

Tối ưu quy trình phân tích để định lượng hoạt chất chloramphenicol trong thuốc mỡ bôi da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Thu Thảo, Mai Thanh Nhân

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

Tóm tắt

Nghiên cứu hướng đến mục tiêu xây dựng và thẩm định quy trình phân tích định lượng hoạt chất chloramphenicol trong thuốc mỡ bôi da bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả nghiên cứu đã đạt được gồm tối ưu điều kiện sắc kí thành phần pha động methanol : dung dịch dikali hydrogenphosphat theo tỉ lệ (70:30; v/v), giảm thời gian chạy mẫu, sắc kí đồ của peak đáp ứng hệ số đối xứng và dùng kĩ thuật chiết siêu âm kết hợp làm lạnh cho quy trình xử lí mẫu chứa hàm lượng béo cao thông qua hiệu suất thu hồi đạt 100,74 %. Quá trình sắc kí thực hiện trên cột RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), phát hiện bằng đầu dò UV-VIS ở bước sóng 280 nm. Quá trình rửa giải đẳng dòng với tốc độ dòng 1 mL/min. Kết quả thẩm định theo hướng dẫn của International Conference on Harmonization (ICH) cho thấy quy trình đạt độ đặc hiệu cao, độ tuyến tính, độ lặp lại với %RSD = 0,67, độ đúng với hiệu suất thu hồi trong khoảng (98,49-101,23) %. Vì thế, có thể ứng dụng quy trình phân tích này trong việc kiểm soát chất lượng thường quy của chloramphenicol trong dược phẩm thuốc mỡ bôi da.

Nhận 26/04/2022
Được duyệt 20/08/2022
Công bố 12/09/2022

Từ khóa
định lượng
chloramphenicol,
thuốc mỡ bôi da,
phương pháp HPLC
kháng sinh,
thẩm định

© 2022 Journal of Science and Technology – NTTU

1 Giới thiệu

Chloramphenicol (tên hóa học 2,2-dicloro-N-[1R, 2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) 2-(4-nitrophenyl) ethyl acetamid) và đã điều chế bằng cách nuôi cấy một số chuẩn streptomyces venezuelae trong môi trường thích hợp và thường sản xuất bằng phương pháp tổng hợp. Chloramphenicol là bột kết tinh trắng hoặc trắng vàng hay tinh thể hình kim hoặc phiến dài, khó tan trong nước, dễ tan trong methanol, ethanol và propylene glycol [1].

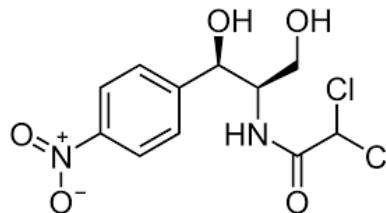
Chloramphenicol là chất có tính kháng khuẩn, có phổ kháng rộng, tiêu diệt được vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Chloramphenicol phân bố rộng khắp trong phần lớn các mô cơ thể và dịch, thải trừ chủ yếu qua đường tiểu. Chloramphenicol là kháng sinh, có tác

dụng chính là kìm khuẩn, khi sử dụng với nồng độ cao còn có tác dụng diệt khuẩn đối với một số vi khuẩn có độ nhạy cảm cao. Nhờ đó, thuốc có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, chống dị ứng và ức chế miễn dịch. Chloramphenicol có trong một số chế phẩm dược, đặc biệt là dạng kem, thường được sử dụng để điều trị viêm da và nhiễm trùng da, viêm da tiếp xúc, chốc lở, viêm nang lông, mụn trứng cá. Để thực hiện kiểm soát chất lượng thuốc trong các sản phẩm dược phẩm, một số phương pháp đã được xây dựng để định lượng chloramphenicol có trong mẫu thuốc [2]. Chính vì tầm quan trọng của thuốc trong việc điều trị bệnh nên để đánh giá chất lượng thuốc, kiểm nghiệm thuốc phải nghiêm ngặt tránh tình trạng thuốc giả hoặc dùng quá liều bằng cách đối chiếu kết quả thu được với các

chỉ tiêu trong tiêu chuẩn quy định. Các chỉ tiêu để đánh giá chất lượng chloramphenicol có trong thuốc mỡ bôi da gồm: cảm quan kem mịn màu trắng sữa và đồng nhất. Độ đồng đều khối lượng $\pm 10\%$ so với khối lượng ghi trên nhãn. Độ nhiễm khuẩn trong mỗi gam chế phẩm phải đạt yêu cầu tổng số vi khuẩn hiếu khí sống lại được nhỏ hơn 500 (không có *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). Đồng thời, định tính chloramphenicol có trong mẫu thuốc dựa vào thời gian lưu của thử so với chuẩn và định lượng chloramphenicol trong khoảng (90-110) % so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Một số phương pháp phân tích đã được phát triển, và áp dụng để phân tích hàm lượng chloramphenicol riêng lẻ hoặc kết hợp với các hoạt chất khác có trong chế phẩm dược như: phương pháp đo sắc ký lớp mỏng (TLC), phương pháp von-ampe sử dụng điện cực giọt thủy ngân treo. Trong các phương pháp phân tích, HPLC là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất do khả năng phân tách tốt các chất phân tích. Theo nghiên cứu đã công bố của nhóm tác giả Fuad Al – Rimawi và Maher Kharoaf [5] dùng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép cặp ion (IP-HPLC) để xác định đồng thời chloramphenicol và hợp chất liên quan 2-amino-1-(4-nitrophenyl) propane-1,3-diol trong dược phẩm, thành phần pha động gồm natri pentanesulfonate (0,012 M): acetonitrile: acid acetic theo tỉ lệ (85:15:1, v/v). Nhược điểm của phương pháp này là mức độ ion hóa của chất khảo sát ảnh hưởng đến sự lưu giữ hợp chất trong cột sắc ký pha đảo (phụ thuộc vào pH thành phần pha động). Bên cạnh đó, cần thời gian dài để cột cân bằng với thành phần pha động. Hơn nữa, khi rửa cột sắc ký không nên dùng nước để rửa giải ion đối ra khỏi cột. Nếu cột được rửa giải bằng nước thay vì dung dịch đệm, những ion có chứa phân tử nước có thể bị hấp phụ lên phần vật liệu nhồi cột (pha tĩnh) và làm hỏng cột sắc ký. Ngoài ra, theo công trình nghiên cứu của Imran Ali và các cộng sự “Phân tích chloramphenicol có trong mẫu sinh học bằng phương pháp HPLC”. Mẫu được tiêm vào hệ thống HPLC, dùng cột sắc ký RP-18 (100 mm \times 4,6 mm \times 5 μ m), thành phần pha động gồm đệm phosphat (0,1 M, pH = 2,5) – ACN theo tỉ lệ (75:25), với tốc độ dòng 1,5 mL/min, phát hiện tại bước sóng 270 nm [3-7]. Đối với hợp chất có tính phân cực như chloramphenicol ($\log_{K_{O/W}} = 1,14$) và yêu cầu định lượng chloramphenicol phải đạt (90-110) % so với

