

Định lượng đồng thời các loại thuốc trong phác đồ điều trị nhiễm trùng *Helicobacter pylori* bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Mai Thanh Nhân*, Nguyễn Thị Thu Thảo

Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*mtnhan@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao được ứng dụng nhằm định lượng đồng thời sáu loại thuốc dùng trong điều trị nhiễm trùng *Helicobacter pylori*, gồm có famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri, pantoprazol natri và lansoprazol. Việc phân tách thực hiện bằng cách dùng cột C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) và pha động gồm dung dịch đệm phosphate pH = 5,0 và acetonitril được bơm ở tốc độ dòng 1 mL.phút⁻¹ bằng chương trình rửa giải gradient. Quá trình rửa giải gradient bắt đầu với tỷ lệ đệm phosphate:acetonitril là 9:1 (v:v), sau đó được thay đổi trong 25 phút để đạt tỷ lệ thể tích là 4:6 (v:v). Các chất phân tích được định lượng dựa trên việc đo diện tích peak của famotidin ở bước sóng 267 nm, metronidazol 320 nm, levofloxacin 294 nm, và rabeprazol natri, pantoprazol natri, lansoprazol 284 nm. Thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn nội dung và phương pháp của ICH. Do đó, quy trình phân tích này có thể sử dụng trong việc kiểm tra hàm lượng của các hợp chất trên trong dược phẩm dạng thuốc viên.

Nhận 06/06/2024

Được duyệt 19/07/2024

Công bố 28/10/2024

Từ khóa

Viên nang, kháng sinh, kháng histamin, *Helicobacter pylori*, phương pháp HPLC, đầu dò PDA

© 2024 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Helicobacter pylori (HP), được phân lập lần đầu từ hang vị dạ dày của bệnh nhân viêm dạ dày mãn tính bởi Waren và Marshall năm 1983. HP thúc đẩy viêm dạ dày phát triển sang ung thư dạ dày. Vi khuẩn gây bệnh này sản sinh ra enzyme urease, enzyme này thủy phân ure thành CO₂ và amoniac. Đây là nguyên nhân chính gây ra bệnh viêm dạ dày và loét dạ dày, tá tràng. Do đó, việc diệt khuẩn HP và ức chế urease đóng vai trò quan trọng trong điều trị bệnh nhân viêm loét dạ dày, tá tràng. Các thuốc dùng điều trị loét dạ dày, tá tràng có tác dụng hạn chế yếu tố gây loét bằng cách giảm nồng độ ion H⁺ là giảm tiết H⁺, trung hoà H⁺ và gia tăng sự bảo vệ nhờ vào các chất bảo vệ màng nhầy để loại trừ vi khuẩn HP.

Thuốc điều trị HP có nhiều phác đồ điều trị, thường phối hợp hai kháng sinh với một chất có tác dụng làm lành vết loét như: tetracyclin, amoxicillin,

metronidazol, bismut subsalicylate, hoặc kết hợp hai kháng sinh với một chất kháng acid như: clarithromycin, tinidazol, lansoprazol [1,2]. Metronidazol là thuốc kháng sinh được dùng trong điều trị các bệnh nhiễm trùng. Thuốc hoạt động bằng cách ngăn chặn sự phát triển của một số vi khuẩn và ký sinh trùng [3]. Levofloxacin là một chất kháng khuẩn phổ rộng tổng hợp có hoạt tính chống lại vi khuẩn gram dương và gram âm. Thuốc hoạt động bằng cách ức chế DNA gyrase và được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm trùng đường hô hấp và đường tiết niệu, da [4]. Nhóm thuốc ức chế bơm proton là thuốc được dùng phổ biến, có tác dụng hiệu quả cao để điều trị bệnh loét dạ dày, tá tràng, hiện nay gồm lansoprazol, pantoprazol và rabeprazol [5]. Famotidin là một chất ức chế cạnh tranh mạnh và thuận nghịch tác dụng của histamine ở H₂ thụ thể. Vì vậy, thuốc được sử dụng để điều trị loét tá tràng đang hoạt động, loét dạ dày, ợ nóng, khó tiêu do axit, dạ dày chua [6].



