

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG NHANH VÀ ĐỒNG THỜI
CEFADROXIL, CEFALEXIN, CEFACLOR TRONG THUỐC VIÊN NÉN
BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ HỒNG NGOẠI GẦN VÀ TRUNG BÌNH**

Đến tòa soạn 28 - 07 - 2016

Đoàn Thị Huyền

Khoa Tự nhiên- Trường Cao đẳng sư phạm Hà Tây

Nguyễn Phương Hoa, Bùi Xuân Thành, Tạ Thị Thảo

Khoa Hóa học- Trường Đại học khoa học Tự nhiên- Đại học Quốc Gia Hà Nội

SUMMARY

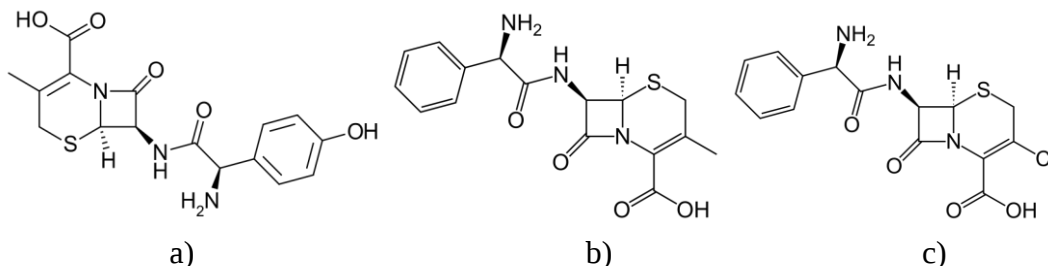
**RAPID AND SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CEFADROXIL,
CEFALEXIN, CEFACLOR IN TABLETS BY NEAR AND
MIDDLE INFRARED SPECTROSCOPY**

In this study, the simultaneous quantitative analysis of cefadroxil, cephalixin, cefaclor in tablets using multivariate linear regression based on near infrared spectral has been developed. The same model of partial least squares (PLS) with 6 separate vector matrix is built with standard matrix of samples (22 samples containing 4 analytes together with total of excipients) were applied for individual and/or simultaneous determination of cefadroxil, cephalixin, cefaclor in samples. A matrix of test samples including 9 samples created by known amount of components was used to assess the accuracy of the PLS model. The results indicated the relative error varied from 1.1 to 15%. The optimum experimental conditions were spectral region: 3600 - 2800 cm^{-1} ; volume ratio of sample/ KBr: 98 (w/w); 14mg of pellet form. The analytical results of 3 commercial drug samples containing 1 of 3 actives by means of near-infrared spectral and chromatographic methods LC-MS mass spectrometry showed the small relative error (<15%) between two methods. The showed results can be used for rapid and simultaneous determination of the active ingredients of cefadroxil, cephalixin, cefaclor in the pharmaceutical tablets.

Từ khoá: phương pháp hồng ngoại gần, hồi qui đa biến tuyến tính, bình phương tối thiểu từng phần, LC/MS- orbitrap

1. MỞ ĐẦU

Các hoạt chất Cefadroxil, cephalexin là kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 1, có tác dụng diệt khuẩn, ngăn cản sự phát triển và phân chia của vi khuẩn bằng cách ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn [1]. Công thức cấu tạo của cefadroxil, cephalexin và cefaclor như ở hình 1:



Hình 1: Công thức cấu tạo của Cefadroxil (a), Cephalexin (b) và Cefaclor (c)