hàm lượng nhãn, nên nhóm tác giả ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC) để định lượng. Sắc ký lỏng thường sử dụng nhất để định lượng từng đơn chất trong hỗn hợp phức tạp thông qua quá trình phân tách trong sắc ký bằng cách so sánh diện tích đỉnh mẫu thử so với chất chuẩn trong cùng điều kiện phân tích. Hơn nữa, ưu điểm của HPLC là nhanh, chính xác, độ tin cậy cao. Phương pháp này còn có thể dễ dàng phân tích các chất trong hỗn hợp ở mức mg/L tới mg/mL nên phù hợp với yêu cầu phân tích [8]. Chính vì thế, nhóm tác giả tiến hành thực hiện đề tài: “Ứng dụng HPLC để định lượng hoạt chất chloramphenicol có trong thuốc mỡ bôi da” với mục tiêu thực hiện thẩm định quy trình định lượng chloramphenicol để phù hợp với đối tượng mẫu thuốc mỡ bôi da và điều kiện phòng thí nghiệm, từ đó cung cấp dữ liệu cho việc áp dụng quy trình phân tích này tại các cơ sở sản xuất dược phẩm trong nước.



Hình 1 Công thức cấu tạo của chloramphenicol

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

Dung môi: nước cất (H_2O), methanol (CH_3OH), dikali hydrophosphat (K_2HPO_4) – tất cả dung môi trên đều của Merck – chất chuẩn chloramphenicol (hàm lượng nguyên trang 99,25 % – Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương).

Thiết bị

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (Hitachi) dùng đầu dò UV-Vis, cân phân tích Shimadzu có độ chính xác 0,0001 g, bộ lọc rút chân không của hãng Agilent, bể siêu âm Daihan Labtech LUC-420, cột sắc ký RP-18 (250 mm \times 4,6 mm \times 5 μ m).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện tối ưu hệ thống sắc ký HPLC

2.2.1.1 Khảo sát ảnh hưởng của thành phần pha động

Tỉ lệ thành phần pha động ảnh hưởng lớn đến quá trình rửa giải chất phân tích ra khỏi cột sắc ký. Trong phương pháp HPLC, khi thành phần pha động thay đổi thì sẽ thay đổi thời gian lưu của chất phân tích qua đó làm thay đổi hệ số dung lượng (k') của chất phân

tích đó. Vì vậy, để có được tỉ lệ thành phần pha động phù hợp cho điều kiện sắc kí cần tiến hành khảo sát tỉ lệ thành phần pha động khác nhau trong cùng điều kiện sắc kí.

Tỉ lệ thành phần pha động gồm hỗn hợp methanol : dung dịch dikali hydrogenphosphat theo tỉ lệ thể tích (90:10; v/v); (80:20; v/v); (70:30; v/v); (60:40; v/v); (50:50; v/v); (40:60; v/v); (30:70; v/v) và (20:80; v/v) (pha dung dịch dikali hydrophosphat bằng cách hòa tan 4,35 g K₂HPO₄ trong 1 000 mL nước).

Bảng 1 Các điều kiện sắc kí cố định

Cột sắc kí	RP-18 (250 mm × 4,6 mm × 5 μm)
Nhiệt độ lò cột °C	40
Thể tích tiêm μL	20
Bước sóng (λ _{max}) nm	280
Tốc độ dòng mL/min	1,0
Dung dịch chuẩn mg/mL	Nồng độ 0,2

Dung môi hòa tan đã pha gồm hỗn hợp methanol-nước theo tỉ lệ thể tích (70:30; v/v).

Dung dịch chuẩn đã chuẩn bị bằng cách cân chính xác 50 mg chloramphenicol chuẩn vào bình định mức 25 mL, hòa tan và pha loãng bằng dung môi hòa tan đến vạch, trộn đều. Hút chính xác 5,0 mL dung dịch chuẩn này vào bình định mức 50 mL, pha loãng bằng dung môi hòa tan đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc milipore 0,45 μm.

2.2.1.2 Khảo sát quy trình xử lí mẫu

Quy trình xử lí mẫu dùng kĩ thuật chiết siêu âm với ưu điểm làm giảm lượng dung môi, thời gian chiết và tăng hiệu quả chiết xuất hơn so với phương pháp ngâm lạnh hay chiết Soxhlet cổ điển. Sóng siêu âm có tác dụng làm tăng sự hòa tan của chất tan vào dung môi và tăng quá trình khuếch tán chất tan. Kĩ thuật chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm thường được sử dụng trong quy trình chuẩn bị mẫu phân tích. Kĩ thuật này thực hiện bằng cách nhúng bình chiết vào một bể siêu âm có chứa nước, sóng siêu âm phát ra từ các đầu phát sẽ truyền qua môi trường nước và đi vào hỗn hợp chiết, có thể gia nhiệt để quá trình chiết được nhanh hơn [9-11].

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc chloramphenicol có nồng độ 0,2 mg/mL.

Chuẩn bị dung dịch mẫu placebo bằng cách cân chính xác một lượng kem tương ứng khoảng 10 mg chloramphenicol vào cốc 100 mL.

Phương pháp chiết siêu âm thực hiện bằng cách thêm dung dịch chuẩn vào mẫu placebo: lấy chính xác 5 mL dung dịch chuẩn có nồng độ 2 mg/mL vào cốc 100 mL đã chứa sẵn khoảng 500 mg mẫu placebo, thêm 30 mL dung môi hòa tan vào cốc 100 mL, dùng đũa thủy tinh khuấy trộn đều, đậy kín và đặt cốc trong bể siêu âm trong 10 phút. Sau đó, cốc được lấy ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 50 mL, tráng cốc, định mức tới vạch bằng dung môi hòa tan và lọc qua giấy Whatman. Cuối cùng, dung dịch được lọc qua màng milipore 0,45 μm [12].

