

Phân tích định lượng Cephalexin trong bột pha hỗn dịch 250 mg bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Thu Thảo

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
 nguyentthao@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu ứng dụng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép cặp ion [Ion pair High Performance Liquid Chromatography - (IP-HPLC)] với ưu điểm nổi bật có độ tin cậy và chính xác cao để xác định hàm lượng Cephalexin (CPN) trong bột pha hỗn dịch. CPN là một chất zwitterion (ion có các nhóm tích điện dương và âm riêng biệt) và mức độ ion hoá của CPN ảnh hưởng đến sự lưu giữ hợp chất trong cột sắc kí pha đảo được thể hiện qua khảo sát nồng độ dung dịch đệm tại pH = 3,0 và pH = 7,0. Kết quả nghiên cứu đã đạt được tối ưu thành phần pha động có pH = 3,0 tăng khả năng lưu giữ chất phân tích trong cột sắc kí, đồng thời tối ưu điều kiện sắc kí với tốc độ dòng 1,5 mL.phút⁻¹ thu được trên sắc kí đồ (HPLC) có peak đối xứng với hệ số kéo đuôi 0,993 và phần trăm độ lệch chuẩn tương đối ± 0,12 %. Quá trình phân tích được thực hiện trên cột sắc kí pha đảo RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), thành phần pha động có pH = 3,0 với kiểu rửa giải đẳng dòng (isocratic). Dung dịch mẫu sau khi ra khỏi cột sắc kí được phát hiện ở bước sóng 254 nm. Khoảng tuyến tính (0,102 - 0,812) mg. mL⁻¹ với R² = 1. Độ lặp lại về hàm lượng 100,7 và độ lệch chuẩn tương đối của mẫu là ± 0,16 %. Độ đúng phương pháp trong khoảng (99,11 - 100,49) % và %RSD = 0,66. Phương pháp đề xuất này có thể áp dụng để xác định hàm lượng CPN trong bột pha hỗn dịch.

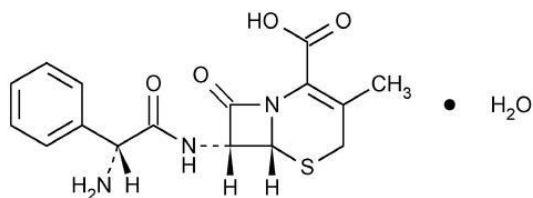
Nhận 18.04.2021
 Được duyệt 07.06.2021
 Công bố 15.07.2021

Từ khóa
 định lượng Cephalexin
 bột pha hỗn dịch,
 phương pháp HPLC
 kháng sinh, sắc kí ghép
 cặp ion (IPC), thẩm định

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Cephalexin (CPN) là một kháng sinh Cephalosporin thế hệ đầu tiên, được biết là có tác dụng kháng khuẩn chống lại vi khuẩn gram dương và gram âm. Vì vậy, dùng để diệt khuẩn trong điều trị một số trường hợp bệnh do Gram (+) gây ra như: nhiễm khuẩn Tai-Mũi-Họng do liên cầu khuẩn *Streptococcus pyogenes*, viêm phế quản do *Streptococcus pneumoniae*. Ngoài ra, còn có phối hợp điều trị trong một số nhiễm khuẩn Gram âm do *Neisseria*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Do đó, CPN được dùng để điều trị nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng đường hô hấp (bao gồm viêm xoang, viêm tai giữa, viêm họng, viêm amidan, viêm phổi và viêm phế quản), nhiễm trùng da và mô mềm.



Hình 1 Công thức cấu tạo của Cephalexin (CPN)

CPN (tên hóa học 7-(D-α-Amino-α-phenylacetamido)-3-methyl-3-cephem-4-carboxylic axit monohydrate), công thức thực nghiệm C₁₆H₁₇N₃O₄.S.H₂O và khối lượng phân tử 365,41 g.mol⁻¹. CPN là một chất zwitterion do có nhóm amino-axit và pH đẳng điện của CPN khoảng (4,5 - 5,0) [1].

Theo các tài liệu nghiên cứu, các phương pháp phân tích khác nhau được nghiên cứu để xác định hàm lượng CPN như Phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại–khả kiến (UV-Vis) và sắc kí lỏng hiệu năng cao ghép cặp ion (RP–HPLC) [2,3,4,5]. Tuy nhiên, chưa có tài liệu nào khảo sát ảnh hưởng của pH trong thành phần pha động đến khả năng lưu giữ chất phân tích trong cột sắc kí và dạng đỉnh (peak) trong sắc kí đồ HPLC. Trong nghiên cứu này, khảo sát ảnh hưởng của pH trong thành phần pha động tại pH = 3,0 và pH = 7,0 để đánh giá mức độ ion hóa của CPN khi ghép cặp với thuốc thử mang điện tích âm là natri–1–pentanesulfonat ($R'-SO_3^-$) có trong thành phần pha động. Hơn nữa, hai giá trị pH này được xem là giới hạn pH thấp và cao cho sự ổn định của cột sắc kí. Bên cạnh đó, thực hiện tối ưu tốc độ dòng gồm (1,0; 1,5 và 2,0) của hệ thống sắc kí bằng cách sử dụng cột sắc kí pha đảo RP–18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) và thành phần pha động có pH = 3,0 với kiểu rửa giải đẳng dòng (isocratic), dùng đầu dò PDA tại $\lambda_{max} = 254$ nm. Từ đó, thẩm định quy trình phân tích để xác định hàm lượng CPN trong bột pha hỗn dịch bằng phương pháp sắc kí lỏng ghép cặp ion (IP-HPLC).

