

Tối ưu hóa qui trình phân tích để định lượng cefaclor trong viên nang cứng 250 mg bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Thu Thảo, Mai Thanh Nhân

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

Tóm tắt

Cefaclor là một chất zwitterion và mức độ ion hoá của cefaclor 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 2,5; pH 4,5 và pH 7,5. Nghiên cứu này ứng dụng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao, dùng cơ chế ghép cặp ion vì có độ tin cậy và chính xác cao, để xác định hàm lượng cefaclor trong viên nang cứng. Kết quả đã đạt được tối ưu thành phần pha động pH 2,5, 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 và thể tích tiêm mẫu 10 µL, thu được trên sắc kí đồ có peak đối xứng với hệ số kéo đuôi 0,988. Quy trình dùng cột sắc kí RP-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), nhiệt độ cột 40 °C, bước sóng phát hiện 265 nm và thành phần pha động có đệm pH 2,5 với kiểu rửa giải đẳng dòng. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình có độ đặc hiệu cao, đạt độ tuyến tính, đạt độ lặp lại với %RSD = 0,40, đạt độ đúng với tỉ lệ phục hồi 100,05%. Nghiên cứu đã sử dụng qui trình trên để kiểm nghiệm 3 loại thuốc viên nang cứng cefaclor đang lưu hành trên thị trường. Kết quả, cả 3 mẫu thuốc đều đạt hàm lượng cefaclor theo quy định Dược điển Việt Nam V.

Nhận 07/06/2023
Được duyệt 24/07/2023
Công bố 12/09/2023

Từ khóa
tối ưu hóa, định lượng, cefaclor, viên nang cứng, kháng sinh, sắc kí ghép cặp ion (IPC), phương pháp HPLC

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Cefaclor là một kháng sinh cephalosporin, bán tổng hợp, thế hệ 2, có tác dụng diệt vi khuẩn đang trong giai đoạn phát triển và phân chia bằng cách ức chế tổng hợp thành tế bào vi khuẩn. Cefaclor có tác dụng đối với cầu khuẩn Gram dương nhưng có tác dụng mạnh hơn đối với các vi khuẩn Gram âm, đặc biệt với *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis*, ngay cả với *H. influenzae* và *M. catarrhalis* sinh ra beta lactamase. Cefaclor thường dùng trong trường hợp nhiễm trùng đường hô hấp trên do *S. pyrogenes*, đường hô hấp dưới hoặc viêm tai giữa do *S. pneumoniae* hoặc *H. influenzae*, nhiễm trùng tiêu do *E. coli*, *Proteus mirabilis*, và *Klebsiella*. Cefaclor dùng theo đường uống ở dạng viên nang và hỗn dịch uống, có thể uống lúc no hoặc đói [1].

Cefaclor dạng bột màu trắng hoặc vàng nhạt, ít tan trong nước, không tan được trong methanol và dicloromethan, cefaclor tên hóa học là acid (6R,7R)-7- [(R)-2-Amino-2-phenylacetamido]-3-chloro-8-oxo-5-thia-1-aza bicyclo [4,2,0]oct-2-ene-2-carboxylic axit monohydrate), công thức thực nghiệm C₁₅H₁₄ClN₃O₄S.H₂O và khối lượng phân tử 385,8 g.mol⁻¹. Cefaclor là một chất zwitterion do có nhóm amino-acid và pH đẳng điện khoảng 4,35 (pKa₁ = 1,5, pKa₂ = 7,2) [2,3].

Theo các tài liệu nghiên cứu, các tác giả đã dùng nhiều phương pháp phân tích khác nhau để xác định hàm lượng cefaclor trong các nền mẫu khác nhau như trong huyết tương, trong chế phẩm thuốc bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại – khả kiến (UV – Vis) hoặc sắc kí lỏng hiệu năng cao (RP-HPLC), quang phổ hồng



ngoại gần và trung bình [4-7]. Năm 2003, có nghiên cứu dùng phương pháp HPLC để xác định cefaclor trong huyết tương người, dùng pha động gồm axetonitril và dung dịch đệm dihydro photphat pH 6,5 theo tỉ lệ thể tích (7:93, v/v), và dùng chất nội chuẩn là 2-acetamidophenol [8]. Năm 2017, có một nghiên cứu cũng xây dựng và xác định hàm lượng cefaclor trong huyết tương bằng phương pháp HPLC, dùng pha động bao gồm hỗn hợp natri 1-pentanesulfonat, nước, triethylamine và metanol, dùng axit photphoric để điều chỉnh pH đến $2,5 \pm 0,1$ [9]. Tuy nhiên, chưa có nhiều tài liệu nghiên cứu về ảnh hưởng của pH trong thành phần pha động đến khả năng lưu giữ cefaclor trong cột sắc kí và độ tin cậy của phương pháp phân tích. Vì vậy, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả khảo sát đệm pH 2,5; pH 4,5 và pH 7,5 phù hợp với khoảng pH của cột sắc kí (khoảng pH từ 2 đến 8). Trên cơ sở đó, chọn một giá trị pH phù hợp nhất để ghép cặp với thuốc thử mang điện tích âm là natri-1-pentanesulfonat ($R'-SO_3^-$) được thêm vào thành phần pha động.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Dung môi: methanol, trietylamin, axit photphoric (H_3PO_4), natri-1-pentanesulfonat (tất cả đều của Supelco, Đức). Chất chuẩn cefaclor hàm lượng nguyên trạng 95% (Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương), mẫu thử cefaclor trong viên nang cứng của 03 chế phẩm gồm cefaclor 250 mg SCD, cefaclor 250 mg Domesco và cefaclor 250 mg Uphace.