Phương pháp kết hợp kĩ thuật chiết siêu âm và làm lạnh mẫu sau khi chiết với thời gian lần lượt (10, 20, 30 và 40) phút được tiến hành bằng cách thêm dung dịch chuẩn vào mẫu placebo (chuẩn bị 16 mẫu): lấy chính xác 5 mL dung dịch chuẩn có nồng độ 2 mg/mL vào cốc 100 mL đã chứa sẵn 500 g mẫu placebo, thêm 30 mL dung môi vào cốc 100 mL, dùng đũa thủy tinh trộn đều, đậy kín và đặt cốc trong bể siêu âm (đã được gia nhiệt 45 °C) trong 10 phút. Các cốc lấy ra để nguội và chuyển dung dịch vào các bình định mức 50 mL, tráng cốc và định mức tới vạch bằng dung môi. Các dung dịch cho ra cốc và làm lạnh trong nước đá, duy trì nhiệt độ khoảng 10 °C lần lượt trong (10, 20, 30 và 40) phút và lọc qua giấy Whatman. Sau đó, các dung dịch được lọc qua màng milipore 0,45 μm.

Các dung dịch mẫu tiêm vào hệ thống máy HPLC.

2.2.2 Xây dựng phương pháp định lượng

Một quy trình phân tích dùng trong sản xuất dược phẩm cần phải thẩm định để phương pháp đó phù hợp với đối tượng mẫu khảo sát và điều kiện phòng thí nghiệm. Quy trình thẩm định gồm tính tương thích của hệ thống sắc kí, tính tuyến tính, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng [13].

2.2.2.1 Tính tương thích của hệ thống sắc kí

Thực hiện tiêm lặp 6 lần mẫu chuẩn có nồng độ 0,2 mg/mL.

Yêu cầu đạt được tính tương thích hệ thống khi các thông số sắc kí thực hiện trên mẫu chuẩn có %RSD không quá 2.

2.2.2.2 Khoảng tuyến tính

Chuẩn bị dãy mẫu chuẩn có nồng độ khác nhau (50, 80, 100, 120 và 150) % (so với nồng độ lí thuyết) của chloramphenicol để xác định khoảng nồng độ tuyến tính.

Dung dịch chuẩn gốc chloramphenicol được pha bằng cách cân chính xác 50 mg chloramphenicol vào bình

định mức 25 mL, hòa tan bằng dung môi và định mức tới vạch.

Bảng 2 Pha dung dịch chuẩn (50, 80, 100, 120 và 150) %

STT	1	2	3	4	5
Tỉ lệ (%)	50	80	100	120	150
V _{chuẩn} (mL)	5	4	5	3	3
Bình định mức (mL)	100	50	50	25	20
Nồng độ (mg/mL)	0,1	0,16	0,2	0,24	0,3

Tiến hành tiêm các dung dịch mẫu vào hệ thống máy HPLC: 3 mũi tiêm/mẫu, tính giá trị trung bình diện tích đỉnh của 3 mũi tiêm. Khảo sát sự tương quan giữa đại lượng A (diện tích đỉnh) và C (nồng độ), hệ số tương quan trong khoảng giá trị $0,99 \leq R^2 \leq 1$ và sử dụng phân tích hồi quy với tiêu chuẩn t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy và tiêu chuẩn F để kiểm tra tính thỏa mãn phương trình hồi quy.

2.2.2.3 Tính đặc hiệu

Tính chọn lọc thực hiện bằng cách pha các dung dịch sau:

- Dung dịch chuẩn
- Dung dịch thử
- Dung dịch mẫu placebo
- Dung dịch thêm chuẩn vào placebo

Sau đó, quan sát hình dạng và so sánh thời gian lưu peak sắc kí của hoạt chất có trong các dung dịch.

Yêu cầu đạt được: thời gian lưu của chất phân tích có trong mẫu thử phải tương đương với thời gian lưu của chất phân tích trong mẫu chuẩn, đồng thời mẫu placebo không có peak trùng với peak của chất phân tích. Peak của chất phân tích tách hoàn toàn các peak khác trong sắc kí đồ mẫu thử.

2.2.2.4 Độ lặp lại

Tiến hành pha 6 dung dịch mẫu thử và tiêm vào hệ thống HPLC (theo quy trình định lượng) để xác định hàm lượng chloramphenicol trong mẫu thử của thuốc mỡ bôi da.

Yêu cầu về hàm lượng hoạt chất khoảng (90-110) %

Độ lệch chuẩn tương đối hàm lượng hoạt chất không quá 2 % và hệ số này càng nhỏ thì quy trình định lượng càng chính xác.

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 % chloramphenicol trong chế phẩm so với hàm lượng ghi trên nhãn, tính theo công thức:

$$HL(\%) = \frac{S_T}{S_C} \times m_C \times \frac{P}{100} \times \frac{DPL_T}{DPL_C} \times \frac{m_{TB}}{m_T} \times \frac{100}{HLN}$$

Trong đó:

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

m_{TB} : khối lượng trung bình của 10 tuýp kem, mỗi tuýp có khối lượng khoảng 8 g.

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

P: % hàm lượng của chloramphenicol chuẩn.

DPL_C, DPL_T : độ pha loãng lần lượt của mẫu chuẩn, thử.

HLN: hàm lượng nhãn chloramphenicol tuýp kem 160 mg.

2.2.2.5 Độ đúng

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 chloramphenicol (80, 100 và 120) % (so với nồng độ lí thuyết). Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu tương tự.

Độ đúng 80 %: cân chính xác 16 mg chloramphenicol vào cốc 100 mL, thêm khoảng 1 g mẫu placebo, thêm 50 mL dung môi hòa tan vào cốc 100 mL, dùng đũa thủy tinh trộn đều, đặt cốc trong bể siêu âm (đã gia nhiệt 45 °C) trong 10 phút, lấy cốc ra để nguội, chuyển dung dịch vào bình định mức 100 mL, tráng cốc và định mức tới vạch bằng dung môi. Dung dịch cho ra cốc, làm lạnh trong nước đá, duy trì nhiệt độ khoảng 10 °C trong 30 phút và lọc qua giấy Whatman. Sau đó, dung dịch này được lọc qua màng milipore 0,45 µm.

Độ đúng 100 %: cân chính xác 20 mg chloramphenicol vào cốc 100 mL, thêm khoảng 1 g mẫu placebo, thêm 50 mL dung môi hòa tan vào cốc 100 mL, dùng đũa thủy tinh trộn đều, đặt cốc trong bể siêu âm (đã gia nhiệt 45 °C) trong 10 phút, lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 mL, tráng cốc và định mức tới vạch bằng dung môi hòa tan. Dung

dịch cho ra cốc, làm lạnh trong nước đá, duy trì nhiệt độ khoảng 10 °C trong 30 phút và lọc qua giấy Whatman. Sau đó, dung dịch này được lọc qua màng milipore 0,45 µm.