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Dung môi: acetonitrile, methanol, triethylamin, axit photphoric (H_3PO_4), natri–1–pentanesulfonat (tất cả dung môi trên đều là của Merck), nước cất. Chất chuẩn CPN, hàm lượng nguyên trạng là 94,51 % (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

2.1.2 Thiết bị: máy HPCL (Shimadzu), cân phân tích Shimadzu với độ chính xác 0,0001 g. Bộ lọc rút chân không của hãng Agilent. Bể siêu âm Công ty Shimadzu. Cột sắc kí RP–18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện tối ưu cho hệ thống sắc kí HPLC

2.2.1.1 Khảo sát tốc độ dòng của điều kiện sắc kí
Phương pháp HPLC có đại lượng thời gian lưu (t_R) là thời gian để một chất tách ra khỏi cột sắc kí và được phát hiện bằng đầu dò. Vì vậy, thời gian lưu của chất phân tích phụ thuộc vào tốc độ dòng, thành phần và môi trường pH của pha động, độ phân cực của chất phân tích. Tốc độ dòng ảnh hưởng nhiều đến thời gian lưu trong HPLC, nếu tốc độ dòng cao, nó làm giảm

khả năng lưu giữ và nếu tốc độ dòng thấp thì nó làm tăng độ lưu giữ của mẫu trong cột sắc kí. Tốc độ dòng là một thông số hữu ích để điều chỉnh độ lưu giữ, nhưng đôi khi nó ảnh hưởng đến các thông số liên quan đến hệ thống sắc kí như số đĩa lí thuyết, hệ số đuôi, thời gian lưu [6]. Do đó, cần phải tối ưu tốc độ dòng phù hợp với các điều kiện sắc kí. Giá trị khảo sát tốc độ dòng: (1,0; 1,5 và 2,0) mL.min⁻¹.

Bảng 1 Các điều kiện với cột sắc kí RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m)

Nhiệt độ lò cột	40 °C
Thể tích tiêm	20 μ L
Bước sóng phát hiện	254 nm
Dung dịch chuẩn	Nồng độ 0,4 mg. mL ⁻¹
Pha động	Dung dịch đệm pH = 3,0

Dung dịch đệm pH = 3,0: hòa tan 0,985 g natri–1–pentanesulfonat trong hỗn hợp gồm acetonitril, methanol, triethylamin và nước theo tỉ lệ (20 : 10 : 3 : 170; v/v), dùng dung dịch axit photphoric điều chỉnh về pH = (3,0 \pm 0,1).

Dung dịch chuẩn CPN nồng độ khoảng 0,4 mg. mL⁻¹: cân chính xác 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng nước cất đến vạch và trộn đều. Lấy 4 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng bằng pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μ m [7].

2.2.1.2 Khảo sát ảnh hưởng pH trong thành phần pha động

Ứng dụng kĩ thuật sắc kí ghép cặp ion để phân tích hoạt chất CPN trong thuốc bột pha hỗn dịch bằng phương pháp HPCL. CPN là hợp chất phân cực mạnh (LogP = 0,6) nên sẽ khó lưu giữ trên cột sắc kí pha đảo. Theo các nghiên cứu, CPN là chất zwitterion có $pK_{a1} = 3,1$ do có nhóm carboxyl và $pK_{a2} = 6,8$ do có nhóm amino. Do đó, CPN có thể ghép cặp với tác nhân anion hoặc cation tùy thuộc vào pH môi trường. Vì vậy, thẩm định quy trình định lượng CPN dùng kĩ thuật sắc kí ghép cặp ion.

Phương pháp sắc kí lỏng ghép cặp ion (IP-HPLC) dùng loại pha tĩnh và pha động giống như phương pháp sắc kí lỏng pha đảo (RP-HPLC). Đặc điểm chính của IP-HPLC là thuốc thử ghép cặp ion được thêm vào pha động. Thuốc thử ghép cặp ion thường là alkylsulfonat, alkylsulfat, chất tạo cặp ion phải mang điện tích trái dấu với chất phân tích và có tính kỵ nước. Chất phân tích mang điện tích dương (BH^+) sẽ tương tác với thuốc thử mang điện tích âm là natri–1–pentanesulfonat ($R'-$

SO_3^-) tạo thành cặp ion trong pha động. Nó tạo thành cặp ion và quá trình tách được thực hiện trong cột sắc kí theo cơ chế sắc kí lỏng pha đảo [8].

Giá trị pH pha động trong HPLC là một yếu tố rất quan trọng, nó có thể ảnh hưởng đến dạng peak cũng như thời gian lưu của chất phân tích vì nó ảnh hưởng đến trạng thái ion hóa của chất phân tích. Vì vậy, phải duy trì ổn định pH của thành phần pha động trong điều kiện sắc kí. Triethylamine là chất điều chỉnh pha động, nhưng chúng không duy trì độ pH, cần thêm một axit yếu để tạo thành một dung dịch đệm. Dung dịch đệm chứa hỗn hợp của một bazơ yếu và axit liên hợp nên dùng dung dịch axit photphoric để điều chỉnh pH. Do đó, khảo sát tại đệm pH = 3,0 và pH = 7,0.

Dung dịch đệm pH = 3,0: hòa tan 0,985 g natri-1-pentanesulfonat trong hỗn hợp gồm acetonitril, methanol, triethylamin và nước theo tỉ lệ (20 : 10 : 3 : 170; v/v), dùng dung dịch axit photphoric điều chỉnh về pH = 3,0.

Pha dung dịch chuẩn CPN tại pH = 3,0: Cân chính xác 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng nước cất đến vạch, trộn đều. Lấy 4 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng bằng pha động (pH = 3,0) đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm . Chuẩn CPN nồng độ khoảng 0,4 mg. mL^{-1} .

Dung dịch đệm pH = 7,0: hòa tan 0,985 g natri-1-pentanesulfonat trong hỗn hợp gồm acetonitril, methanol, triethylamin và nước theo tỉ lệ (20 : 10 : 3 : 170; v/v), dùng dung dịch axit photphoric điều chỉnh về pH = 7,0.

Pha dung dịch chuẩn CPN tại pH = 7,0: cân chính xác 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng nước cất đến vạch, trộn đều. Lấy 4 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng bằng pha động (pH = 7,0) đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm . Chuẩn CPN nồng độ khoảng 0,4 mg. mL^{-1} .