Trong dược điển Việt Nam, các chất này được phân tích riêng rẽ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) detector tử ngoại (HPLC-UV) với cột tách là cột C18 gồm acetonitril – đệm photphat pH 5,0 (tỷ lệ thể tích 4:96) khi phân tích cefadroxil, hỗn hợp đệm photphat pH 3,0 - acetonitril-methanol-triethylamin (tỷ lệ thể tích 850:100:50:15) khi phân tích cephalexin và hỗn hợp đệm photphat pH =2,5 với trimetylamin và methanol (tỷ lệ thể tích 78:1: 22) khi phân tích cefaclor [2]. Trong các đối tượng phức tạp hơn như mẫu sinh học, khi có mặt đồng thời các chất ở dạng lượng vết thì phương pháp LC/MS thường được dùng [3, 4, 5]. Ngoài các kỹ thuật phổ biến là HPLC, phương pháp điện hóa cũng có thể định lượng được riêng lẻ từng hoạt chất trong thuốc [6,7,8]. So với các phương pháp trên, thì định lượng các hoạt chất kháng sinh trong thuốc bằng phổ hồng ngoại gần (NIR) có ưu điểm nổi trội là không phải xử lý mẫu, phân tích nhanh, giá thành rẻ do không tốn dung môi và nếu kết hợp với thuật toán hồi qui đa biến thì không phải tách riêng các chất ra khỏi nền mẫu chứa tá dược và có thể phân tích đồng thời các hoạt chất trong cùng nhóm thuốc nên hiện là kỹ thuật đang được sử dụng nhiều để phân tích các hoạt chất trong thuốc [9,10, 11,12].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng phương pháp kiểm tra nhanh và đồng thời chất lượng thuốc viên nén chứa các hoạt chất cefadroxil, cephalexin, cefaclor thuộc họ cephalosporin bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại gần kết hợp với hồi qui đa biến tuyến tính (MRL) mà không cần phân hủy mẫu. Với một mô hình đường chuẩn đa biến được xây dựng từ bộ mẫu chuẩn rắn tự tạo chứa 3 hoạt chất và 3 tá dược, bằng thuật toán bình phương tối thiểu từng phần (PLS) sẽ cho phép định lượng được thuốc chứa 1 trong số 3 hoạt chất này đang lưu thông trên thị trường và đối chứng với phương pháp phân tích sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao (LC/ MS – orbitrap)

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

- Chất chuẩn cefadroxil, cephalixin, cefaclor do Viện kiểm nghiệm trung ương.
- Các tá dược:
 - + Magie stearat (Peter Greven Asia SDN. BHD), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo USP34.
 - + Bột Talc (Công ty cổ phần hóa dược Việt Nam), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo ĐĐVN 4
 - + Bột lactose (Công ty cổ phần hóa dược Việt Nam), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo ĐĐVN 4
- Hóa chất tinh khiết phân tích (P.A.) gồm KBr (dùng cho phép đo hồng ngoại) và dùng cho HPLC như axit axetic, NaOH, axetonitrin, triethylamin, methanol (Merck)
- Cân phân tích ES 225 SM-DR độ chính xác ± 0.00001 g.
- Bộ dụng cụ ép viên: Agilent Technologies standard sampling kit (part no: Pike - 162 - 1000).
- Máy quang phổ hồng ngoại Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR spectrometer, dải số sóng đo $7500-2800\text{ cm}^{-1}$. Detector nhiệt DTGS. Thiết bị được đặt trong phòng đo duy trì độ ẩm dưới 30%.
- Thư viện phổ chuẩn: ST- Japan spectral libraries (part no: K8159 - 1000)
- Phần mềm Matlab 7.6: Chương trình bình phương tối thiểu từng phần để phân tích đồng thời các cấu tử trong cùng hỗn hợp.
- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ phân giải cao LC/MS- LTQ-orbitrap của hãng Thermo Scientific ; Pha tĩnh là cột: C18, (2.1 mm ID x 50mm x 1.9 μm).

2.2. Quy trình định lượng nhanh và đồng thời Cefadroxil, cephalixin, cefaclor trong thuốc viên nén bằng phương pháp NIR

Bước 1: Chuẩn bị các mẫu chuẩn, mẫu kiểm tra chứa đồng thời các hoạt chất cefadroxil, cephalixin, cefaclor và các tá dược với tỷ lệ thay đổi trong khoảng nồng độ khảo sát sao cho tín hiệu độ hấp thụ thay đổi trong vùng tuyến tính. Tiến hành trộn đều và nghiền mịn đồng nhất hỗn hợp trong cối mã não khoảng 15 phút.

Bước 2: Lấy một lượng hỗn hợp chất vừa tạo trộn với KBr theo tỷ lệ tối ưu, nghiền mịn đồng nhất mẫu trong cối mã não trong 15 phút.

Bước 3: Cân khoảng 15 mg lượng bột vừa nghiền cho vào bộ ép thủy lực để thu được viên mẫu mỏng và trong suốt. Đo phổ hồng ngoại của viên mẫu trong vùng phổ tối ưu, ghi lại độ hấp thụ quang của từng mẫu, xuất số liệu thu được dưới dạng ASCII và chuyển toàn bộ dữ liệu vào phần mềm matlab để tính toán kết quả.