Độ đúng 120 %: cân chính xác 24 mg chloramphenicol vào cốc 100 mL, thêm khoảng 1 g mẫu placebo, thêm 50 mL dung môi hòa tan vào cốc 100 mL, dùng đũa thủy tinh trộn đều, đặt cốc trong bể siêu âm (đã gia nhiệt 45 °C) trong 10 phút, lấy cốc ra để nguội và chuyển dung dịch vào bình định mức 100 mL, tráng cốc và định mức tới vạch bằng dung môi. Cho dung dịch ra cốc và làm lạnh trong nước đá, duy trì nhiệt độ khoảng 10 °C trong 30 phút và lọc qua giấy Whatman. Sau đó, dung dịch này được lọc qua màng milipore 0,45 µm.

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

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

Ghi chú:

m_{TT} : nồng độ (mg/mL) của chloramphenicol tìm thấy.

m_{TV} : nồng độ (mg/mL) của chloramphenicol thêm vào.

Yêu cầu %HSTH đạt trong khoảng (98-102), %RSD độ đúng 9 mẫu (3 nồng độ) < 2,0.

2.2.3 Phân tích, xử lý số liệu

Phương pháp tiến hành thẩm định khoảng tuyến tính tiến hành thực nghiệm để xác định các giá trị đo được A (diện tích đỉnh) theo C (nồng độ) [14].

Để khảo sát tính tuyến tính: tiến hành tối thiểu 5 mức nồng độ khác nhau, đo và xác định độ đáp ứng của đại lượng đo (diện tích đỉnh) theo từng nồng độ bằng cách thiết lập phương trình hồi quy và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa tính hiệu đáp ứng (diện tích đỉnh) theo nồng độ.

Đánh giá tính tuyến tính bằng cách quan sát đường biểu diễn của tín hiệu đáp ứng (diện tích) theo nồng độ và xác định bằng phương pháp thống kê thích hợp dựa vào tương quan hồi quy: $A = aC + b$ (a: độ dốc, b: tung độ gốc).

Sử dụng phân tích hồi quy với tiêu chuẩn t để kiểm tra ý nghĩa các hệ số trong phương trình hồi quy và tiêu chuẩn F để kiểm tra tính thỏa mãn phương trình hồi quy.

Tiêu chuẩn thống kê: tiêu chuẩn t (phân phối Student):

Giả thiết:

$H_0: B_j = 0$ “hệ số B_j không có ý nghĩa thống kê”

$H_A: B_j \neq 0$ “hệ số B_j có ý nghĩa thống kê”

Giá trị thống kê $t = b/S_b$

Thử nghiệm t (phân phối Student)

b: tung độ gốc của phương trình hồi qui $A = aC + b$

S_b : sai số chuẩn

Biện luận:

Nếu $t_0 < t_{0,05} (N - 2)$ suy ra chấp nhận giả thuyết H_0

Nếu $t_0 > t_{0,05} (N - 2)$ suy ra chấp nhận giả thuyết H_A ,

($t_{0,05} = \text{TINV} (0,05, \gamma)$, với $\gamma = N - 2$)

Tiêu chuẩn F (phân phối Fisher):

Giả thuyết:

$H_0: B_j = 0$ “phương trình hồi quy không thỏa mãn”.

$H_A: B_j \neq 0$ “phương trình hồi quy thỏa mãn”.

Giá trị thống kê $F = \frac{S_f^2}{S_r^2}$

S_f^2, S_r^2 : phương sai yếu tố khảo sát và phương sai yếu tố ngẫu nhiên

Biện luận:

Nếu $F < F_{0,05}$ chấp nhận giả thuyết H_0

Nếu $F > F_{0,05}$ chấp nhận giả thuyết H_A ($F_{0,05} = \text{FINV}$

(0,05, γ_1, γ_2), $\gamma_1 = k, \gamma_2 = N - k - 1$).

So sánh độ chính xác của hai dãy thí nghiệm: so sánh độ chính xác của hai dãy số liệu, sử dụng F test bằng cách thiết lập tỉ số về phương sai của hai phương pháp:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} (F > 1)$$

Nếu $F(t_n) < F(t)$ thì độ chính xác hai dãy thí nghiệm là đồng nhất hoặc hai phương pháp hay hai người làm tương đương.

Nếu $F(t_n) > F(t)$ thì độ chính xác của hai dãy thí nghiệm là không đồng nhất.

3 Kết quả nghiên cứu

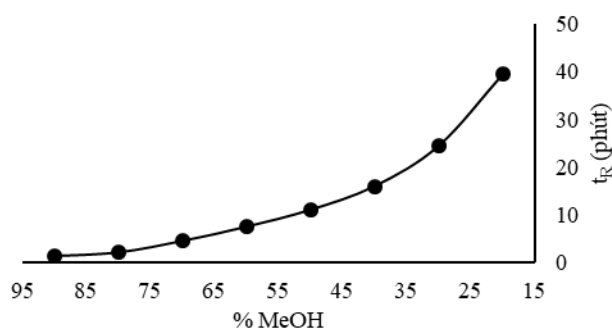
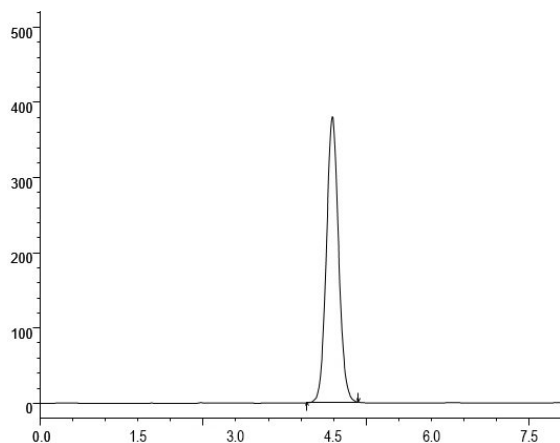
3.1 Khảo sát điều kiện phân tích sắc kí

3.1.1 Khảo sát thành phần pha động

Tiến hành khảo sát theo Mục 2.2.1.1 và kết quả (Bảng 3).