Tiêm các dung dịch mẫu chuẩn ở hai môi trường pH tương ứng với thành phần pha động pH = 3,0 và pH = 7,0 vào hệ thống máy HPLC.

2.2.2 Xây dựng phương pháp định lượng

Một quy trình phân tích định lượng được áp dụng trong dược phẩm, điều kiện yêu cầu là phải thẩm định phương pháp đó phù hợp với đối tượng mẫu và điều kiện phòng thí nghiệm. Thẩm định quy trình phân tích gồm tính tương thích của hệ thống, tính tuyến tính, độ

đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp đạt yêu cầu phân tích theo hướng dẫn nội dung và phương pháp của Hội nghị Hải hòa Quốc tế (ICH-International Conference on Harmonization) [9, 10].

2.2.2.1 Tính tương thích của hệ thống sắc kí

Pha dung dịch chuẩn CPN có nồng độ khoảng 0,4 mg. mL^{-1} : cân chính xác 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng nước cất đến vạch, trộn đều. Lấy 4 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng bằng pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Yêu cầu đạt được gồm phần trăm độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của hệ số kéo đuôi peak CPN và các lần tiêm lặp không quá 2,0 %.

2.2.2.2 Tính tuyến tính

Mục đích khảo sát là tìm khoảng làm việc tuyến tính phù hợp với chất phân tích và khả năng đáp ứng của đầu dò để phương pháp đạt độ chính xác và tin cậy cao.

Dung dịch chuẩn gốc CPN: cân chính xác 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, bổ sung nước cất vừa đủ thể tích và trộn đều. Pha các dung dịch chuẩn có nồng độ tương ứng (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 và 0,8) mg. mL^{-1} . Tiến hành tiêm các dung dịch vào hệ thống máy HPLC: xây dựng đường chuẩn $y = ax + b$ với trục x biểu thị nồng độ và trục y là diện tích peak của mỗi mẫu chuẩn CPN. Xác định hệ số tương quan (r) giữa diện tích peak và nồng độ, kết quả cho $R^2 = 1$ (yêu cầu $R^2 \geq 0,995$).

2.2.2.3 Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu hay tính chọn lọc của một quy trình phân tích là xác định độ chính xác và độ chọn lọc của chất cần phân tích mà không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của chất khác (tá dược, tạp chất, sản phẩm phân hủy, ...) có trong mẫu thử.

Để đảm bảo tính đặc hiệu của phương pháp phân tích: mẫu thử có kết quả dương tính bằng cách so sánh thời gian lưu của chất phân tích (mẫu thử) so với chất chuẩn và kết quả âm tính đối với mẫu giả dược (placebo).

Pha dung dịch chuẩn CPN nồng độ 4 mg. mL^{-1} .

Pha mẫu placebo gốc: tạo placebo tá dược tương ứng với 20 phần, nghiền mịn và trộn đều. Cân chính xác một lượng bột placebo tương ứng với 200 mg CPN cho vào bình định mức 50 mL, thêm 30 mL nước cất và siêu âm để hòa tan mẫu. Pha loãng bằng nước cất vừa đủ tới vạch và trộn đều.

Mẫu placebo: lấy chính xác 1 mL dung dịch mẫu placebo gốc cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng bằng pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu thêm chuẩn CPN vào mẫu placebo: lấy chính xác 1 mL dung dịch chuẩn nồng độ 4 mg. mL⁻¹ và 1 mL dung dịch placebo gốc cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu thử: lấy 20 phần, cân tính khối lượng trung bình của bột thuốc trong phần, nghiền mịn, trộn đều. Cân chính xác 1 lượng bột chế phẩm đã nghiền mịn tương ứng với 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng nước cất đến vạch, trộn đều. Lấy 4 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng với pha động tới vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Tiêm riêng biệt 20 μL mỗi dung dịch trên vào hệ thống sắc kí và ghi nhận các sắc kí đồ HPLC.

Yêu cầu đạt được: phương pháp có tính chọn lọc khi sắc kí đồ HPLC của dung dịch mẫu placebo, không có peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chuẩn CPN trong mẫu chuẩn. Sắc kí đồ của mẫu thử, có 1 peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak CPN trong mẫu chuẩn. Độ lệch thời gian lưu mẫu chuẩn và thử không quá 1,0 %.

2.2.2.4 Độ lặp lại

Xác định độ chính xác được thực hiện định lượng 6 lần với 6 mẫu thử khác nhau.

Dung dịch mẫu thử: lấy 20 phần, cân, tính khối lượng trung bình của bột thuốc trong phần, nghiền mịn, trộn đều (khối lượng trung bình là 3 026,30 mg). Cân chính xác 1 lượng bột chế phẩm đã nghiền mịn tương ứng với 50 mg CPN vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng nước cất đến vạch, trộn đều. Lấy 4 mL dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL, pha loãng với pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Yêu cầu hàm lượng hoạt chất khoảng (95 - 104) %. Phần trăm độ lệch chuẩn tương đối hàm lượng không quá 2,0 %.

Giá trị trung bình:
$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{6}$$

Độ lệch chuẩn (Standard Deviation):

$$SD = S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{5}}$$

Độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation) hay hệ số phân tán (Coefficient of Variation):

$$\%RSD = CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Hàm lượng CPN trong bột pha hỗn dịch so với hàm lượng ghi trên nhãn, tính theo công thức:

$$\%HL = \frac{S_T}{S_C} \times m_C \times \frac{P}{100} \times \frac{\text{ĐPL}_T}{\text{ĐPL}_C} \times \frac{m_{TB}}{m_T} \times \frac{100}{HLN}$$

Trong đó:

S_C , S_T : diện tích peak của mẫu chuẩn, thử.

m_{TB} : khối lượng trung bình của 20 phần

m_C , m_T : khối lượng cân của mẫu chuẩn, thử (mg).

P: % Hàm lượng của CPN chuẩn

ĐPL_C , ĐPL_T : độ pha loãng lần lượt của mẫu chuẩn, thử.

HLN: hàm lượng của CPN trong phần là 250 mg.

