX	18,689	1978647	1,24	11400	11,5
		CFC	12,907	1232678	0,980	12254	7,604
	pH 6	CFRX	17,155	2020706	1,24	11460	10,4
		CFC	16,945	1114116	1,01	12671	10,23
Nồng độ đệm (mM/l)	15	CFRX	19,691	1693731	1,36	10790	12,12
		CFC	11,231	1109178	0,983	11556	6,49
	25	CFRX	17,155	2020706	1,24	11460	10,4
		CFC	10,668	1133849	0,982	11465	6,11
	35	CFRX	16,195	2036260	1,205	10860	9,8
		CFC	10,803	1103860	0,988	11451	6,20
3:97	CFRX	33,19	45144	1,02	13800	21,14	
	CFC	11,231	1109178	0,983	11556	6,49	

Điều kiện khảo sát		Chất phân tích	tR	S pic	As	N	K'
Tỷ lệ ethanol - đệm	6:94	CFRX	17,155	2020706	1,24	11400	10,4
		CFC	24,790	1124343	0,961	13445	15,53
	9:91	CFRX	8,307	2082737	1,2	9070	4,54
		CFC	6,131	1146042	1,01	9663	3,09
Nhiệt độ cột (°C)	25	CFRX	10,476	2073124	1,19	8042	5,98
		CFC	7,493	1143369	1,01	8458	3,99
	30	CFRX	9,342	2063627	1,2	8587	5,23
		CFC	6,908	1129071	1,01	9078	3,61
	35	CFRX	8,307	2082737	1,2	9070	4,54
		CFC	6,131	1146042	1,01	9663	3,09

Với những kết quả trên, điều kiện sắc ký phù hợp để định lượng CFRX và CFC là cột Sunfire C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) cài đặt ở 30°C đối với CFRX và 25°C đối với CFC, pha động gồm ethanol - dung dịch đệm acetat (9:91, tt/tt) với tốc độ dòng 1 ml/phút, pH pha động là 6,0 đối với CFRX và 4,0 đối với CFC, nồng độ đệm là 25 mM/l đối với CFRX và 15 mM/l đối với CFC, thể tích tiêm là 10 µl, bước sóng phát hiện là 273 nm đối với CFRX và 265 nm đối với CFC.

Thẩm định quy trình

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký 6 lần với các dung dịch chuẩn nồng độ 100 ppm của CFRX và CFC. Kết quả thu được trong Bảng 4.

Bảng 4. Tính phù hợp hệ thống của CFRX và CFC

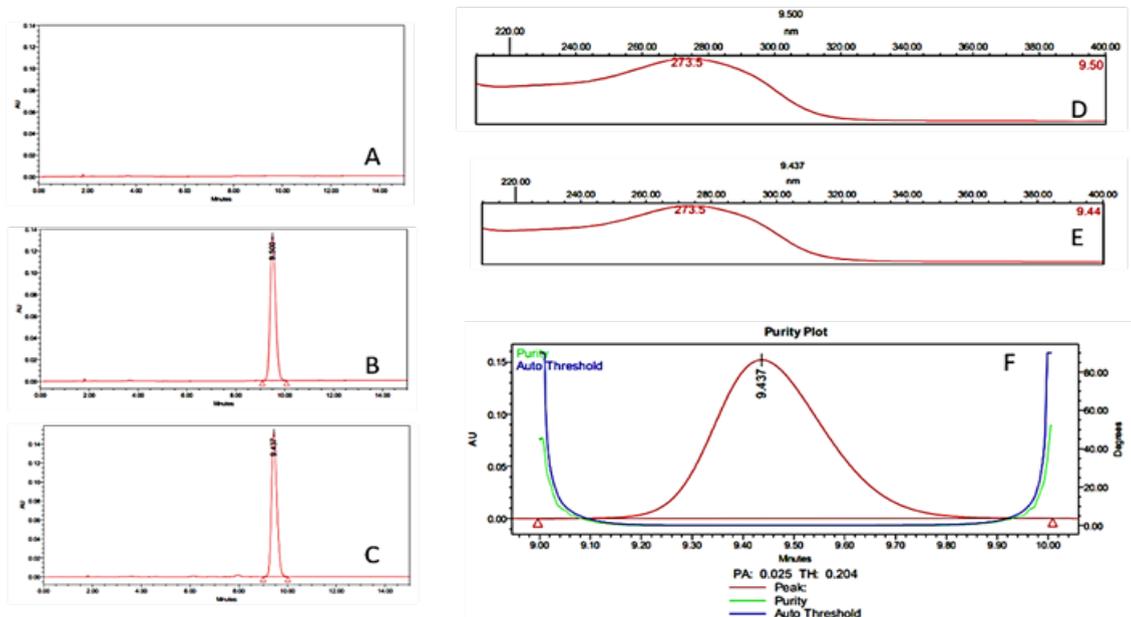
	RSD% của tR	RSD% của S pic	As trung bình	N trung bình
CFRX	0,135	1,329	1,198	8615
CFC	0,329	0,181	1,01	8454