Bước 4: Đường chuẩn đa biến được xây dựng dựa trên ma trận độ hấp thụ quang của các mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra đã chuẩn bị ở phần trên. Nhập số liệu ma trận nồng độ các mẫu chuẩn, ma trận các mẫu kiểm tra và các ma trận tín hiệu đo tương ứng vào

phần mềm Matlab, chạy chương trình tính toán ma trận hệ số hồi qui theo 2 phương pháp PLS và PCR trên phần mềm và sử dụng ma trận này để tìm nồng độ mỗi hoạt chất trong từng mẫu. So sánh sai số tương đối của mỗi phương pháp, lựa chọn ra phương pháp tối ưu nhất để tiến hành định lượng các mẫu thực tế.

Bước 5: Tiến hành định lượng các mẫu thực tế: trộn một lượng bột viên thuốc với tá dược để pha loãng nồng độ hoạt chất về nồng độ nằm trong ma trận chuẩn đã xây dựng, đo phổ của các mẫu này, ghi lại phổ và chuyển dữ liệu thu được vào phần mềm Matlab để tính toán kết quả. Từ đó tiến hành tính toán hàm lượng hoạt chất trong các mẫu thuốc viên theo công thức dưới đây:

$$HL(mg/viên) = (X \cdot m_{tb}) / m_t$$

Trong đó: X: Khối lượng của hoạt chất tìm được từ mô hình hồi qui đa biến tuyến tính (mg)

m_t : khối lượng của mẫu thử (mg)

m_{tb} : khối lượng trung bình của 1 viên của thuốc (mg)

2.3. Phân tích đối chứng bằng LC/MS

- Pha động gồm: kênh A là đệm $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 12,50 mM, kênh B: ACN với tỉ lệ thể tích hai kênh A và B là 30/70. Thể tích mẫu bơm là 10 μL , tốc độ pha động là 200 $\mu\text{L/phút}$.

- *Dung dịch chuẩn:*

+ Dung dịch chuẩn gốc 200ppm: Cân chính xác 0,0050 g các chất chuẩn trên cân phân tích của từng hoạt chất nghiên cứu (cefadroxil, cephalixin, cefaclor), hòa tan bằng MeOH trong bình định mức 25 ml và định mức đến vạch bằng dung môi pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 12,50 mM. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở nhiệt độ từ 0-5°C, tránh ánh sáng trực tiếp.

+ Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc: Lấy chính xác thể tích hỗn hợp dung dịch chuẩn gốc và dung môi pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 12,50 mM cho vào vial loại 1 ml thu được các dung dịch chuẩn làm việc 20 ppm, 10 ppm và 5 ppm. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,20 μm .

Từ dung dịch chuẩn làm việc 10 ppm pha loãng tiếp về các nồng độ 1 ppm, 0,5 ppm, 0,2 ppm và 0,1 ppm bằng cách lấy chính xác hỗn hợp dung dịch chuẩn 10 ppm và dung môi pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 12,50 mM vào vial loại 1 ml. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,20 μm . Chuẩn làm việc được bảo quản ở nhiệt độ từ 0-5°C, tránh ánh sáng trực tiếp.

- *Chuẩn bị mẫu phân tích thực tế:*

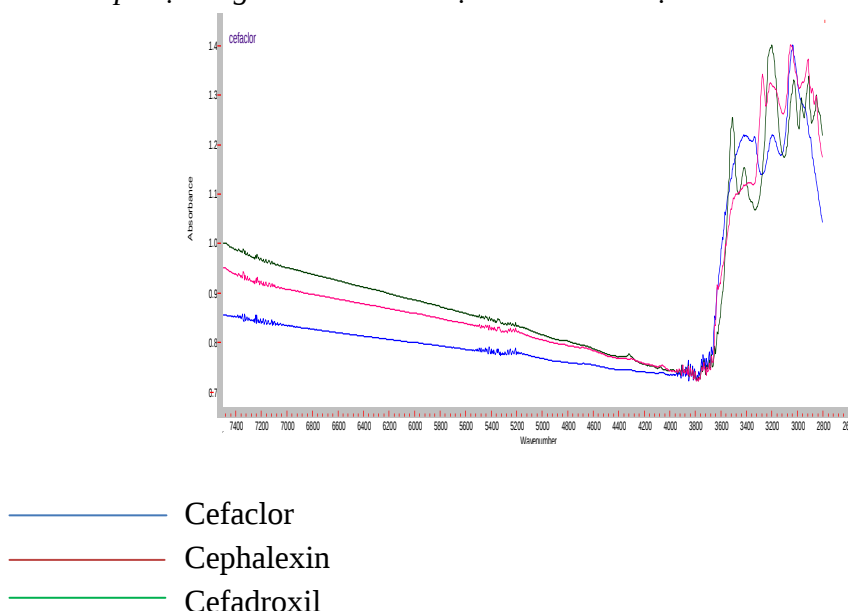
Cân 20 viên thuốc, nghiền mịn và cân lượng mẫu tương ứng với 1 viên, (khoảng 5mg) vào bình định mức 25ml, thêm một lượng methanol, lắc siêu âm hoà tan để nguội, thêm dung môi pha động $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 12,50 mM đến vạch, lắc đều. Hút chính xác 50 μL dịch trên vào vial loại 1ml, thêm pha động vừa đủ đến 1ml đối với mẫu chứa hoạt chất cephalixin, cefaclor. Hút chính xác 25 μL dịch trên vào vial loại 1ml, thêm