2.1.2 Thiết bị: máy sắc kí lỏng hiệu năng cao (Shimadzu, Nhật Bản), cân phân tích (Shimadzu, Nhật Bản) với độ chính xác 0,0001 g, bộ lọc rút chân không (Agilent, Mỹ), bể siêu âm (Elma, Đức), cột sắc kí RP-18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m) (Shimadzu, Nhật Bản).

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 Ảnh hưởng pH đến khả năng lưu giữ của cefaclor

Cefaclor là một zwitterion, phân tử có các nhóm chức, trong đó một nhóm mang điện tích dương và một nhóm mang điện tích âm ($pK_a = 1,5$ do có nhóm carboxyl và $pK_a = 7,2$ do có nhóm amino). Cefaclor có thể ghép cặp với tác nhân anion hoặc cation tùy thuộc vào pH môi trường, nên chất phân tích cần được ion hóa để tương tác với ion thuốc thử tạo thành một cặp ion. Do đó, các

hợp chất có thể ion hóa phụ thuộc vào mối quan hệ giữa pH và pK_a . Vì vậy, nhóm tác giả khảo sát tại đệm pH 2,5, pH 4,5 và pH 7,5.

Hòa tan 1 g natri 1-pentanesulfonat trong 780 mL nước và 10 mL triethylamine, điều chỉnh bằng axit photphoric đến pH 2,5, pH 4,5, pH 7,5.

Pha dung dịch chuẩn cefaclor 0,3 mg.mL⁻¹ tại 3 mức đệm pH (2,5, 4,5 và 7,5): Cân chính xác khoảng 50 mg cefaclor vào bình định mức 50 mL, hòa tan pha loãng bằng pha động đến vạch. Lấy chính xác 3 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 (loại PTFE –polytetrafluoroethylene).

Tiêm các mẫu chuẩn ở pH tương ứng với thành phần pha động đệm pH 2,5, pH 4,5, pH 7,5 vào máy HPLC.

2.2.1.2 Khảo sát tốc độ dòng

Tiến hành khảo sát lần lượt các tốc độ dòng 0,5 mL.min⁻¹; 1 mL.min⁻¹; 1,5 mL.min⁻¹ trong cùng điều kiện sắc kí theo USP 41 [10].

Bảng 1 Các điều kiện sắc kí

Cột sắc kí	Cột RP-18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m)
Nhiệt độ lò cột	40 °C
Thể tích tiêm	10 μ L
Bước sóng phát hiện	265 nm
Dung dịch chuẩn	Nồng độ 0,3 mg.mL ⁻¹
Pha động	Dung dịch đệm pH 2,5

2.2.1.3 Khảo sát thể tích tiêm mẫu

Thực hiện tiêm mẫu vào cột sắc kí lần lượt thể tích (10, 20, 30, 40, 50) μ L, cùng một điều kiện sắc kí gồm tốc độ dòng 1,5 mL.min⁻¹, nhiệt độ cột 40 °C, cột sắc kí RP-18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m) và pha động là dung dịch đệm pH 2,5, dùng chuẩn cefaclor nồng độ 0,3 mg.mL⁻¹.

2.2.2 Xây dựng phương pháp định lượng

Các tiêu chuẩn của quy trình thẩm định theo ICH với các quy định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng [11,12].

2.2.2.1 Tính tương thích của hệ thống sắc kí

Tính tương thích hệ thống thực hiện bằng cách tiêm chuẩn cefaclor nồng độ 0,3 mg.mL⁻¹ vào hệ thống máy HPLC, thể tích tiêm 10 μ L, thực hiện tiêm lặp 6 lần. Yêu cầu đạt được gồm % độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của hệ số kéo đuôi và các lần tiêm lặp không quá 2,0 %.

2.2.2.2 Tính tuyến tính

Tính tuyến tính giữa diện tích peak và nồng độ được xây dựng trong khoảng nồng độ từ (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1) mg.mL⁻¹. Cách pha: từ dung dịch chuẩn gốc cefaclor nồng độ 1 mg.mL⁻¹. Sau đó, lần lượt lấy (1, 2, 3, 5, 7) mL từ chuẩn gốc cefaclor vào bình định mức 10 mL. Tiến hành tiêm các dung dịch vào hệ thống máy HPLC.

Xây dựng đường chuẩn $y = ax + b$, trục $[x]$ biểu thị nồng độ và trục $[y]$ là diện tích peak của mỗi mẫu chuẩn. Xác định hệ số tương quan (R) và khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích peak) và x (nồng độ). Yêu cầu $R^2 \geq 0,99$.

2.2.2.3 Tính đặc hiệu

Dung dịch thử và chuẩn được thực hiện ở nồng độ tương đương nhau trong cùng điều kiện sắc ký như nhau. 4 loại mẫu cho thực nghiệm bao gồm: dung dịch mẫu trắng (dung môi), mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn được tiêm vào hệ thống HPLC trong cùng điều kiện sắc ký. Sau đó, ghi nhận lại sắc ký đồ và hình dạng của các peak từng dung dịch.