2.2.2.5 Độ đúng

Độ đúng phương pháp phân tích là mức độ gần sát của giá trị tìm thấy so với giá trị thực được biểu thị bằng tỉ lệ phục hồi của giá trị tìm thấy của chất chuẩn thêm vào mẫu placebo so với dung dịch chuẩn.

Thêm dung dịch chuẩn vào mẫu placebo và xác định lại nồng độ của chất chuẩn có trong mẫu. Thực hiện trên 3 nồng độ CPN là 80 %, 100 % và 120 % (so với nồng độ lí thuyết). Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu.

Pha dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khoảng 0,8 mg. mL⁻¹: cân chính xác khoảng 80 mg CPN chuẩn vào bình định mức 50 mL, hòa tan, pha loãng bằng nước cất tới vạch và trộn đều. Lấy 10 mL dung dịch chuẩn cho vào bình định mức 20 mL, pha loãng bằng pha động đến vạch và trộn đều.

Pha dung dịch placebo: cân chính xác một lượng bột placebo tương ứng với 200 mg CPN vào bình định mức 50 mL, thêm 30 mL nước cất và lắc siêu âm và pha loãng bằng nước cất đến vạch và trộn đều.

Pha độ đúng 80 %: lấy chính xác 4 mL dung dịch chuẩn gốc và 1 mL dung dịch placebo cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Pha độ đúng 100 %: lấy chính xác 5 mL dung dịch chuẩn gốc và 1 mL dung dịch placebo cho vào bình

định mức 10 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Pha độ đúng 120 %: lấy chính xác 6 mL dung dịch chuẩn gốc và 1 mL dung dịch placebo cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Tiêm riêng biệt 20 μL mỗi dung dịch trên vào hệ thống sắc kí. Ghi nhận các sắc kí đồ.

Tính hàm lượng của hoạt chất chuẩn CPN thêm vào và tìm thấy ở các nồng độ có độ đúng 80 %, 100 % và 120 %. Từ đó, tính % hiệu suất thu hồi (HSTH) của CPN theo công thức:

$$\%HSTH = \frac{m_{TT}}{m_{TV}} \times 100$$

Ghi chú:

m_{TT} : nồng độ (mg. mL⁻¹) của CPN tìm thấy.

m_{TV} : nồng độ (mg. mL⁻¹) của CPN thêm vào.

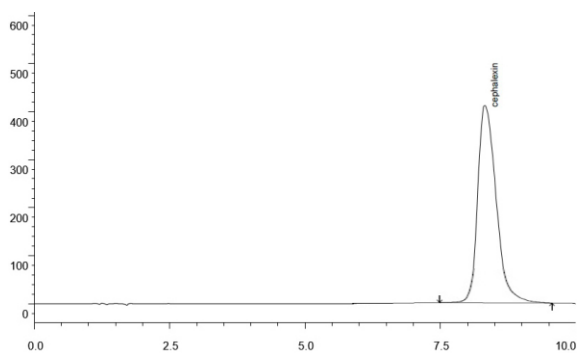
Yêu cầu % hiệu suất phục hồi phải nằm trong khoảng (98,0 – 102,0) % và %RSD độ đúng 9 mẫu (3 nồng độ): ≤ 2,0 %

3 Kết quả nghiên cứu

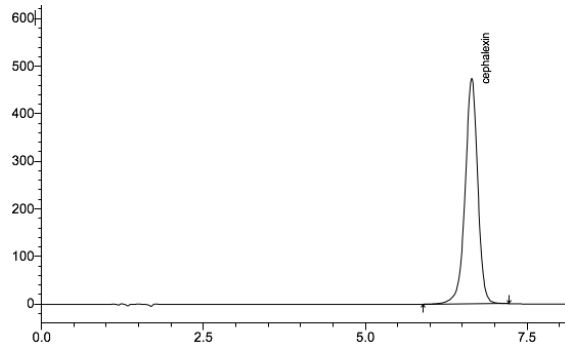
3.1 Khảo sát điều kiện phân tích sắc kí

3.1.1 Khảo sát tốc độ dòng

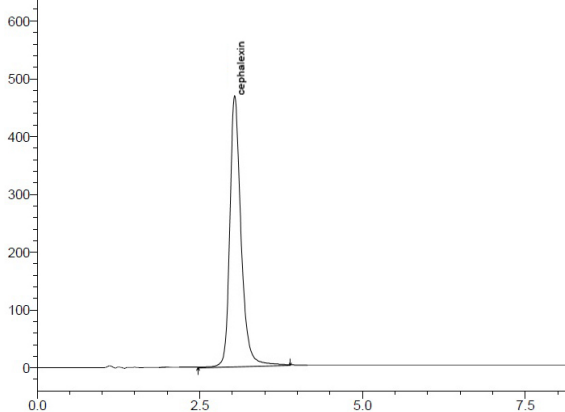
Tiến hành khảo sát theo Mục 2.2.1.1. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Hình 2.



Sắc kí đồ tại tốc độ dòng 1,0 mL.min⁻¹



Sắc kí đồ tại tốc độ dòng 1,5 mL.min⁻¹



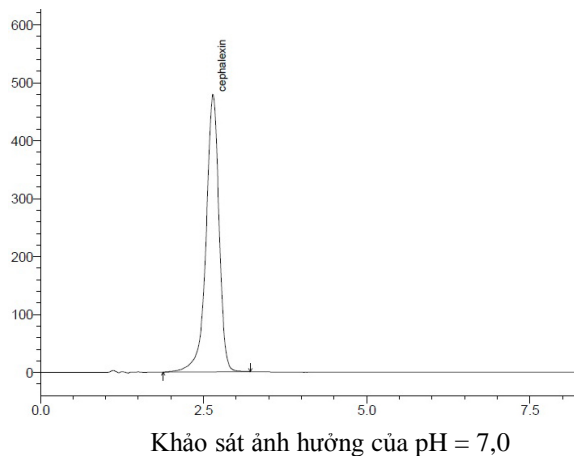
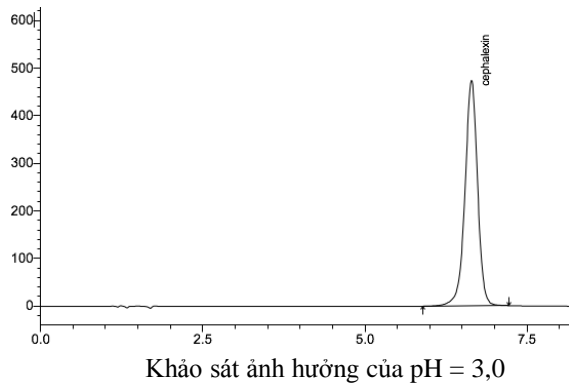
Sắc kí đồ tại tốc độ dòng 2 mL.min⁻¹