Trong những phương pháp phân tích định lượng, phổ biến nhất là đo quang phổ và HPLC. Tuy nhiên, đo quang phổ ít được sử dụng hơn do một số hạn chế trong độ phân giải của phương pháp. Ngoài ra, dùng phương pháp đo điện thế để xác định lansoprazol, dùng điện cực chọn lọc ion để xác định điện thế của lansoprazol, kết quả thu được khoảng nồng độ từ $2,0 \times 10^{-5}$ đến $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, giới hạn phát hiện là $1,57 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [7]. Định lượng đồng thời ba loại thuốc ức chế bơm proton là omeprazol natri, pantoprazol natri và lansoprazol natri trong nước thải công nghiệp dược phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC-MS/MS). Việc tách các thuốc nghiên cứu thực hiện trên cột sắc ký WatersTM (100 mm \times 2,1 mm, 1,7 μm), pha động bao gồm methanol : đệm phosphate 0,05 M. Kết quả thu được khoảng nồng độ tuyến tính (10-200) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ đối với tất cả các loại thuốc được nghiên cứu [8]. Phương pháp ưu điểm phương pháp là giới hạn phát hiện thấp, nhưng nhược điểm là các thiết bị đo khối phổ có giá thành cao. Bên cạnh đó, phương pháp điện hóa phải đáp ứng yêu cầu về tính chọn lọc. Vì phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có nhiều ưu điểm như tính chọn lọc và định lượng được đồng thời nhiều hợp chất trong dược phẩm, nên được ứng dụng rộng rãi.

Các tài liệu nghiên cứu đã đề xuất một số phương pháp như sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA. Năm 2020, nghiên cứu của Gülfen và cộng sự đã xác định đồng thời amoxicillin, lansoprazol, và levofloxacin trong dược phẩm bằng HPLC với đầu dò UV-Vis. Trong nghiên cứu này, dùng paracetamol làm chất nội chuẩn và cột pha đảo C18 dùng để tách và xác định amoxicillin, lansoprazol và levofloxacin cùng với chất nội chuẩn. Kết quả thu được khoảng tuyến tính amoxicillin, lansoprazol và levofloxacin tương ứng là (15-40; 2,5-15,0 và 7,5-20,0) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [9]. Năm 2023, nghiên cứu của Maslarska cùng cộng sự đã phát triển quy trình xác định amoxicilin, metronidazol và omeprazol để điều trị nhiễm trùng *Helicobacter pylori* bằng phương pháp HPLC. Việc định lượng thực hiện bằng cách dùng cột C8, mẫu được phân tích bằng pha động của acetonitril : đệm phosphate (pH = 7,6) theo tỉ lệ (4:6; v/v). Kết quả thu được khoảng nồng độ tuyến tính amoxicilin, metronidazol và omeprazol lần lượt (25-200; 12,5-100; và 5-40) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra các hợp chất có hệ số kéo đuôi cao, dao động trong khoảng (1,2-2,01) [10]. Năm 2022, nghiên

cứ của Gawad và cộng sự đã xác định đồng thời chín loại thuốc chống vi trùng và thuốc ức chế bơm proton. Việc phân tách đã thực hiện bằng cột C18 và pha động dùng đệm phosphate pH 5,0 và acetonitril (ACN). Kết quả thu được khoảng tuyến tính amoxicillin, metronidazol, levofloxacin, tinidazol, doxycyclin, furazolidon, omeprazol, pantoprazol, lansoprazol lần lượt (5-100; 5-50; 2-40; 10-100; 10-100; 5-50; 2,5-30; 3-30 và 2-30) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [11].

Theo các tài liệu nghiên cứu đã công bố, hầu hết các tác giả dùng đệm phosphate làm thành phần pha động trong chương trình rửa giải gradient vì đệm phosphate có bước sóng phát hiện dưới 220 nm (pha động có ngưỡng UV dưới bước sóng phát hiện sẽ không ảnh hưởng đến độ nhạy tín hiệu) [12]. Do đó, nghiên cứu lựa chọn pha động là đệm phosphate và ACN cho chương trình rửa giải gradient để tách đồng thời sáu hợp chất famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri, pantoprazol natri, lansoprazol dùng trong điều trị nhiễm trùng HP.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên vật liệu

2.1.1 Hóa chất: methanol (Supelco, Germany), triethylamin (Sigma-Aldrich, Germany), axit photphoric (H_3PO_4) (Sigma-Aldrich, Germany), kali dihydrophosphat (Supelco, Germany), acetonitril (Supelco, Germany); Chất chuẩn famotidin (99,46 %), metronidazol (99,4 %), levofloxacin (97 %), rabeprazol natri (96,4 %), pantoprazol natri (92,8 %), lansoprazol (99,79 %) (Viện kiểm nghiệm Thuốc Trung ương); Mẫu famotidin 40 mg (công ty dược phẩm F.T.Pharma, T.W Vidipha, Dược phẩm 3/2), metronidazol 250 mg (DHG Pharma, Domesco, Sanofi), levofloxacin 500 mg (Stada, Stellapharm, Imexpharm), rabeto 40 mg (Flamingo Pharmaceuticals), pantoprazol 40 mg (Domesco, Stada, Stellapharm), và lansoprazol 30 mg (Stada, Stellapharm, TV.Pharm).