Pha mẫu thử gốc có nồng độ khoảng 0,3 mg.mL⁻¹: lấy 20 viên, cân tính khối lượng trung bình của 20 viên, nghiền mịn, trộn đều. Cân chính xác một lượng bột chế phẩm đã nghiền mịn tương ứng với 50 mg cefaclor vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng pha động đến vạch, trộn đều. Lấy chính xác 3 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 μ m (loại PTFE).

Mẫu thêm chuẩn cefaclor vào mẫu thử: lấy chính xác 1 mL dung dịch chuẩn nồng độ 3 mg.mL⁻¹ và 1 mL dung dịch thử gốc cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μ m (loại PTFE).

2.2.2.4 Độ lặp lại

Xác định độ lặp lại bằng cách thực hiện định lượng 6 lần với 6 mẫu thử khác nhau trên cùng một qui trình phân tích, với nồng độ mẫu thử khoảng 0,3 mg.mL⁻¹.

Yêu cầu %hàm lượng cefaclor khoảng (90-110) % so với hàm lượng ghi trên nhãn [13] và %độ lệch chuẩn tương đối hàm lượng không quá 2,0%.

% Hàm lượng cefaclor trong viên nang cứng 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 peak của mẫu chuẩn, thử.

m_{TB} : khối lượng trung bình của 20 viên.

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

P: % hàm lượng của cefaclor chuẩn.

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

HLN: hàm lượng của cefaclor trong viên 250 mg.

2.2.2.5 Độ đúng

Pha dung dịch chuẩn gốc nồng độ 6 mg.mL⁻¹: cân chính xác 60 mg chuẩn cefaclor vào bình định mức 10 mL, hòa tan, pha loãng bằng pha động tới vạch và trộn đều.

Mẫu thử gốc có nồng độ 1 mg.mL⁻¹: lấy 20 viên, cân tính khối lượng trung bình của viên, nghiền mịn, trộn đều. Cân chính xác một lượng bột chế phẩm đã nghiền mịn tương ứng với 50 mg cefaclor vào bình định mức 50 mL, hòa tan và pha loãng bằng pha động đến vạch, trộn đều.

Pha độ đúng 80 %: lấy chính xác 2 mL dung dịch chuẩn gốc 6 mg.mL⁻¹ và 15 mL dung dịch mẫu thử gốc có nồng độ 1 mg.mL⁻¹ cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m (loại PTFE).

Pha độ đúng 100 %: lấy chính xác 3 mL dung dịch chuẩn gốc 1 mg.mL⁻¹ và 3 mL dung dịch mẫu thử gốc có nồng độ 1 mg.mL⁻¹ cho vào bình định mức 10 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều và lọc qua màng lọc 0,45 μ m (loại PTFE).

Pha độ đúng 120 %: lấy chính xác 3 mL dung dịch chuẩn gốc 6 mg.mL⁻¹ và 15 mL dung dịch mẫu thử gốc có nồng độ 1 mg.mL⁻¹ cho vào bình định mức 50 mL, bổ sung pha động đến vạch, trộn đều, lọc qua màng lọc 0,45 μ m (loại PTFE).

Tiêm riêng biệt 10 μ L mỗi dung dịch trên vào hệ thống sắc ký và ghi nhận các sắc ký đồ.

Tính lượng tìm thấy so với lượng chuẩn cefaclor thêm vào. Từ đó, tính %tỉ lệ phục hồi (TLPH) theo công thức sau:

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

Ghi chú:

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

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

Yêu cầu tỉ lệ phục hồi nằm trong khoảng (98-102) %.

3 Kết quả nghiên cứu

3.1 Khảo sát điều kiện phân tích sắc ký

3.1.1 Khảo sát ảnh hưởng pH của thành phần pha động
Tiến hành khảo sát ở 3 môi trường đệm pH 2,5, pH 4,5, pH 7,5, cách chuẩn bị các dung dịch được thể hiện ở Mục

2.2.1.1 và kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

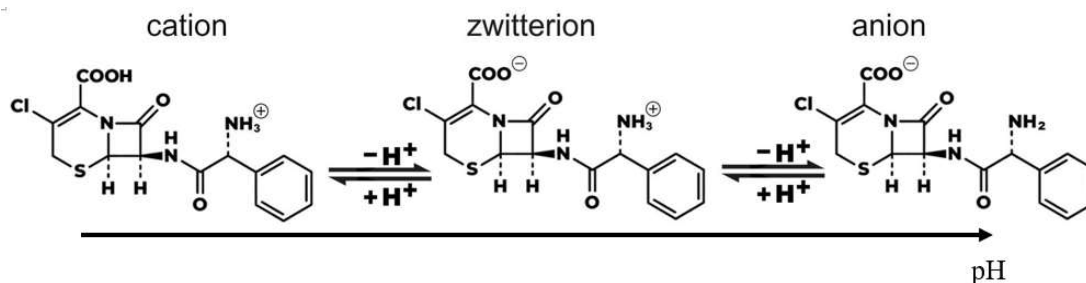
Bảng 2 Kết quả khảo sát ở đệm pH 2,5, pH 4,5, pH 7,5

Thông số	pH 2,5	pH 4,5	pH 7,5
t_R	7,68	7,10	12,67
N	7.521	7.419	9.158
S	3.009.639	2.950.663	2.064.312
H	260.527	253.160	117.916
As	0,988	0,989	1,00

(*) t_R : thời gian lưu (phút), N: số đĩa lí thuyết, S: diện tích peak, As: hệ số kéo đuôi, H: chiều cao của đĩa lí thuyết