Hình 2 Khảo sát tốc độ dòng để tối ưu điều kiện sắc kí

Tốc độ dòng ảnh hưởng lớn đến thời gian lưu và hệ số kéo đuôi. Nếu tốc độ dòng lớn, chất phân tích không đủ thời gian để cân bằng cột sắc kí và sẽ bị hiện tượng kéo đuôi nên tại tốc độ dòng 2 mL.min⁻¹ có hệ số kéo đuôi là 1,312. Ngược lại, nếu tốc độ dòng nhỏ sẽ kéo dài thời gian phân tích và bị ảnh hưởng của quá trình khuếch tán theo chiều dài cột trong phương trình Van deemter được biểu diễn $H = A + B/u + Cu$, trong đó A liên quan đến khuếch tán xoáy (Eddy diffusion), B/u sự khuếch tán theo chiều dọc cột (longitudinal diffusion) của chất tan trong pha động, C là sự truyền khối của chất tan, u là tốc độ dòng. Do đó, chất tan ở trong pha động bị khuếch tán theo chiều dọc cột nên chất phân tích có khả năng khuếch tán càng cao và lưu giữ càng lâu trong cột sắc kí sẽ dẫn đến làm doãng peak nên tại tốc độ dòng 1 mL.min⁻¹ peak bị doãng (Hình 2) [11]. Vì vậy, chọn tốc độ dòng 1,5 mL.phút⁻¹ để tiến hành định lượng CPN vì đáp ứng yêu cầu của sắc kí về dạng peak sắc kí rõ ràng và đối xứng không có hiện tượng kéo đuôi hoặc doãng peak có $A_s = 0,993$ (Bảng 2) nằm trong khoảng yêu cầu hệ số kéo đuôi từ 0,8 đến 1,5.

3.1.2 Khảo sát ảnh hưởng của pH trong sắc kí pha đảo

Tiến hành khảo sát ở 2 môi trường pH = 3,0 và pH = 7,0, cách chuẩn bị các dung dịch được thể hiện ở Mục 2.2.1.2.



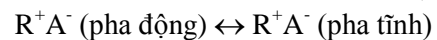
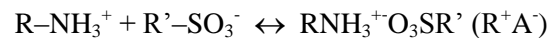
Hình 3 Khảo sát ảnh hưởng của pH trong sắc kí pha đảo

Bảng 2 Kết quả khảo sát ở 2 môi trường pH = 3,0 và pH = 7,0

STT	pH = 3,0		pH = 7,0	
	Thời gian lưu (phút)	Hệ số kéo đuôi	Thời gian lưu (phút)	Hệ số kéo đuôi
1	6,64	0,992	2,61	0,890
2	6,63	0,993	2,78	0,907
3	6,63	0,990	2,51	0,916
4	6,63	0,994	2,45	0,901
5	6,65	0,995	2,74	0,880
6	6,64	0,994	2,54	0,894
TB	6,64	0,993	2,61	0,898
%RSD	0,12	0,18	5,04	1,42

Ứng dụng phương pháp IP-HPLC để xác định hàm lượng CPN trong bột pha hỗn dịch nên mức độ ion hóa của CPN tạo thành anion hoặc cation và khả năng ghép cặp ion với thuốc thử (natri-1-pentanesulfonat) phụ thuộc vào giá trị pH của dung dịch đệm trong

thành phần pha động. Theo phương trình Henderson–1–Hasselbalch biểu diễn mối quan hệ giữa pH dung dịch và pKa của một hợp chất. Khi pH dung dịch thấp hơn hai đơn vị giá trị pK, thì dung dịch gần như bị proton hóa hoàn toàn (99 %) [12]. CPN là một chất zwitterion có một nhóm cacboxyl ($pK_{a1} = 3,1$) và một nhóm amin ($pK_{a2} = 6,8$). CPN là dạng axit amin tồn tại trong dung dịch tùy thuộc vào độ pH, nó có hai dạng, anion và cation. Nếu pH dung dịch nhỏ hơn pH đẳng điện (pHi) thì ion dạng ($R-NH_3^+$) chiếm ưu thế và nhóm cacboxyl không phân li ($R-COOH$) nên tại pH dung dịch nhỏ hơn 4,0 tồn tại dạng cation. Ngược lại, nếu pH dung dịch lớn hơn pH đẳng điện (pHi) thì dạng ion dạng ($RCOO^-$) chiếm ưu thế [13, 14]. Do vậy, khi thành phần pha động có pH = 3,0, CPN tồn tại dạng chính là cation, mang điện tích dương ($R-NH_3^+$) và sẽ tương tác với tác nhân ghép cặp ion có trong thành phần pha động là ($R'-SO_3^-$). Nó tạo thành cặp ion ($RNH_3^+O_3SR'$) và tương tác theo cơ chế RP-HPLC như sau:



Dựa vào cơ chế sắc kí lỏng ghép cặp ion trên, tại pH = 3,0 CPN tăng khả năng lưu giữ trong cột sắc kí, được pha động rửa giải ra khỏi cột sắc kí và phát hiện tại $\lambda_{max} = 254$ nm. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 3 và Bảng 2.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng giữa pH = 3,0 và pH = 7,0 của thành phần pha động (Bảng 2) đã chỉ ra rõ khi tăng độ pH của dung dịch rửa giải (pha động) từ 3,0 đến 7,0 làm giảm đáng kể thời gian lưu hoặc sự lưu giữ CPN trong cột sắc kí pha đảo. Tại pH = 3,0 có thời gian lưu 6,64 phút và pH = 7,0 có thời gian lưu 2,61 phút. Đồng thời, so sánh %RSD giữa các lần tiêm lặp tại pH = 7,0 là %RSD = 5,04 % dao động hơn nhiều so với tại giá trị pH = 3,0 là %RSD = 0,12 %. Nguyên nhân có sự khác biệt như vậy là khi tăng pH thành phần pha động lên bằng 7,0, CPN tồn tại dạng chính là anion và mang điện tích âm ($R-COO^-$) nên không có khả năng ghép cặp ion với thuốc thử mang điện tích âm ($R'-SO_3^-$) có trong thành phần pha động dẫn đến tương tác kỵ nước giữa CPN và pha tĩnh giảm nên khả năng lưu giữ CPN trong cột sắc kí kém, kết quả thu được chất phân tích ra sớm tại 2,61 phút và thời gian lưu không ổn định nên làm cho phép phân tích định lượng kém độ tin cậy và chính xác. Do đó, chọn pH tối ưu thành phần pha động là pH = 3,0 vì kết quả thu được đáp ứng yêu cầu về sắc

kí đồ HPLC gồm dạng peak đối xứng (Hình 3) và thời gian lưu có độ lặp lại và ổn định với độ lệch chuẩn tương đối thấp giữa các lần tiêm (%RSD < 2,0 %), hệ số kéo đuôi sắc kí nằm trong khoảng yêu cầu (0,8 - 1,5) (Bảng 2).

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc kí
 Tiêm lặp 6 lần dung dịch chuẩn CPN nồng độ 0,4 mg. mL⁻¹ vào hệ thống máy sắc kí. Ghi nhận các thông số thời gian lưu (t_R), hệ số kéo đuôi (A_s), số đĩa lí thuyết (N), diện tích peak (S) của 6 lần tiêm để tính kết quả phân tích tính tương thích hệ thống.

Bảng 3 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

STT	t _R (phút)	N	A _s	S (mAu)
1	6,64	5 474,558	0,992	6 617 106
2	6,63	5 460,712	0,993	6 638 915
3	6,63	5 464,343	0,990	6 624 362
4	6,63	5 475,175	0,994	6 634 436
5	6,65	5 483,465	0,995	6 651 436
6	6,64	5 453,615	0,994	6 661 465
TB	6,64	5 468,60	0,993	6 637 953,3
%RSD	0,12	0,20	0,18	0,25

Quy trình đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống, %RSD các giá trị t_R và S đều nhỏ hơn 2,0 % và hệ số kéo đuôi của peak nằm trong khoảng yêu cầu (0,8 - 1,5) (Bảng 3).

3.2.2 Xác định tính tuyến tính

Pha một dãy mẫu chuẩn có nồng độ từ (0,1 - 0,8) mg. mL⁻¹. Tiêm vào máy sắc kí lần lượt các dung dịch chuẩn và ghi nhận diện tích peak tương ứng. Thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ và diện tích peak.

Bảng 4 Kết quả xây dựng đường tuyến tính của CPN

STT	Nồng độ chuẩn (mg. mL ⁻¹)	Diện tích peak (mAu)
1	0,102	1 656 481,00
2	0,203	3 299 507,67
3	0,406	6 626 794,33
4	0,609	9 920 418,33
5	0,812	13 348 731,33
PTHQ: Y = 16 428,842 X , R ² = 1		

Đánh giá khoảng tuyến tính: qua tiêu chuẩn Fischer (F), phương trình hồi quy có tính tương thích với F = 58 714,35 > F_{0,05} = 10,12 và qua trắc nghiệm Student (T), hệ số a (độ dốc) có ý nghĩa về mặt thống kê (t = 242,31 > t_{0,05} = 3,18), hệ số b (tung độ gốc) không có

ý nghĩa thống kê nên bị loại (t = -1,13 < t_{0,05} = 3,18). Vậy phương trình hồi quy biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính của diện tích peak vào nồng độ trong khoảng từ (0,102 - 0,812) mg. mL⁻¹ với R² = 1.

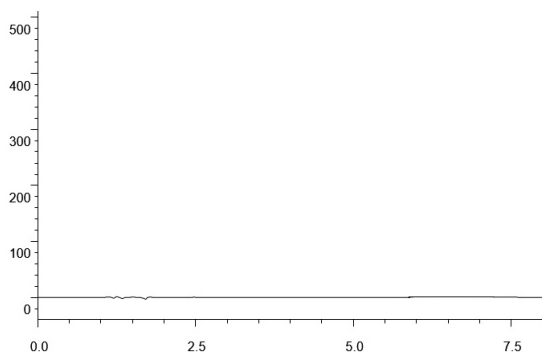
3.2.3 Xác định tính đặc hiệu

Tiêm vào hệ thống sắc kí các dung dịch với thể tích tiêm 20 µL đã chuẩn bị ở Mục 2.2.2.3.

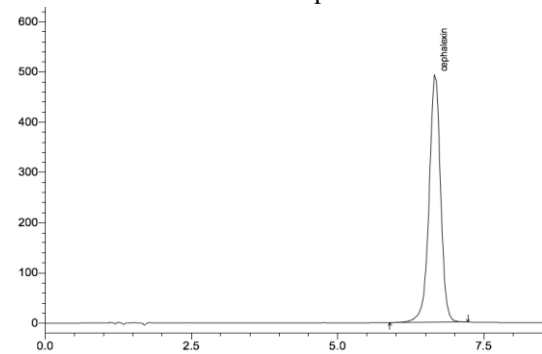
Bảng 5 Thời gian lưu của mẫu chuẩn và thử

Số TT	Thời gian lưu mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu mẫu thử (phút)
1	6,64	6,64
2	6,63	6,65
3	6,63	6,66
4	6,63	6,61
5	6,65	6,70
6	6,64	6,67
TB	6,64	6,66
%RSD	0,12	0,45