Bảng 3 Kết quả khảo sát thành phần pha động

Tỉ lệ (%) thành phần pha động		t_R (phút)	Hệ số kéo đuôi (T)
Methanol	Dikali hydrogenphosphat		
90	10	1,30	0,75
80	20	2,10	0,90
70	30	4,51	1,11
60	40	7,50	1,23
50	50	11,05	1,20
40	60	16,00	1,30
30	70	24,50	1,45
20	80	39,50	1,74

**Hình 2** Sự ảnh hưởng % MeOH đến thời gian lưu**Hình 3** Sắc ký đồ của $CH_3OH : K_2HPO_4$ theo tỉ lệ (70:30; v/v)

Kết quả khảo sát thành phần pha động của chloramphenicol được thể hiện tại Hình 2 và Hình 3, khi tỉ lệ methanol càng tăng (20-70) % thì thời gian lưu càng ngắn, hiện tượng kéo đuôi giảm dần $T = (1,74-1,11)$. Tuy nhiên, khi tỉ lệ methanol tăng lên (80-90) % thì peak sắc ký bị đổ đầu $T = (0,90-0,75)$ và hợp chất chloramphenicol ra quá sớm $t_R = (2,1-1,3)$ phút. So sánh với kết quả đã nghiên cứu trước đó, xác định đồng thời

hàm lượng chloramphenicol và hydrocortisone acetate trong kem bôi da, sử dụng điều kiện sắc kí gồm cột RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), thành phần pha động ACN- H_2O theo tỉ lệ (47:53; v/v), tốc độ dòng 0,9 mL/min thu được chloramphenicol có thời gian lưu 4,05 phút và hình dạng peak có hệ số kéo đuôi cao ($T = 1,3$) [15]. Trong nghiên cứu chọn dung môi methanol với ưu điểm về độ hòa tan chloramphenicol trong methanol (> 20 mg/mL) tan tốt hơn so với acetonitrile (0,1 mg/mL) nên phương pháp đề xuất dùng methanol làm dung môi hòa tan mẫu và đồng thời cũng làm thành phần pha động nhằm tránh hiện tượng chệch peak sắc kí do dung môi hòa tan mẫu và thành phần pha động không tương thích với nhau. Hơn nữa, sự thay thế dung môi acetonitrile bằng methanol sẽ tốt hơn, vì hình dạng peak sắc kí được cải thiện có hệ số kéo đuôi 1,11, số đĩa lí thuyết lớn (5 845), thời gian lưu (t_R) 4,5 phút phù hợp với yêu cầu sắc kí. Vì vậy, thành phần pha động gồm hỗn hợp methanol và dikali hydrogenphosphat tỉ lệ thể tích (70:30; v/v) được chọn cho khảo sát tiếp theo.

3.1.2 Khảo sát điều kiện xử lí mẫu

Tiến hành khảo sát 2 phương pháp chiết siêu âm và kết hợp chiết siêu âm với thời gian làm lạnh trong mẫu thuốc mỡ bôi da tương ứng lần lượt (10, 20, 30 và 40) phút và cách chuẩn bị các dung dịch được thể hiện ở Mục 2.2.1.2.

Bảng 4 Khảo sát thời gian làm lạnh sau khi chiết siêu âm

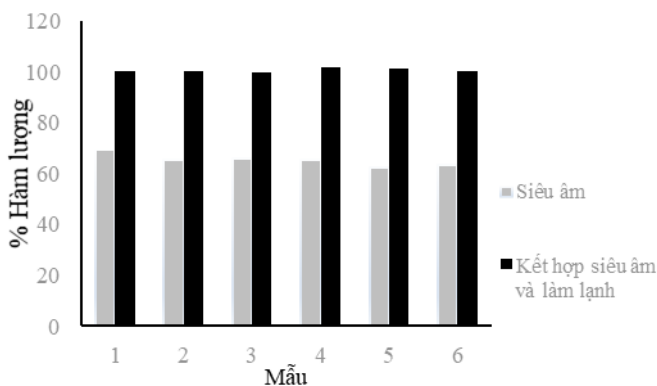
Thời gian làm lạnh (phút)	m (mg)	HSTH (%)	%RSD
10	510,50	69,21	2,43
20	511,23	77,69	1,87
30	512,30	100,73	0,61
40	508,97	100,93	0,44

Kết quả %HSTH của hoạt chất chloramphenicol sau khi mẫu thử đã chiết siêu âm và làm lạnh được trình bày ở Bảng 4. %HSTH tăng từ 69,21 đến 77,69 tương ứng với thời gian lần lượt là 10 phút và 20 phút, và tại 20 phút (%RSD = 1,87) ít dao động hơn so với 10 phút (%RSD = 2,43). Kết quả cho thấy càng tăng thời gian làm lạnh thì % HSTH và %RSD càng được cải thiện đáng kể. Do đó, nhóm tác giả tăng thời gian làm lạnh lên (30 và 40) phút, đồng thời so sánh hai khoảng thời gian trên về %HSTH lần lượt tương ứng là 100,73 và 100,93, và phần trăm độ lệch chuẩn nhỏ hơn 2, chứng tỏ hoạt chất chloramphenicol đã được chiết hoàn toàn khỏi nền mẫu. Vì vậy, để tiết kiệm

thời gian phân tích, chọn 30 phút là thời gian làm lạnh tối ưu sau khi mẫu thử đã được chiết siêu âm cho quy trình xử lí mẫu để xác định hàm lượng chloramphenicol trong thuốc mỡ bôi da.

Bảng 5 Kết quả % HSTH trong thuốc mỡ bôi da của 2 phương pháp

STT	Chiết siêu âm		Chiết siêu âm và làm lạnh	
	m (mg)	HSTH (%)	m (mg)	HSTH (%)
1	519,4	69,61	518,5	100,52
2	508,2	65,61	518,2	100,25
3	503,9	66,04	503,6	99,96
4	517,8	65,3	509,8	101,68
5	520,6	62,2	500,2	101,43
6	511,5	63,51	513,5	100,57
TB	513,56	65,38	510,63	100,74
%RSD	1,31	3,87	1,48	0,67



Hình 4 So sánh kĩ thuật chiết siêu âm và siêu âm kết hợp làm lạnh

Kĩ thuật chiết bằng sóng siêu âm được áp dụng để tăng hiệu quả chiết. Sóng siêu âm với tần số 20 kHz có tác dụng làm tăng sự hòa tan của chloramphenicol vào dung môi hòa tan và tăng quá trình khuếch tán chất tan ra khỏi nền mẫu. Trong thuốc mỡ bôi da, thành phần gồm chloramphenicol, Polawax GB 200, cetyl alcohol, glycerin monostearat, sáp ong, mỡ trăn, propylen glycol, polysorbat 80, nipagin, nipasol, nước tinh khiết nên chứa hàm lượng béo cao. Đồng thời, hoạt chất chloramphenicol có trong mẫu thử là hợp chất có độ phân cực ($\log K_o/w = 1,14$). Vì vậy, nếu không loại bỏ hàm lượng béo trong quy trình xử lí mẫu thì chất phân tích sẽ không được chiết hoàn toàn ra khỏi nền mẫu. Một trong những cách loại béo là mẫu sau khi đã được chiết siêu âm, đem đặt mẫu vào