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần pha động (Bảng 2) đã chỉ ra rõ khi tăng độ pH của dung dịch rửa giải (pha động) từ 2,5 đến 7,5 làm thay đổi thời gian lưu, hoặc sự lưu giữ cefaclor trong cột sắc kí pha đảo. Tại đệm pH 2,5 có thời gian lưu 7,68 phút và pH 7,5 có

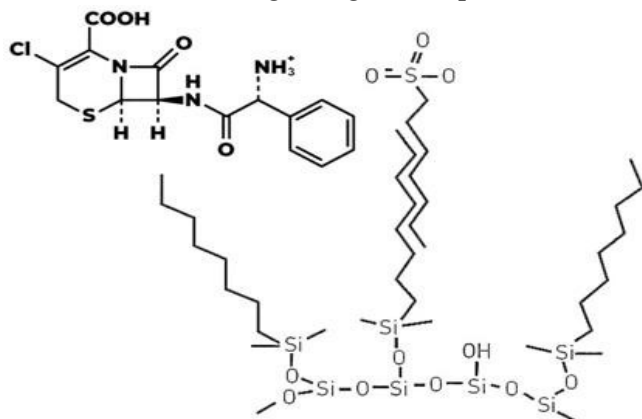
thời gian lưu 12,67 phút. Nguyên nhân có sự khác biệt như vậy, theo phương trình Henderson–1–Hasselbalch biểu diễn mối quan hệ giữa pH dung dịch và pKa của một hợp chất. Khi pH dung dịch thấp hơn hai đơn vị giá trị pKa, thì dung dịch gần như bị proton hóa hoàn toàn (99 %) [14, 15]. Do đó, khi pH thành phần pha động bằng 2,5 thì dung dịch gần như bị proton hóa hoàn toàn (99 %), nhóm amino (pKa = 7,2) bị proton hóa tạo ra nhóm amoni ($R-NH_3^+$), dạng ($R-NH_3^+$) chiếm ưu thế và nhóm cacboxyl không phân li ($R-COOH$) (Hình 2). Ngược lại, tại đệm pH 7,5, nhóm cacboxyl (pK = 1,5) bị phân li tạo ra ion cacboxylat, mang điện tích âm ($R-COO^-$) nên dạng ion ($RCOO^-$) chiếm ưu thế. Bên cạnh đó, tại đệm pH 4,5, cả hai nhóm đều bị ion hóa và phân tử tồn tại dưới dạng zwitterion (Hình 3).



Hình 1 Mức độ ion hóa của cefaclor ở các giá trị pH khác nhau

So sánh giữa đệm pH 2,5 và pH 4,5, cefaclor đều bị lưu giữ trong cột sắc kí, được pha động rửa giải ra khỏi cột và phát hiện tại λ_{max} 265 nm. Kết quả thể hiện Bảng 2 có sự tương đồng về diện tích đỉnh và chiều cao, số đĩa lí thuyết.

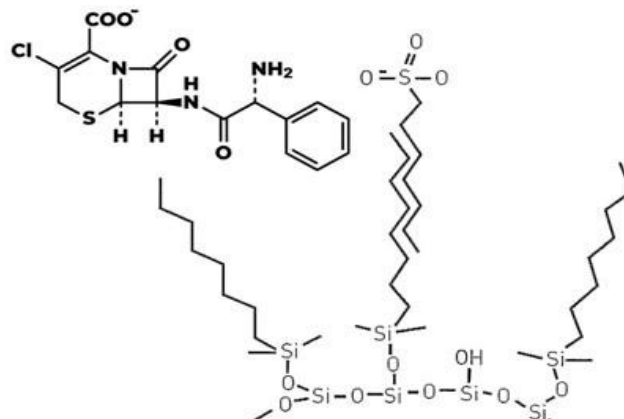
Tại đệm pH 4,5, cefaclor tồn tại dạng zwitterion, cả hai nhóm đều bị ion hóa nên khả năng ghép cặp với ion đối trong pha động yếu hơn so với đệm pH 2,5 và phần điện tích âm còn lại sẽ không tương tác với pha tĩnh.



Hình 2 Cơ chế sắc kí ghép cặp ion tại đệm pH 2,5

Tại đệm pH 2,5, cefaclor tồn tại dạng mang điện tích dương ($R-NH_3^+$) sẽ tương tác mạnh với tác nhân ghép cặp ion có trong thành phần pha động ($R'-SO_3^-$), tạo thành ghép cặp ion ($RNH_3^+O_3SR'$) và tương tác theo cơ chế sắc kí lỏng pha đảo (RP–HPLC) [16].

Vì vậy, cefaclor trong đệm pH 2,5 sẽ ra chậm hơn so với đệm pH 4,5 khoảng 30 giây. Cơ chế sắc kí ghép cặp ion tại đệm pH 2,5 được thể hiện ở Hình 2.