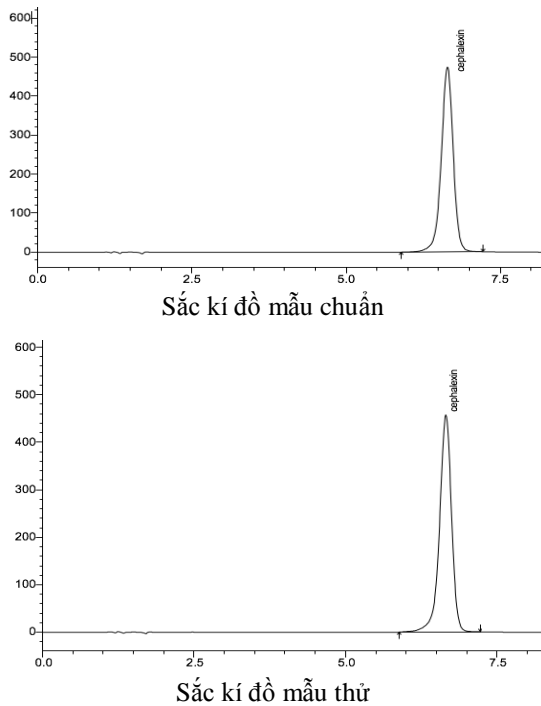
Độ lệch thời gian lưu mẫu chuẩn và thử là 0,21 % (< 1,0 %).



Sắc kí đồ mẫu placebo



Sắc kí đồ mẫu thêm chuẩn vào placebo



Hình 4 Sắc kí đồ tính đặc hiệu của quy trình định lượng

Sắc kí đồ của mẫu placebo (Hình 4) là âm tính: không có peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chuẩn CPN trong mẫu chuẩn.

Sắc kí đồ thêm chuẩn CPN vào mẫu placebo và mẫu thử (dương tính) đều có 1 peak, có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak CPN trong mẫu chuẩn. Kết quả đã chỉ ra thành phần tá dược (placebo) không ảnh hưởng đến quy trình định lượng. Quy trình định lượng CPN đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2.4 Độ lặp lại

Tiến hành tiêm 6 dung dịch mẫu thử vào hệ thống HPLC và ghi nhận kết quả.

Bảng 6 Kết quả độ lặp lại của hàm lượng mẫu thử

STT	Lượng cân mẫu (mg)	CPN	
		Diện tích peak (mAu)	Hàm lượng (%)
1	606,3	6 604 150	100,81
2	610,2	6 645 231	100,79
3	605,1	6 566 814	100,44
4	608,9	6 611 910	100,50
5	606,1	6 599 257	100,77
6	607,3	6 604 700	100,66
%HL trung bình			100,7
%RSD			0,16

Giá trị %RSD của thời gian lưu và diện tích peak của 6 lần mẫu thử là 0,16 % (< 2,0) % (Bảng 6); 6 dung dịch mẫu thử khác nhau nhưng có nồng độ

tương đương nhau. Hàm lượng trong 6 lần có kết quả lặp lại. Vậy quy trình có tính chính xác.

3.2.5 Độ đúng của phương pháp

Thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn CPN vào mẫu placebo ở 3 nồng độ khác nhau 80 %, 100 % và 120 %, xác định lại lượng hoạt chất CPN có trong mẫu.

Bảng 7 Kết quả độ đúng 80 %, 100 % và 120 %

Độ đúng (%)	m_{placebo} (mg)	Lượng chuẩn thêm vào (mg.mL^{-1})	Diện tích peak (mAu)	Lượng chuẩn tìm thấy (mg.mL^{-1})	Độ đúng (%)
80	606,7	0,3278	5 440 128,66	0,3301	100,68
	607,1	0,3278	5 404 559,33	0,3279	100,02
	606,5	0,3278	5 417 686,00	0,3287	100,26
100	608,1	0,4098	6 701 126,66	0,4066	99,21
	606,4	0,4098	6 691 954,33	0,4060	99,07
	606,6	0,4098	6 694 160,67	0,4061	99,11
120	608,1	0,5737	8 123 543,67	0,5657	100,22
	607,0	0,5737	8 091 212,33	0,5692	99,83
	606,6	0,5737	8 144 949,00	0,5695	100,49
Trung bình					99,76
%RSD					0,66

Độ đúng quy trình định lượng của chuẩn thêm vào placebo nằm trong khoảng (98,0 - 102,0) % và giá trị %RSD \leq 2,0 % (Bảng 7). Vậy quy trình đạt về độ đúng.

3.2.6 Kết quả định lượng CPN trong bột pha hỗn dịch
Tiến hành định lượng 6 mẫu theo quy trình đã xây dựng và so sánh với kết quả với quy trình phân tích HPLC [15].

Bảng 8 Kết quả định lượng CPN

STT	Phương pháp đề xuất	Phương pháp HPLC	Thống kê
1	100,10	99,96	$F_{\text{tn}} = \frac{S_A^2}{S_B^2}$ $F_{\text{tn}} < F_{\text{tt}}$ (1,83 < 5,05) P = 95 %
2	100,02	99,58	
3	101,01	100,21	
4	99,61	100,76	
5	99,69	99,82	
6	100,66	100,21	
TB	100,18	100,09	
SD	0,5507	0,4068	
%RSD	0,55	0,41	

Hàm lượng CPN trong bột pha hỗn dịch đạt yêu cầu về hàm lượng hoạt chất khoảng (95 - 104) % theo USP 40 (Bảng 8).

Dùng thống kê theo chuẩn Fischer (F) để đánh giá độ chính xác của phương pháp đề xuất dựa trên hai dãy dữ liệu của hai phương pháp. Do $F_{\text{tn}} = 1,83 < F_{\text{tt}} = 5,05$

nên độ chính xác của hai phương pháp tương đương với độ tin cậy là 95 %.