trong bể nhiệt độ thấp khoảng 10 °C để chuyển chất béo thành dạng rắn. Sau đó, tiến hành lọc để loại bỏ phần chất béo và lấy phần dung dịch đem đi phân tích. Kết quả so sánh giữa hai phương pháp chiết siêu âm và phương pháp kết hợp siêu âm với làm lạnh được biểu diễn theo Hình 4. %HSTH của phương pháp kết hợp siêu âm với làm lạnh tăng 1,54 lần (tăng từ 65,38 lên 100,74) so với phương pháp chiết siêu âm. Đồng thời, so sánh phần trăm độ lệch chuẩn tương đối của chiết siêu âm có %RSD = 3,87 (> 2) dao động hơn so với chiết kết hợp siêu âm và làm lạnh có %RSD = 0,67 (< 2). Chứng tỏ chỉ dùng kĩ thuật chiết siêu âm thì nền mẫu ảnh hưởng lớn, làm cho phép phân tích kém chính xác và kém tin cậy nên cần kết hợp kĩ thuật chiết siêu âm và làm lạnh để loại các chất béo (sáp ong, mỡ trăn) có trong mẫu.

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc kí
 Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống khi tiêm lặp 6 lần dung dịch chuẩn chloramphenicol có nồng độ 0,2 mg/mL vào hệ thống máy sắc kí lỏng và ghi nhận lại hình dạng và kết quả sắc kí đồ.

Bảng 6 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

STT	t_R (phút)	N	T	S (mAu)
1	4,50	5 845	1,11	12 774 196
2	4,51	5 839	1,12	12 557 957
3	4,5	5 881	1,11	12 769 829
4	4,51	5 845	1,1	12 647 644
5	4,51	5 859	1,1	12 865 709
6	4,5	5 848	1,12	12 626 203
TB	4,51	5 852,83	1,11	12 706 923
%RSD	0,12	0,26	0,81	0,9

t_R : thời gian lưu, N: số đĩa lí thuyết, T: hệ số kéo đuôi, S: diện tích đỉnh

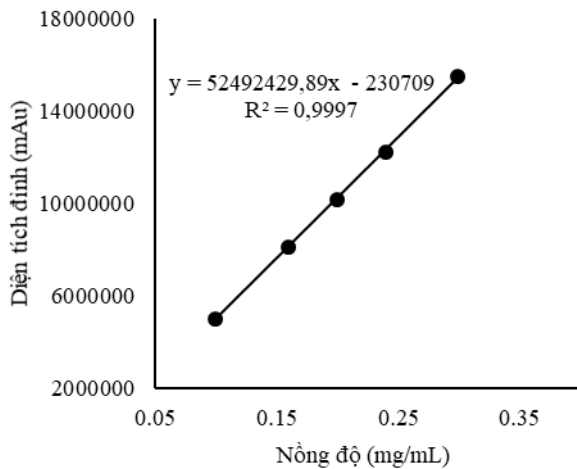
Các thông số gồm thời gian lưu (t_R), diện tích đỉnh (S), hệ số kéo đuôi (T) của các đỉnh là 1,11 nằm trong khoảng yêu cầu (0,8-1,5) và số đĩa lí thuyết (N) đều có %RSD < 2 nên quy trình có tính tương thích hệ thống.

3.2.2 Khoảng tuyến tính

Khảo sát khoảng tuyến tính bằng cách tiến hành sắc ký 5 mức nồng độ khác nhau, đo và xác định diện tích đỉnh ở từng nồng độ, thiết lập phương trình hồi quy và vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích đỉnh (S) và nồng độ (C) được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7 Kết quả dung dịch chuẩn ở các nồng độ khác nhau

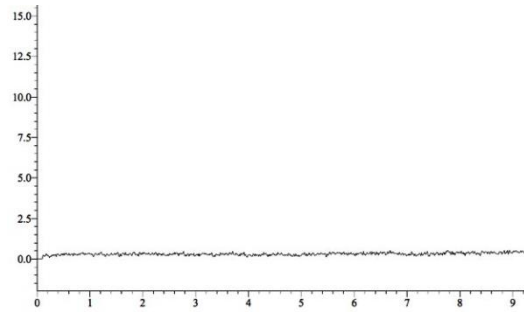
STT (%)	m _{chuẩn} (mg)	Độ pha loãng	Nồng độ chuẩn (mg/mL)	Diện tích đỉnh (mAu)
50	50,2	500	0,099 65	5 043 080
80	50,2	312,5	0,159 4	8 148 570
100	50,2	250	0,199 3	10 181 339
120	50,2	208,33	0,239 2	12 237 140
150	50,2	166,67	0,298 9	15 542 409

**Hình 5** Đường tuyến tính của chloramphenicol

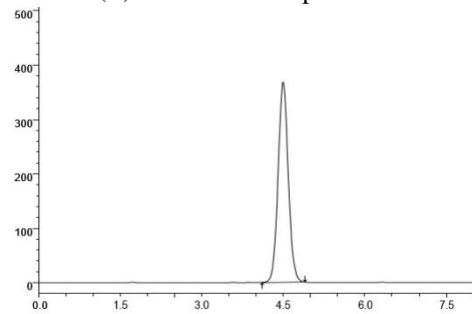
Xây dựng đường chuẩn $A = aC + b$ (Hình 5). Trong đó, (C) biểu thị nồng độ chloramphenicol, (A) là diện tích đỉnh trung bình mỗi mẫu chuẩn.

Đánh giá tính tuyến tính của chloramphenicol bằng cách sử dụng tiêu chuẩn Student (t) để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số và tiêu chuẩn F (phân phối Fischer) để chứng minh là có tính tương thích trong phương trình hồi quy. Qua tiêu chuẩn F, phương trình hồi quy có tính tương thích với $F = 9932,82 > F_{0,05} = 10,12$ và qua tiêu chuẩn t, hệ số a (độ dốc) có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 99,66 > t_{0,05} = 3,18$), hệ số b (tung độ gốc) không có ý nghĩa thống kê nên bị loại ($t = -2,08 < t_{0,05} = 3,18$). Vậy phương trình hồi quy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích đỉnh trong khoảng nồng độ (0,09965-0,298 9) mg/mL, với $R^2 = 0,9997$ (yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$).