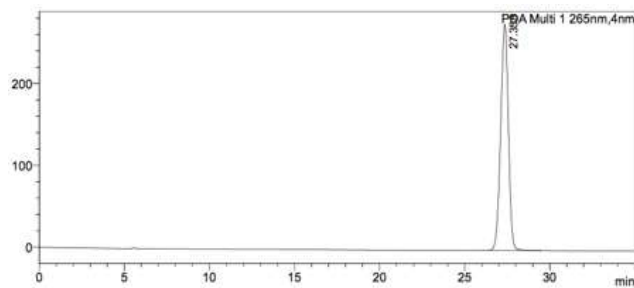


Hình 3 Cơ chế sắc kí ghép cặp ion tại đệm pH 7,5

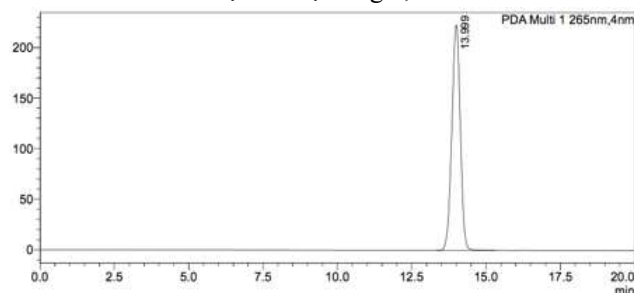
Ngược lại, khi tăng pH thành phần pha động lên 7,5, cefaclor tồn tại dạng chính là anion, mang điện tích âm ($R-COO^-$) nên không có khả năng ghép cặp ion với thuốc thử mang điện tích âm ($R'-SO_3^-$) có trong thành phần pha động và phần kị nước của cefaclor tương tác mạnh với pha tĩnh nên khả năng lưu giữ cefaclor trong cột sắc kí lâu hơn (Hình 3). Đồng thời, kết quả thu được diện tích và chiều cao peak đều giảm hơn so với đệm pH 2,5 và pH4,5. Kết quả thu được diện tích và chiều cao peak đều giảm làm cho phép phân tích định lượng kém độ tin cậy và chính xác. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, trường hợp dùng ion thuốc thử natri-1-pentanesulfonat có thể chọn pH thành phần pha động cho hợp chất cefaclor tại đệm pH 2,5 hoặc 4,5 đều được vì ít có sự khác biệt. Bên cạnh đó, để cefaclor chuyển hoàn toàn về dạng ($R-NH_3^+$) và ghép cặp ion, nên nghiên cứu chọn pH 2,5. Kết quả thu được đáp ứng yêu cầu về sắc kí đồ HPLC gồm hình dạng peak đối xứng 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).

3.1.2 Khảo sát tốc độ dòng

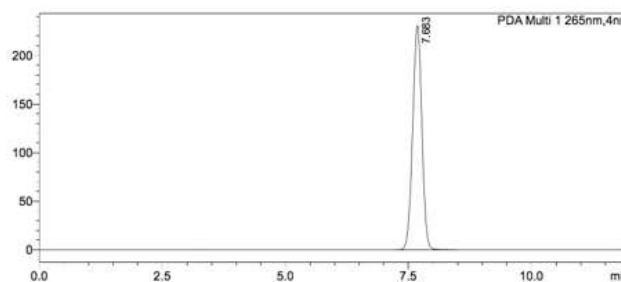
Tiến hành khảo sát tốc độ dòng trong điều kiện sắc kí gồm nhiệt độ cột 40 °C, λ_{max} 265 nm, thể tích tiêm dung dịch chuẩn 0,3 mg.mL⁻¹ là 10 μ L, cột RP-18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m) theo Mục 2.2.1.2. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Hình 4.



Sắc kí đồ tại tốc độ dòng 0,5 mL.min⁻¹



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



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

Hình 4 Khảo sát tốc độ dòng thực hiện trong điều kiện sắc kí gồm nhiệt độ cột 40 °C, λ_{max} 265 nm, cột RP-18 (250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m) tại nồng độ chuẩn cefaclor 0,3 mg.mL⁻¹

Khi tăng tốc độ dòng từ 0,5 mL.min⁻¹ đến 1,5 mL.min⁻¹ thì thời gian lưu sẽ giảm từ 27,36 phút xuống còn 7,69 phút. Vì vậy, chọn tốc độ dòng 1,5 mL.min⁻¹ để tiết kiệm thời gian, dung môi và đáp ứng đủ yêu cầu về hình dạng sắc kí rõ ràng và đối xứng, không có hiện tượng kéo đuôi hoặc giãn peak.

3.1.3 Khảo sát thể tích tiêm

Tiến hành khảo sát theo Mục 2.2.1.3. Kết quả khảo sát được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3 Kết quả khảo sát thể tích tiêm

V	10 μ L	20 μ L	30 μ L	40 μ L	50 μ L
t_R	7,69	7,69	7,70	7,71	7,72
N	8.229,00	7.516,33	7.399,50	7.283,00	7.127,00
As	0,97	0,98	0,92	0,90	0,88

Khi tiêm một thể tích mẫu quá lớn vào cột sắc kí sẽ gây ra hiện tượng cột quá tải, nguyên nhân gây ra các peak bị đổ đầu (peak fronting) [17,18].

Điều này thấy rõ khi thể tích tiêm tăng từ 10 μ L đến 50 μ L thì hệ số kéo đuôi (As) giảm dần từ 0,988 xuống còn 0,88, peak bắt đầu đổ đầu. Bên cạnh đó, khi thể tích tiêm càng tăng thì số đĩa lí thuyết càng giảm (số đĩa lí thuyết là đại lượng đặc trưng cho khả năng phân tách). Do đó, để đảm bảo peak đối xứng, tránh hiện tượng đổ đầu và kéo đuôi nên chọn thể tích tiêm là 10 μ L.