pha động vừa đủ đến 1ml đối với mẫu chứa hoạt chất cefadroxil. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,20 μ m. Tiến hành chạy sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu phân tích. Tính hàm lượng hoạt chất cefadroxil, cephalixin và cefaclor trong một viên thuốc dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thực tế, dung dịch chuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời cefadroxil, cephalixin và cefaclor trong cùng hỗn hợp

3.1.1 Phổ hấp thụ vùng NIR của các hoạt chất và tá dược



Hình 2: Phổ NIR của ba hoạt chất cefadroxil, cephalixin, cefaclor trong vùng 7500-2800 cm^{-1}

Phổ hấp thụ vùng NIR (7500- 2800 cm^{-1}) của 3 hoạt chất nghiên cứu thu được ở hình 2 cho thấy các hoạt chất này đều hấp thụ mạnh tia IR trong vùng phổ 3600- 2800 cm^{-1} . Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số loại tá dược thường dùng để sản xuất các kháng sinh nhóm cefalosporin cũng cho thấy mẫu bột talc hấp thụ mạnh trong vùng hồng ngoại 3750-3650 cm^{-1} , mẫu bột magie stearat hấp thụ mạnh trong vùng phổ hồng ngoại từ 2950-2800 cm^{-1} và Lactose đều hấp thụ bức xạ hồng ngoại từ 3600- 2800 cm^{-1} . Do đó, không thể xác định riêng rẽ các hoạt chất này trong viên thuốc bằng kỹ thuật đường chuẩn thông thường mà phải dùng thuật toán hồi qui đa biến.

3.1.2. Ảnh hưởng của lượng KBr khi ép viên và độ lặp lại phép đo

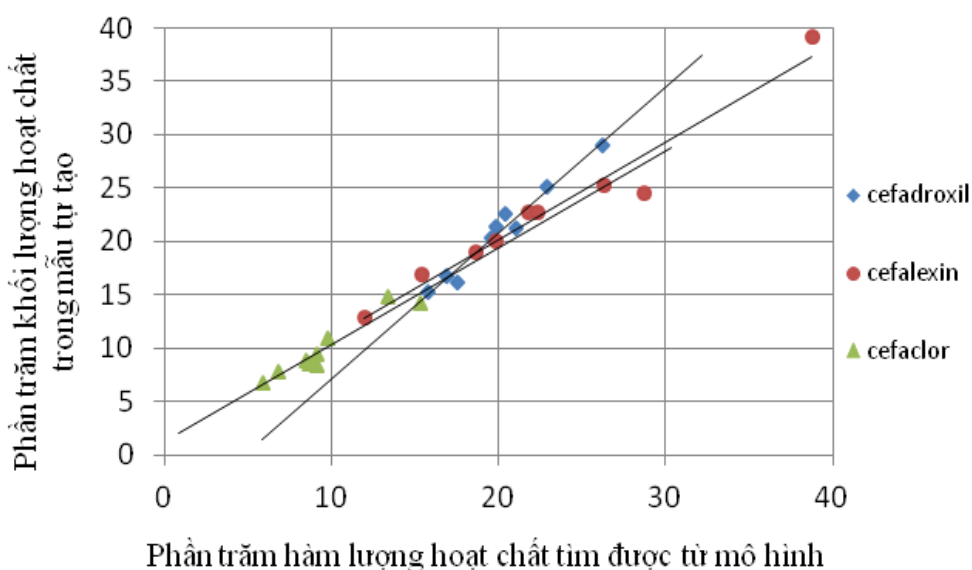
Khi trộn bột của mẫu thuốc cefadroxil, cephalixin và cefaclor với KBr theo tỷ lệ khối lượng khác nhau, kết quả cho thấy khi tỷ lệ khối lượng mẫu/KBr tăng thì độ hấp thụ quang của các mẫu viên cũng tăng lên nhưng độ lặp lại của phép đo càng kém. Còn nếu lượng mẫu đưa vào quá nhỏ thì dễ gây ra sai số trong quá trình cân, tỷ lệ khối lượng mẫu/KBr 2/98 chúng tôi chọn là phù hợp.