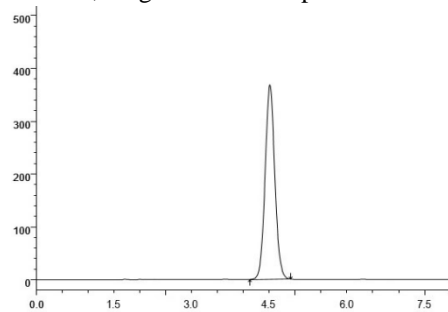
3.2.3 Tính đặc hiệu: tiêm vào hệ thống sắc kí các dung dịch với thể tích 20 μ L đã chuẩn bị ở Mục 2.2.2.3 gồm mẫu placebo, mẫu chuẩn thêm vào placebo, mẫu chuẩn, mẫu thử.



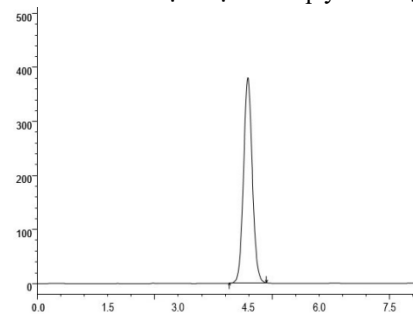
(A) Sắc kí đồ mẫu placebo



(B) Sắc kí đồ thêm chuẩn chloramphenicol có nồng độ 0,2 mg/mL vào mẫu placebo



(C) Sắc kí đồ mẫu thử thực hiện theo quy trình định lượng



(D) Sắc kí đồ của chloramphenicol chuẩn tại nồng độ 0,2 mg/mL

Hình 6 Sắc kí đồ minh họa tính đặc hiệu của quy trình định lượng

Sự phân tách chloramphenicol thực hiện trên cột pha đảo RP-18 (250 mm × 4,6 mm × 5 μm), sử dụng thành phần pha động gồm methanol : dung dịch K₂HPO₄ theo tỉ lệ thể tích (70:30; v/v), và rửa giải đẳng dòng với tốc độ 1 mL/min, bước sóng phát hiện 280 nm.

Sắc kí đồ HPLC của mẫu placebo (âm tính) không có peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chuẩn chloramphenicol trong mẫu chuẩn (Hình 6).

Sắc kí đồ HPLC chuẩn chloramphenicol thêm vào mẫu placebo có 1 peak, có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chloramphenicol trong mẫu chuẩn. Sắc kí đồ HPLC của mẫu thử có 1 peak, có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak chloramphenicol 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 chloramphenicol đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.2.4 Độ lặp lại

Tiến hành trên 6 mẫu thử và xác định diện tích đỉnh trung bình, từ đó xác định hàm lượng % chloramphenicol có trong mẫu. Kết quả hàm lượng % chloramphenicol trong mẫu so với hàm lượng nhãn được thể hiện ở Bảng 8

Bảng 8 Kết quả độ lặp lại của hàm lượng mẫu thử

m (mg)	S (mAu)	% HL	Thống kê
518,5	12 897 067	100,52	n = 6, SD = 0,67 $X_{tb} = 100,74 \%$ $\%RSD = 0,67$ $\epsilon = \pm 0,70$ (t = 2,57, P = 95 % Khoảng tin cậy: $\mu = 100,74 \pm 0,7$
518,2	12 855 287	100,25	
503,6	12 456 967	99,96	
509,8	12 966 357	101,68	
500,2	12 554 988	101,43	
513,5	12 778 992	100,57	

m: lượng cân thử, S: diện tích đỉnh, % HL: hàm lượng % so với nhãn

Áp dụng quy trình phân tích để xác định hàm lượng hoạt chất chloramphenicol trong thuốc mỡ bôi da đang lưu hành trên thị trường. Xử lí mẫu và phân tích 6 mẫu thử độc lập, lặp lại trong 2 ngày. Sau đó, trình bày kết quả định lượng chloramphenicol trong mẫu thử tiến hành trong 2 ngày khác nhau trên cùng một điều kiện phân tích ở Bảng 9

Bảng 9 Kết quả định lượng chloramphenicol trong mẫu thử

Mẫu	Ngày 1		Ngày 2		Thống kê
	Lượng cân thử (mg)	Hàm lượng % so với nhãn	Lượng cân thử (mg)	Hàm lượng % so với nhãn	
1	518,5	100,52	520,5	99,34	$X_{tb} = 100,03 \%$ $F_{tn} = \frac{S_1^2}{S_2^2} = 0,6761^2 = 2,32$ $0,4435^2$ $F_{tn} < F_{tt}$ (2,32 < 5,05) P = 95 %
2	518,2	100,25	519,2	99,02	
3	503,6	99,96	500,6	100	
4	509,8	101,68	510,6	99,11	
5	500,2	101,43	500,5	99,67	
6	513,5	100,57	511,3	98,85	
Trung bình		100,74	510,45	99,33	
SD		0,6761		0,4435	
%RSD = 0,91					

Khảo sát độ chính xác hàm lượng chloramphenicol trong thuốc mỡ bôi da đạt yêu cầu về hàm lượng hoạt chất trong khoảng (90-110) % và %RSD (n = 6) là 0,67 < 2. Định lượng 6 dung dịch mẫu thử khác nhau có nồng độ tương đương nhau với khoảng tin cậy là (100,74 ± 0,7) %. Đồng thời, áp dụng phương pháp phân tích đã tối ưu để định lượng chloramphenicol trong mẫu thuốc lưu hành ngoài thị trường có %RSD = 0,91 < 2 và dùng thống kê theo chuẩn Fischer (F) để đánh giá độ chính xác của 2 ngày khác nhau dựa trên hai dãy dữ liệu có $F_{tn} = 2,32 < F_{tt} = 5,05$ có sự tương đồng với nhau. Chứng tỏ quy trình phân tích có tính ổn định và chính xác cao.

3.2.5 Độ đúng

Thêm chuẩn chloramphenicol vào mẫu placebo và xác định lại nồng độ có trong mẫu. Thực hiện 3 nồng độ chloramphenicol (80, 100 và 120) % (so với nồng độ lí thuyết) và xác định lại lượng hoạt chất chloramphenicol có trong mẫu. Kết quả được trình bày ở Bảng 10.