3.2 Xây dựng phương pháp định lượng

3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc kí

Tiêm vào hệ thống sắc kí các dung dịch với thể tích tiêm 10 μ L đã chuẩn bị ở Mục 2.2.2.1.

Bảng 4 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

STT	t_R (phút)	N	As	S (mAu)
1	7,689	7.521	0,981	2.827.414
2	7,686	7.523	0,982	2.826.587
3	7,683	7.505	0,981	2.824.875
4	7,680	7.500	0,981	2.824.875

5	7,680	7.501	0,981	2.824.875
6	7,678	7.515	0,981	2.824.875
TB	7,68	7.510,83	0,98	2.825.583,50
%RSD	0,054	0,14	0,042	0,040

Qui 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 4).

3.2.2 Xác định tính tuyến tính

Pha một dãy mẫu chuẩn nồng độ từ (0,106-1,06) mg.mL^{-1} . Tiêm vào máy sắc kí lỏng lần lượt các dung dịch chuẩn và ghi nhận diện tích peak tương ứng. Thiết lập phương trình hồi qui giữa nồng độ và diện tích peak.

Bảng 5 Kết quả xây dựng đường tuyến tính cefaclor

STT	Nồng độ chuẩn (mg.mL^{-1})	Diện tích peak (mAu)
1	0,106	1.004.591,33
2	0,212	1.997.959,00
3	0,318	3.009.345,67

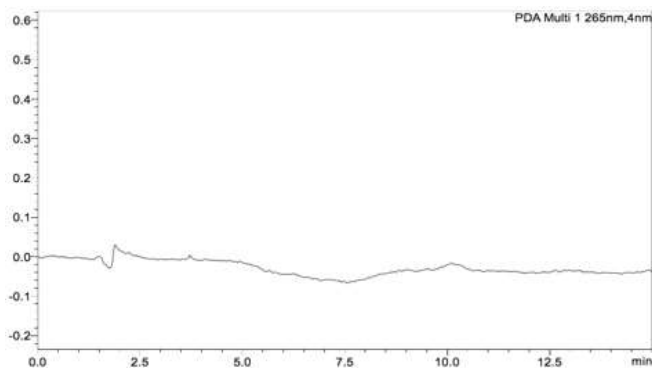
4	0,530	4.935.485,67
5	0,742	6.962.604,00
6	1,060	9.926.634,00
PTHQ: $y = 9\,345\,480,70x$, $R^2 = 1$		

Đánh giá tính tuyến tính của cefaclor bằng cách sử dụng trắc nghiệm Student (T) để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số và trắc nghiệm Fischer (F) để kiểm tra tính thích hợp trong phương trình hồi qui. Qua trắc nghiệm F, phương trình hồi qui chứng minh có tính tương thích với $F = 127.739,87 > F_{0,05} = 7,71$ và qua trắc nghiệm T, hệ số a (độ dốc) có ý nghĩa về mặt thống kê ($t = 357,41 > t_{0,05} = 2,78$), hệ số b (tung độ gốc) không có ý nghĩa thống kê nên bị loại ($t = 1,01 < t_{0,05} = 2,78$) (Bảng 5).

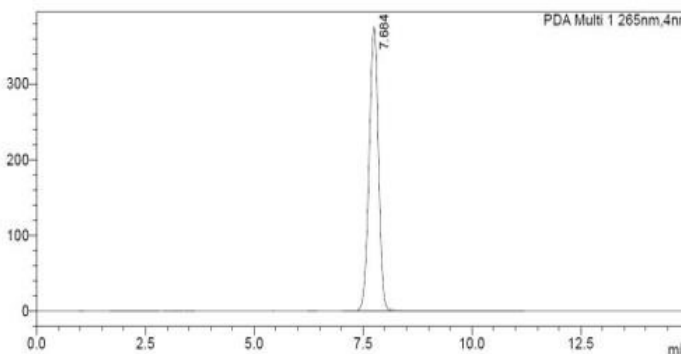
Vậy phương trình hồi qui có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak trong khoảng nồng độ từ 0,102 đến 1,06 mg.mL^{-1} với $R^2 = 1$.

3.2.3 Xác định tính đặc hiệu

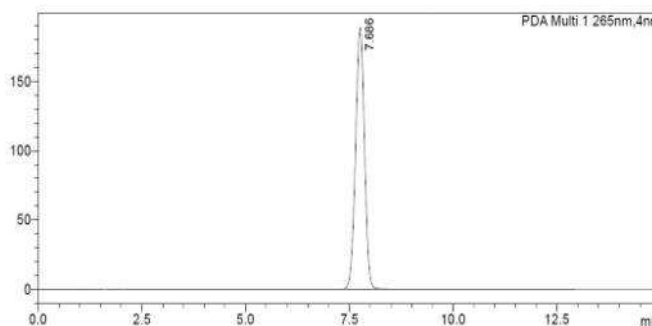
Tiêm vào hệ thống sắc kí các dung dịch mẫu với thể tích tiêm 10 μL đã chuẩn bị ở Mục 2.2.2.3.