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. Như vậy điều kiện sắc ký phù hợp cho việc định lượng CFRX và CFC.

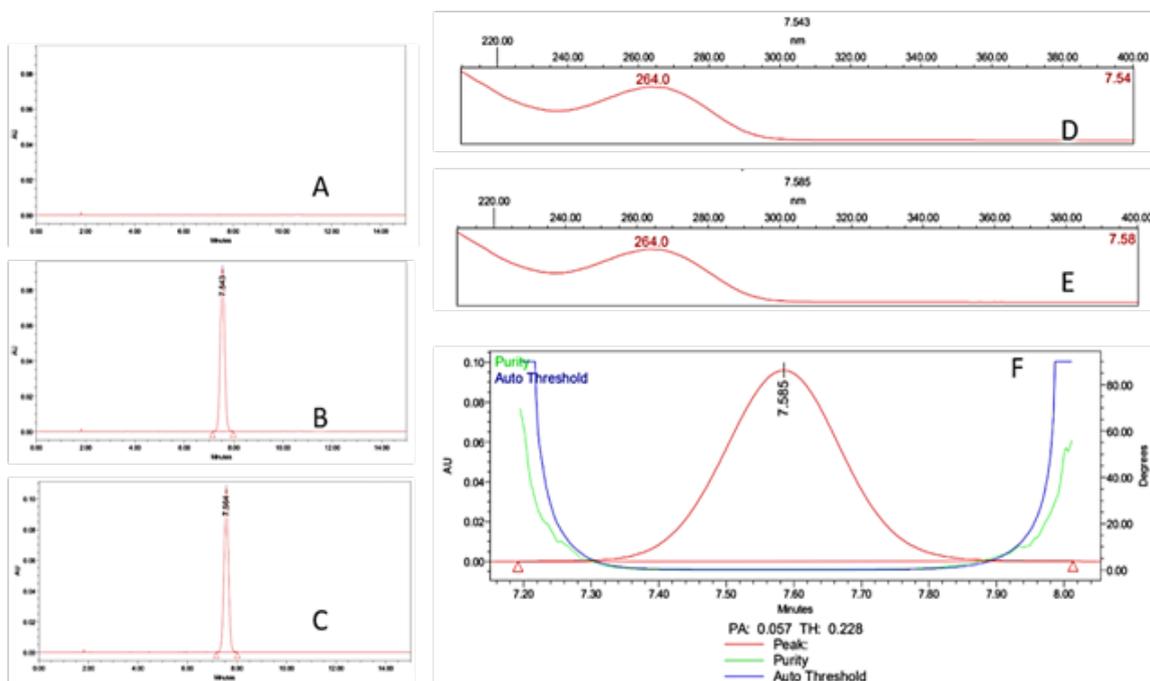
Tính đặc hiệu

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 1. Sắc ký đồ mẫu trắng (A) mẫu chuẩn CFRX (B), mẫu thử CFRX (C); Phổ UV- Vis của mẫu chuẩn (D) và mẫu thử (E), phổ tinh khiết pic của mẫu thử (F)



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

Tính tuyến tính

Pha 6 dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 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 5. Quy trình đạt tính tuyến tính.