3.2. Xác định đồng thời cefadroxil, cephalixin và cefaclor sử dụng cùng mô hình PLS

3.2.1. Xây dựng phương trình đường chuẩn đa biến

Phương trình đường chuẩn đa biến PLS xác định đồng thời cefadroxil, cephalixin, cefaclor và tổng hàm lượng tá dược dựa trên ma trận hàm lượng của 22 mẫu chuẩn dạng bột chứa đồng thời cefadroxil có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 13% đến 58%; cephalixin có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 10 đến 29,7%, cefaclor có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 5% đến 15% và tổng 3 tá dược là lactose, magie stearat và talc có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 46%g đến 52%g. Ma trận tín hiệu đo của 22 mẫu tại 417 số sóng là độ hấp thụ quang trong vùng phổ từ 3600-2800 cm^{-1} . Dùng câu lệnh tìm số cấu tử chính trong phần mềm Matlab thì thấy rằng PC=8 chiếm 99% lượng thông tin của tập số liệu từ số PC=8 trở đi lượng thông tin thu được thay đổi không đáng kể. Do đó có thể kết luận chỉ cần 8 cấu tử có ảnh hưởng chính tới các thông tin chứa trong tập số liệu, vì vậy chúng tôi lựa chọn số cấu tử chính là 8 để làm cơ sở tính toán hệ số hồi quy theo phương pháp PLS với không gian mới của tập số liệu và ma trận nồng độ đã xây dựng.

3.2.2. Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy đa biến PLS



Hình 3: Mối tương quan giữa phần trăm khối lượng hoạt chất tìm được từ mô hình và hàm lượng có trong mẫu tự tạo

Một ma trận gồm 9 mẫu kiểm tra với hàm lượng các hoạt chất và tá dược biết trước nằm trong khoảng đường chuẩn đã xây dựng được dùng để kiểm chứng tính phù hợp của mô hình hồi quy. Hình 3 cho thấy có sự phù hợp rất tốt giữa hàm lượng hai hoạt chất có trong mẫu tự tạo (synthesis (S)) với hàm lượng hai hoạt chất tìm lại được (found (F)) bằng mô hình. Các giá trị sai số mắc phải chỉ từ 0,7% đến 15,2%. Do đó, hoàn toàn có thể áp dụng phương pháp này để xác định đồng thời các hoạt chất trên trong cùng một hỗn hợp mà không cần tách loại.

3.3. Ứng dụng phân tích mẫu thuốc viên

Trong các phép phân tích, mỗi mẫu thuốc viên nén của các nhà sản xuất khác nhau được thu thập trên thị trường. Cân 20 viên thuốc, tính khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột mẫu (m_t) ứng với một viên và làm như qui trình ở mục 2.2. Các kết quả phân tích mẫu thực tế chỉ chứa một hoạt chất trong ba hoạt chất trong thuốc viên bằng chính ma trận chứa đồng thời 3 hoạt chất cho thấy phù hợp với phép phân tích đối chứng với sai số chỉ khoảng dưới 10%, kết quả trong các mẫu cụ thể thu được ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả phân tích hàm lượng (mg/viên) CTR và CTX trong các mẫu thuốc viên

Ký hiệu mẫu	Tên thuốc	Nhà sản xuất	Lô sản xuất	Hàm lượng hoạt chất (mg/viên)	
				PP NIR	PP đối chứng LC- MS
CPX	Cephalexin MKP	CTCP Hóa Dược phẩm Mekophar	VD-22305-15	556,78 ± 0,20	545,88±0,09
CFC	Mekocefactor	Công ty TNHH US Pharm USA	VD-22305_15	274,92 ± 0,27	283,81±0,42
CFD	Cefadroxil	CTCP Hóa Dược phẩm Mekophar	VD-2563-07	572,90 ± 0,11	512,67±0,025

Các kết quả thu được cho thấy hàm lượng các hoạt chất thu được theo phương pháp NIR-PLS so với phương pháp đối chứng LC-MS có sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Độ chệch tương đối hàm lượng 3 hoạt chất phân tích với giá trị xác định theo phương pháp đối chứng LC-MS đều dưới 15%.

3. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành xây dựng mô hình hồi qui PLS xác định đồng thời các hoạt chất nghiên cứu trong cùng hỗn hợp khi có mặt các tá dược, các kết quả sai số thu được từ các mô hình trên phần lớn có sai số $\leq 15\%$ (sai số nằm trong giới hạn cho phép). Mặt khác có thể ứng dụng mô hình hồi qui tuyến tính PLS kết hợp với phương pháp phổ hồng ngoại gần để xác định nhanh các mẫu thuốc thực tế đang lưu hành trên thị trường hiện nay, với độ chệch của phương pháp nghiên cứu hoạt chất cefadroxil theo phương pháp phổ hồng ngoại gần so với phương pháp đối chứng là 11,7% ;Độ chệch của hàm lượng Cephalexin khi định lượng bằng phương pháp phổ hồng ngoại gần so với phương pháp đối chứng là: 2,0%; Độ chệch của hàm lượng Cefaclor khi định lượng bằng phương pháp phổ hồng ngoại gần so với phương pháp đối chứng là: 3,1%. Độ chệch khi phân tích các mẫu là tương đối nhỏ và dao động trong vùng sai số cho phép của phép đo. Do đó có thể dùng mô hình này để định lượng nhanh các mẫu thuốc thực tế mà không phải xử lý mẫu thành dung dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, *Dược lý học tập 2*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
2. Bộ Y Tế (2009), *Dược điển Việt Nam tái bản lần thứ 4*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Chenrong Huang, Wei Wang and Liyan Miao (2014), “Determination of Cefaclor by UPLC–MS-MS for a Chinese Pharmacokinetic Study”, *Journal of Chromatographic Science*;52(7):636-40,
4. WJ Blanchflower, Hewitt SA, Kennedy DG (1994), "Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry", *Analyst*, 119(12), pp. 2595-2601
5. J.A. McAteer, M F Hiltke, B M Silber and R D Faulkner (1987), “Liquid-chromatographic determination of five orally active cephalosporins—cefixime, cefaclor, cefadroxil, cephalixin, and cephadrine--in human serum.”, *CLIN. CHEM.* 33/10, 1788-1790.
6. Ahmad H. Alghamdi, Ali F. Alghamdi, Mohammed A. Alomar (2009), “A Study of Stripping Voltammetric Behaviour of Cefadroxil Antibiotic in the Presence of Cu (II) and its Determination in Pharmaceutical Formulation” *Port. Electrochim. Acta* v.27 n.6 Coimbra.
7. L.N.C.Rodrigues, M.V.B.Zanoni và A.G.Fogg (1999), “Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Cefaclor in Pharmaceutical Formulations”, *Analytical Letters*, volume 32, pp. 97-109.
8. L.N.C. Rodrigues, M.V.B. Zanoni, A.G. Fogg (1999), “Indirect polarographic and cathodic stripping voltammetric determination of cefaclor as an alkaline degradation product”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21, pp. 497–505
9. Yan Yun Li (2013), “Spectral ranges of near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of cefazolin sodium and the construction of a quantitative model for the determination of cefazolin sodium content in different crystal forms”, *Science China Chemistry*, vol.56, pp. 789-798.
10. A.P.Argekar, S.V.Ra, S.U.Kapadia (1997), “Simultaneous Determination of Cephalixin and Carbocisteine from Capsules by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP - HPLC)”, *Analytical Letters*, volume 30, Issue 4, pp 821- 831.
11. Đoàn Thị Huyền, Tạ Thị Thảo, Bùi Xuân Thành, Vũ Thị Huệ (2016), *Nghiên cứu phát triển phương pháp quang phổ hồng ngoại gần định lượng nhanh chất Sulfaguanidin trong thuốc viên nén*. Tạp chí Phân tích Hóa lý và Sinh học, 21(1/2016) 153-162.
12. Tạ Thị Thảo, Bùi Xuân Thành, Vũ Thị Huệ, Đoàn Thị Huyền (2016), *Định lượng đồng thời Sulfaguanidin, Sulfamethoxazol và Trimethoprim trong thuốc viên nén sử dụng cùng mô hình hồi quy cấu tử chính (PCR) từ dữ liệu phổ hồng ngoại gần*. Tạp chí Phân tích Hóa lý và Sinh học, 21(2/2016) 127-134.