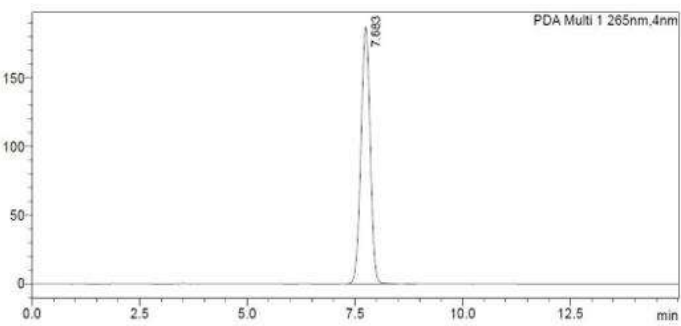
Sắc kí đồ mẫu trắng



Sắc kí đồ mẫu thêm chuẩn vào mẫu thử



Sắc kí đồ mẫu chuẩn



Sắc kí đồ mẫu thử

Hình 5 Sắc kí đồ tính đặc hiệu của qui trình định lượng

Sắc kí đồ của mẫu trắng (Hình 5) là âm tính: Không có đỉnh có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của đỉnh chuẩn cefaclor trong mẫu chuẩn.

Sắc kí đồ thêm chuẩn cefaclor vào mẫu trắng và mẫu thử (dương tính) đều có 1 peak, có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak cefaclor trong mẫu chuẩn. Kết quả đã chỉ ra qui trình định lượng cefaclor 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 mẫu (mg)	Cefaclor	
		Diện tích peak (mAu)	%Hàm lượng
1	73,7	2.899.001,67	100,82
2	71,2	2.802.200,33	100,88
3	77,2	3.009.345,67	99,91
4	76,8	3.008.709,67	100,41
5	73,2	2.865.904,67	100,35
6	73,6	2.898.354,00	100,94
% HL trung bình			100,55
% RSD			0,40

Giá trị %RSD của thời gian lưu và diện tích peak của 6 lần mẫu thử là $0,40\% < 2,0\%$ (Bảng 6).

Phân tích 6 dung dịch mẫu thử khác nhau nhưng có nồng độ tương đương nhau. % Hàm lượng trong 6 lần định lượng có kết quả lặp lại. Vậy qui trình có tính chính xác.

3.2.5 Độ đúng của phương pháp

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

Bảng 7 Kết quả độ đúng (80, 100, 120) %

Độ đúng	Lượng mẫu (mg)	Nồng độ sẵn có (mg.mL ⁻¹)	Nồng độ thêm vào (mg.mL ⁻¹)	Nồng độ tìm thấy (mg.mL ⁻¹)	Độ đúng %
80 %	70,6	0,3017	0,2462	0,2473	100,43
	71,0	0,3034	0,2462	0,2483	100,85
	70,8	0,3026	0,2462	0,2491	101,15
100 %	71,2	0,3043	0,3078	0,3052	99,16
	70,8	0,3026	0,3078	0,3087	100,28
	70,9	0,3030	0,3078	0,3048	99,02
120 %	70,4	0,3008	0,3694	0,3695	100,03
	70,6	0,3017	0,3694	0,3686	99,80
	70,8	0,3026	0,3694	0,3683	99,71
Trung bình					100,05
%RSD					0,72

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

Với phương pháp đã xây dựng, chúng tôi áp dụng để định lượng cefaclor có trong 03 chế phẩm được dạng viên nang cứng đang được lưu hành trên thị trường gồm cefaclor 250 mg SCD, cefaclor 250 mg Domesco,

cefaclor 250 mg Uphace. Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 8.

Bảng 8 Kết quả phân tích %hàm lượng cefaclor so với nhãn trong viên nang cứng của một số chế phẩm

Tên mẫu	Cefaclor SCD 250 mg	Cefaclor 250 mg Domesco	Cefaclor 250 mg Uphace
Lượng mẫu (mg)	71,10	73,80	76,90
Diện tích peak	2.800.393	2.902.196	3.009.651
Hàm lượng (mg)	252,38	251,99	250,78
% HL so với nhãn	100,95	100,80	100,31

%Hàm lượng cefaclor trong viên nang cứng của 03 chế phẩm cefaclor 250 mg SCD, cefaclor 250 mg Domesco và cefaclor 250 mg Uphace lần lượt (100,95; 100,80; 100,31) %. Các kết quả này đều đạt yêu cầu về % hàm lượng khoảng (90-110) % so với hàm lượng ghi trên nhãn theo tiêu chuẩn của Dược điển V.

4 Kết luận

Qui trình định lượng có ưu điểm là làm rõ ảnh hưởng pH trong thành phần pha động đến mức độ ion hóa của hợp chất cefaclor, áp dụng cơ chế sắc ký ghép cặp ion trong phương pháp HPLC, được thể hiện rõ khi khảo sát đệm pH 2,5, pH 4,5 và pH 7,5. Tại đệm pH 2,5 và pH 4,5 ít có sự khác biệt, nhưng tại đệm pH 7,5 thì không có sự ghép cặp ion với ion thuốc thử vì cùng điện tích âm, chỉ có phần kỵ nước tương tác với pha tĩnh nên làm cho phương pháp kém chính xác. Qua đó, đối với hợp chất cefaclor, khi sử dụng thuốc thử natri-1-pentanesulfonat, mang điện tích âm ($R'-SO_3^-$) có thể thực hiện ở đệm pH 2,5 và pH 4,5.