Độ đúng và độ chính xác

Độ phục hồi trung bình của CFRX từ 99,12 - 100,10% và của CFC từ 99,58 - 102,18%, 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.

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

Chỉ tiêu thẩm định	Giá trị thống kê	
	CFRX	CFC
Phương trình hồi quy	$y = 21354x + 22272$ $R^2 = 0,9999$	$y = 13032x - 26511$ $R^2 = 0,9999$
Khoảng tuyến tính	20 - 500 ppm	20 - 500 ppm
Độ lặp lại (n = 6)	0,97%	0,61%
Độ đúng	99,12 - 100,10%	99,58 - 102,18%

Ứng dụng quy trình để định lượng thuốc bột pha tiêm chứa CFRX và viên nang chứa CFC 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 CFRX (750 mg), chế phẩm 2 là thuốc viên nang chứa CFC (500mg) đang lưu hành trên thị trường. Kết quả định lượng được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. 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	CFRX	100,75
Chế phẩm 2	CFC	100,36

4. BÀN LUẬN

Phương pháp phân tích xanh ngày càng được quan tâm và sử dụng rộng rãi để phân tích dược phẩm. So với các dược điển sử dụng methanol hoặc acetonitril làm dung môi pha động để định lượng CFRX và CFC, nghiên cứu này đã thay thế dung môi pha động thành ethanol. Ethanol là một dung môi xanh, an toàn, giúp bảo vệ môi trường và sức khỏe của kiểm nghiệm viên. Tỷ lệ ethanol trong pha động thấp (dưới 10%) giúp tiết kiệm dung môi hóa chất cũng như giảm chi phí xử lý chất thải. Thời gian phân tích ngắn, quy trình chuẩn bị mẫu đơn giản giúp nâng cao năng suất lao động và hiệu quả công việc.

Quy trình đạt các chỉ tiêu thẩm định và thành công áp dụng để phân tích mẫu chế phẩm đang lưu hành trên thị trường. Qua đó khẳng định khả năng ứng dụng của phương pháp trong thực tế.

5. KẾT LUẬN

Các kết quả thực nghiệm cho thấy đã xây dựng thành quy trình định lượng hai kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 2 là CFRX và CFC bằng phương pháp HPLC-PDA với kỹ thuật phân tích xanh. Phương pháp đã được thẩm định

có tính đặc hiệu, đạt độ chính xác và độ đúng. Khoảng tuyến tính phù hợp, tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích. Phương pháp đã được áp dụng để định lượng thuốc bột pha tiêm chứa cefuroxim natri (750mg), thuốc viên nang chứa cefaclor (500mg) đang lưu hành trên thị trường.

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

- Dong, M.W., HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. 2019: John Wiley & Sons.
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Impurities: guideline for residual solvents Q3C (R8). 2021: Switzerland.
- Joshi, D. and N. Adhikari, An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. Journal of Pharmaceutical Research International, 2019: p. 1-18.

4. Elzanfaly, E.S., et al., Validated green high-performance liquid chromatographic methods for the determination of coformulated pharmaceuticals: A comparison with reported conventional methods. *Journal of Separation Science*, 2015. 38(5): p. 757-763.
5. MoHaMed, H.M. and N.T. Lamie, Analytical eco-scale for assessing the greenness of a developed RP-HPLC method used for simultaneous analysis of combined antihypertensive medications. *Journal of AOAC International*, 2016. 99(5): p. 1260-1265.
6. Ferretti, R., et al., Green high-performance liquid chromatography enantioseparation of lansoprazole using a cellulose-based chiral stationary phase under ethanol/water mode. *Journal of Separation Science*, 2016. 39(8): p. 1418-1424.
7. Bộ Y Tế, Dược thư Quốc gia Việt Nam. 2015, Hà Nội NXB Khoa học và Kỹ thuật.
8. Bộ Y Tế, Dược điển Việt Nam V. Vol. Tập I 2017, Hà Nội: NXB Y học 1078 trang.
9. United States Pharmacopeial Convention, USP 43 NF 38. 2020, Rockville. 8760 pages.
10. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005: Switzerland.
11. Bộ Y Tế, Sổ tay đăng ký thuốc 2018: Hà Nội.