4 Kết luận

Quy trình định lượng xây dựng được có các ưu điểm sau: kết quả nghiên cứu đã chỉ ra ảnh hưởng pH trong thành phần pha động đến sự ion hóa của hợp chất zwitterion nói chung và CPN nói riêng khi áp dụng cơ chế sắc kí ghép cặp ion trong phương pháp sắc kí HPLC được thể hiện rõ khi khảo sát giữa pH = 3,0 và pH = 7,0. Tại pH = 3,0, CPN tồn tại dạng cation và sẽ ghép cặp với ion đối có trong thành phần pha động và tạo thành cặp ion và tương tác theo cơ chế sắc kí lỏng pha đảo (RP-HPLC). Kết quả thu được trên sắc kí đồ đáp ứng yêu cầu về dạng peak cân đối có $A_s = 0,993$ và %RSD = 0,18 (< 2,0 %). Vì vậy, việc tách các hợp chất bằng phương pháp RP-HPLC, theo cơ chế sắc kí ghép

cặp ion đặc biệt là hợp chất có tính lưỡng tính cần kiểm soát độ pH của pha động.

Phương pháp đã thẩm định với các thông số theo hướng dẫn của ICH và đạt yêu cầu. Phương pháp có độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại với phần trăm độ lệch chuẩn tương đối nhỏ hơn 2,0 %, Độ đúng của phương pháp nằm trong khoảng (99,11 - 100,49) % và trong khoảng tuyến tính (0,102 - 0,812) mg. mL⁻¹ với R² = 1.

Quy trình đã ứng dụng để xác định hàm lượng CPN trong bột pha hỗn dịch, kết quả đạt yêu cầu về hàm lượng theo USP 40. Do đó, phương pháp đề xuất có thể được áp dụng để xác định hàm lượng CPN có trong bột pha hỗn dịch, nguyên liệu, thành phẩm chứa hoạt chất CPN tại các công ty dược phẩm hoặc chế phẩm thuốc có chứa CPN trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2012), Hóa Dược 1, NXB Giáo dục Việt Nam , 183-184.
2. Rebwar O. Hassan (2013), Chemical Science Transactions, *Indirect Spectrophotometric Determination of Cephalixin in Pharmaceutical Formulations*.
3. B. Siddartha and Ch. Kiranya Bharathi (2014), Der Pharmacia Lettre, *Simultaneous Estimation and Validation of Bromhexine and Cephalixin in Bulk and Pharmaceutical Dosage form by Rp-Hplc Method*
4. Sagar Suman Panda, Bera V. V. Ravi Kumar, Rabisankar Dash, Ganeswar Mohanta (2013), Scientia Pharmaceutica, *Determination of Cephalixin Monohydrate in Pharmaceutical Dosage Form by Stability-Indicating RP-UFLC and UV Spectroscopic Methods*.
5. Rajaa Farhan Hussein and Muhammad M. Hammami (2014), World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, *Determination of Cephalixin Level and Stability in Human Plasma by Fully Validated Rapaid Hplc Analysis*,
6. Bộ Y tế (2012), Kiểm nghiệm Dược phẩm, NXB Y học, 84-90.
7. The United states Pharmacopoeia 40, The United states Pharmacopeial Convention, edition 27th.
8. Serban C. Moldoveanu and Victor David (2013), *Essentials in Modern HPLC Separations*, 465-519
9. ICH (International Conference on Harmonization) (2005), *Guidance on validation of analytical procedures: text and methodology*.
10. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
11. Bộ Y tế (2012), Hóa phân tích, phân tích công cụ, Tập 2, NXB Y học, 126-129.
12. Martina J. Rosenberg, Erika Abel, William S. Garver, and Marcy P. Osgood (2016), Howard Hughes Medical Institute, *Taking the Hassle out of Hasselbalch*.
13. Shingo Watanabe, Masahiro Tsuda, Tomohiro Terada, Toshiya Katsura, And Ken-Ichi Inui (2010), The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, *Reduced Renal Clearance Of A Zwitterionic Substrate Cephalixin In Matel-Deficient Mice*.
14. Bộ Y tế (2014), Hóa phân tích, Tập 1, NXB Giáo dục Việt Nam, 116-125.
15. Manal Mahmoud Hussein, Ahmed Mahdi Saeed and Tariq Khalil Ibraheem (2020), Chemistry Department, Diyala University, *RP-HPLC Developed Analytical Method for Cephalixin Determination in Pure and Pharmaceutical Preparations*.

Quantitative analysis of Cephalexin in powdered suspension 250 mg by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Nguyen Thi Thu Thao

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

nguyentthao@ntt.edu.vn

Abstract A accurate and sensitive method was developed for qualitative and quantitative analysis of Cephalexin (CPN) in powdered suspension using Ion–Pair Chromatography (IPC–HPLC) with PDA detector. CPN is a zwitterion and the degree of ionization of CPN affects the retention of compound in the reversed phase chromatographic column by investigating the concentration of buffer solution at pH = 3.0 and pH = 7.0. Experimental results optimized the chromatographic conditions with a flow rate $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the chromatograms obtained meet the symmetry coefficient. At the same time, optimizing mobile phase composition at pH = 3.0, symmetrical peak shape chromatography and retention time have repeatability with relatively standard deviation between injections %RSD = 0.12 % (< 2.0 %). Chromatography parameters were stainless steel RP-18 column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size), at 40 °C. The isocratic mobile phase was buffer solution at pH = 3.0. The determinations were performed using PDA detector at 254 nm. Samples were prepared with mobile phase and the volume injected was 20 μL . Calibration graph was in the range of (0.102 - 0.812) mg. mL^{-1} with a correlation coefficient of 1. The method showed adequate precision, with a relative standard deviation (%RSD) smaller than 2.0 %. The method was applied successfully to determine the content of CPN in powdered suspension with recovery of (99.11 - 100.49) % và %RSD = 0.66. The presence of components of the powdered suspension did not interfere in the results of the analysis. This proposed method is applicable for the determination of the CPN in powdered suspension.

Keywords Cephalexin, High performance liquid chromatography (HPLC), Ion pair chromatography (IPC), Powdered suspension, Validation, Antibiotic.