Tại pH 2,5, cefaclor tồn tại dạng cation và sẽ ghép cặp với ion đối có trong thành phần pha động, tạo thành cặp ion và tương tác theo cơ chế sắc ký lỏng pha đảo (RP-HPLC). Kết quả thu được trên sắc ký đồ đáp ứng yêu cầu về hình dạng peak cân đối có $As = 0,98$ và %RSD = 0,042 % (< 2,0 %). Vì vậy, việc tách các hợp chất bằng phương pháp RP-HPLC, theo cơ chế sắc ký ghép cặp ion, đặc biệt là hợp chất zwitterion cần kiểm soát độ pH pha động là điều cần thiết. 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 phương pháp nằm trong khoảng (99,02-101,15) % và trong khoảng tuyến tính (0,106-1,06) mg.mL⁻¹ với $R^2 = 1$.

Qui trình đã ứng dụng để xác định hàm lượng cefaclor có trong 03 chế phẩm được dạng viên nang cứng đang

được lưu hành trên thị trường, kết quả đạt yêu cầu về hàm lượng theo Dược điển V.

Do đó, phương pháp đề xuất có thể được áp dụng để xác định hàm lượng cefaclor có trong viên nang cứng,

nguyên liệu, thành phẩm chứa hoạt chất cefaclor tại các công ty dược phẩm, hoặc chế phẩm thuốc có chứa cefaclor trên thị trường.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2018). *Dược thư Quốc gia Việt Nam*. NXB Y học, tr. 329-30.
2. Bộ Y tế (2012). *Hóa dược 1*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, tr. 186-188.
3. Marko Jovanovic' et al. (2012). Assessment of β -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying Box-Behnken design. *Journal of Separation Science*, 35, pp. 1424-1431.
4. Đoàn Thị Huyền, Nguyễn Phương Hoa, Bùi Xuân Thành, Tạ Thị Thảo (2016). 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. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học* 21(3), tr. 94-101.
5. Nguyễn Bá Trí, Nguyễn Văn Thịnh, Vũ Tuấn Anh, Nguyễn Hữu Tuấn Dũng, Phạm Xuân Phong (2013). Định lượng cefaclor trong huyết tương chó bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y - Dược học Quân sự*, 8, tr. 1-18.
6. Alfeen Mohammad A. (2016). Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefaclor monohydrate in pharmaceutical dosage. *Medicinal Chemistry*, 6(1), pp. 19-22.
7. Sivanadh, M. V. Prasanthi, K. Subhashini, M. V. Basaweswara Rao (2016). New validated RP-HPLC method for the estimation of cefaclor in pharmaceutical formulation. *Scholar Research Library*, 8(3), pp. 318-324.
8. Granados-Soto, V., Aguilar-Cota, M. E., Reyes-Garcia G., Medina-Santillan, R., Flores-Murrieta, F. J. (2003). Simple method for the determination of cefaclor in human plasma samples by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(19), pp. 3315-3323.
9. Naz, S., Shoaib, M. H., Bashir, L., Yousuf R. I., Fakhsheena A., Siddiqui F., Yaseen S. (2017). HPLC method development and validation for the determination of Cefaclor in human plasma. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 30(5), pp. 1645-1649.
10. The United states Pharmacopoeia 41. *The United states Pharmacopoeial Convention*, edition 27th.
11. European Medicines Agency (2006). International Conference on Harmonization Topic (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, pp. 1-15.
12. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm (2010). *Thẩm định phương pháp trong phân tích Hóa học và Vi sinh vật*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
13. Hội đồng Dược điển (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học, tr. 129-130.
14. Rosenberg, M. J., Abel E., Garver, W.S., Osgood, M.P. (2016). *Taking the hassle out of hasselbalch*. CourseSource 3, pp. 1-10.
15. Bộ Y tế (2007). *Hóa phân tích-Tập 1*. Nhà xuất bản Giáo dục Hà Nội, tr. 116-125.
16. Nguyễn Minh Đức (2006). *Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên*. Nhà xuất bản Y học, tr. 88-96.
17. Moldoveanu S., David V. (2012). *Essentials in modern HPLC separations*. Elsevier, pp. 465-519.
18. Bộ Y tế (2007). *Hóa phân tích-Tập 2*. Nhà xuất bản Y học, tr. 126-129.

Optimizing the analysis process for quantitative determination of cefaclor 250 mg in hard capsules using high performance liquid chromatography

Nguyen Thi Thu Thao, Mai Thanh Nhan

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

nguyentthao@ntt.edu.vn

Abstract The aim of study was to develop an accurate and sensitive method for quantitative determination of cefaclor 250 mg in hard capsules using ion-pair. Cefaclor is a zwitterion and the degree of ionization of cefaclor affects the retention of compound in the reversed phase chromatographic column by investigating the concentration of buffer solution at pH 2.5, pH 4.5 and pH 7.5. The experimental results optimized mobile phase composition at pH 2.5, with a flow rate $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and samples were prepared with the volume of mobile phase was injected at $10 \mu\text{L}$, the symmetrical shape chromatography was symmetrical with tailing resolution at 0.988. Chromatography parameters were stainless steel RP-18 column ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$ particle size), at 40°C . The determinations were performed using PDA detector at 265 nm. The method is validated for the specificity, linearity, and was applied successfully to determine the content of cefaclor in 250 mg hard capsules with recovery of 100.05 % and a relative standard deviation smaller than 2.0% (%RSD = 0.40). This proposed method is applicable for the determination of three pharmaceutical preparations of cefaclor in hard capsule drugs in the market. The results showed that all samples met the cefaclor content as prescribed by the Vietnamese Pharmacopoeia V.

Keywords Optimization, Validation, Cefaclor, Hard capsules, High performance liquid chromatography (HPLC), Antibiotic, Ion pair chromatography (IPC)