Bảng 10 Kết quả độ đúng (80, 100 và 120) %

Mẫu (%)	m_{placebo} (g)	Lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích đỉnh (mAu)	Lượng chuẩn tìm lại ($\mu\text{g/mL}$)	Độ đúng (%)
80	0,961 2	167,73	10 433 521	169,80	101,23
	1,068 2	160,79	9 817 499	159,78	99,37
	1,034 3	163,76	9 910 614	161,29	98,49
100	1,057 8	205,45	12 452 581	202,66	98,64
	1,030 5	205,45	12 605 409	205,15	99,85
	1,014 5	203,46	12 581 114	204,75	100,63
120	0,995 2	245,15	15 217 087	247,65	101,02
	1,003	244,16	14 817 114	241,14	98,77
	0,979 1	239,19	14 594 794	237,52	99,30
Trung bình					99,7
%RSD					1,05

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp định lượng chloramphenicol có hiệu suất thu hồi của 9 mẫu trong khoảng (98,49-101,23) % và nằm trong khoảng yêu cầu (98-102) %. Đồng thời, giá trị %RSD = 1,05 < 2. Như vậy, quy trình định lượng đạt về độ đúng.

4 Kết luận và đề nghị

Nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp sắc kí lỏng, dùng cột RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) để xác

định hàm lượng chloramphenicol trong thuốc mỡ bôi da và kết quả đạt yêu cầu về hàm lượng. Phương pháp đã tối ưu tỉ lệ thành phần pha động methanol : dung dịch dikali hydrogenphosphat theo tỉ lệ thể tích (70:30; v/v) thu được hình dạng peak đối xứng, giảm hiện tượng kéo đuôi hoặc đổ đầu và thời gian phân tích. Đồng thời, so sánh giữa hai phương pháp chiết siêu âm và phương pháp kết hợp siêu âm với làm lạnh, %HSTH của phương pháp kết hợp siêu âm với làm lạnh tăng 1,54 lần (tăng từ 65,38 lên 100,74) so với phương pháp chiết siêu âm và so sánh tỉ lệ độ lệch chuẩn tương đối của chiết siêu âm có %RSD = 3,87 > 2 dao động hơn so với chiết kết hợp siêu âm và làm lạnh có %RSD = 0,67 < 2. Phương pháp đã thẩm định các thông số theo hướng dẫn của Hội nghị Quốc tế về sự Hải hòa các yêu cầu kĩ thuật đối với dược phẩm dùng cho con người (ICH) và đạt yêu cầu gồm độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại với tỉ lệ độ lệch chuẩn tương đối < 2 %, hiệu suất thu hồi trong khoảng (98,49-101,23) % và khoảng tuyến tính (0,09965-0,2989) mg/mL với $R^2 = 0,9997$. Do đó, phương pháp đề xuất có thể được áp dụng để xác định hàm lượng chloramphenicol có trong mẫu nguyên liệu hoặc thành phẩm chứa hoạt chất chloramphenicol ở dạng thuốc mỡ bôi da tại các công ty dược phẩm.

Tài liệu tham khảo

- Hội đồng Dược điển (2017), Dược điển Việt Nam V, Nhà xuất bản Y học, tr. 119-143
- Bộ Y tế (2016), Hóa Dược 1, Nhà xuất bản Y học, tr. 173-180.
- Nguyễn Phương Hà (2011), Nghiên cứu xác định Chloramphenicol trong dược phẩm bằng phương pháp von-ampe sử dụng điện cực giọt thủy ngân treo. Luận văn thạc sĩ, Trường ĐHKHTN, ĐHQG Hà Nội.
- Zeng Yu-Mei, Chen Fan-Hua (2015), Content Determination of Three Main Drugs in Chloramphenicol Sulfone Ointment by HPLC, Meizhou Institute for Food and Drug Control.
- Fuad Al-Rimawi, Maher Kharoaf (2011), Analysis of Chloramphenicol and Its Related Compound 2-Amino-1-(4-nitrophenyl) propane-1,3-diol by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection, Chromatography Research International.
- Nia Kristiningrum, Mia Rakhmawati (2012), Simultaneous determination of Chloramphenicol and Hydrocortisone acetate in cream using TLC desitrometry method, International *Current Pharmaceutical Journal*.

7. Imran Ali, et al (2013), Analysis of Chloramphenicol in Biological Samples by SPE-HPLC, Taylor & Francis.
8. Bộ Y tế (2016), Hóa phân tích. Tập 2. Phân tích dụng cụ, Nhà xuất bản Y học, tr. 116-128.
9. Ngô Văn Thu, Trần Hùng (2017), Dược liệu học, Nhà xuất bản Y học, tr. 70-71.
10. Tania Martínez – Ramos, José Benedito – Fort, et al (2020), Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound – assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.), *Food and Bioproducts Processing*.
11. Anahí J. Borrás – Enríquez et al (2021), Effect of Ultrasound – Assisted Extraction Parameters on Total Polyphenols and Its Antioxidant Activity from Mango Residues (*Mangifera indica* L. var. *Manililla*), MDPI.
12. The United States Pharmacopoeia 43 (2020), The United States Pharmacopoeial Convention, 27th Edition 45 (3), pp. 1-2.
13. European Medicines Agency (2021), ICH (International Conference on Harmonization) guideline Q2 (R2) on validation of analytical procedures, pp. (145-389).
14. Bộ Y tế (2012), Kiểm nghiệm thuốc, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, tr. 137-180.
15. Kusnul Khotimah, Sudibyo Martono, Abdul Rohman (2020), Box – Behnken design-based HPLC optimization for quantitative analysis of Chloramphenicol and Hydrocortisone acetate in cream, Journal of Applied Pharmaceutical Science.

Validation of quantitation analytical procedure of chloramphenicol in ointment with high performance liquid chromatography (HPLC)

Nguyen Thi Thu Thao, Mai Thanh Nhan
Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University
nguyentthao@ntt.edu.vn

Abstract An accurate and sensitive method was developed for the qualitative and quantitative analysis of chloramphenicol in ointment using high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. Experimental results optimized the chromatographic conditions with the mobile phase component being methanol: dikali hydrophosphat solution at (70:30; v/v) at flow rate of 1.0 mL/min which reduced the running time of the samples and the chromatograms obtained met the symmetry coefficient. At the same time, optimizing the processing of samples with a high fat content, using a combination of ultrasound and cooling, % recovery efficiency increased significantly from (65.38 to 100.74) % and relative standard deviation %RSD = 0.67 (< 2) compared to ultrasound – assisted extraction method. Quantitative results of chloramphenicol obtained a linear concentration range of (0.09965-0.2989) mg/mL. The accuracy of the method was determined by the recovery rate in the range of (98.49-101.23) %, corresponding to the concentration of (0,1677-0,2392) mg/mL and the repeatability (in %RSD) of 1.05 %. The analytical procedure met the criteria of specificity, linearity, accuracy, and precision set by the guidance of ICH – The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. This analytical procedure can be applied in routine quality control of chloramphenicol in ointment.

Keywords chloramphenicol, high performance liquid chromatography (HPLC), ointment, validation, antibiotic