2.1.2 Thiết bị: máy sắc ký lỏng hiệu năng cao, cân phân tích, cột sắc ký RP-18 (tất cả của Shimadzu, Japan); Bộ lọc rút chân không (Agilent, USA); Bể siêu âm (Elma, Germany).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Khảo sát điều kiện sắc ký

2.2.1.1 Khảo sát chương trình rửa giải gradient

Định lượng đồng thời sáu hợp chất trong phác đồ điều trị nhiễm trùng HP bằng phương pháp HPLC với thành phần pha động như sau:

Pha động A: pha đệm phosphate pH 5,0 bằng cách hòa tan 2,72 g KH_2PO_4 và 3 mL triethylamin vừa đủ 1 000 mL nước, điều chỉnh bằng H_3PO_4 đến pH = 5,0.

Pha động B: ACN.

Dung môi pha mẫu: MeOH - H_2O (5:5; v/v).

Pha một hỗn hợp chuẩn gồm famotidin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), metronidazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), levofloxacin ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), rabeprazol natri ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pantoprazol natri ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), lansoprazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.1.2 Tối ưu tốc độ dòng

Tốc độ dòng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hình dạng peak sắc ký nên thực hiện tối ưu các tốc độ dòng lần lượt (0,8; 1 và 1,2) $\text{mL}\cdot\text{phút}^{-1}$ trong cùng điều kiện sắc ký.

2.2.1.3 Khảo sát nhiệt độ cột sắc ký

Nếu nhiệt độ cột tăng lên thì quá trình tách sắc ký sẽ nhanh hơn dẫn đến hệ số dung lượng của các chất sẽ bị thay đổi và các chất có thể rửa giải đồng thời cùng nhau. Do đó, kiểm soát nhiệt độ cột thích hợp là yếu tố cần thiết trong các phân tách sắc ký lỏng nên thực hiện khảo sát các nhiệt độ lần lượt (25, 30, 35 và 40) $^{\circ}\text{C}$ trong cùng điều kiện.

2.2.1.4 Khảo sát nồng độ đệm phosphate

Tiến hành khảo sát các nồng độ đệm lần lượt là 10 mM, 20 mM, 30 mM trong cùng điều kiện sắc ký.

2.2.2 Thẩm định qui trình phân tích

Các tiêu chuẩn của quy trình thẩm định theo phương pháp của Hội nghị Hải hòa Quốc tế (ICH – International Conference on Harmonization) [13,14].

2.2.2.1 Tính tương thích hệ thống sắc ký

Pha một hỗn hợp chuẩn gồm famotidin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), metronidazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), levofloxacin ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), rabeprazol natri ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pantoprazol natri ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), lansoprazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), lansoprazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) tiêm vào hệ thống máy HPLC. Yêu cầu đạt được gồm %độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của hệ số kéo đuôi các peak của 6 lần tiêm < 2,0, hệ số phân giải của hai peak liền kề nhau (R_s) $\geq 2,0$ và số đĩa lý thuyết lớn hơn 3000.

2.2.2.2 Khoảng tuyến tính

Pha các dung dịch chuẩn famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri, pantoprazol natri, lansoprazol có nồng độ ($10\text{-}100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Lập phương trình đường chuẩn $S = aCx + b$ với trục [x] biểu thị nồng độ và trục [S] là diện tích peak của mỗi mẫu chuẩn. Từ đó, xác định hệ số tương quan (R) giữa diện tích peak (S) và nồng độ (x). Yêu cầu $R^2 \geq 0,99$.

2.2.2.3 Tính đặc hiệu

Chuẩn bị 4 mẫu gồm dung dịch mẫu trắng, mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu chuẩn thêm vào thử.

Pha dung dịch mẫu thử có nồng độ famotidin ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), metronidazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), levofloxacin ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), rabeprazol natri ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pantoprazol natri ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), lansoprazol ($30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Pha dung dịch mẫu thêm chuẩn vào thử thu được nồng độ famotidin ($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), metronidazol ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), levofloxacin ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), rabeprazol natri ($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pantoprazol natri ($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), lansoprazol ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.2.4 Độ chính xác

Tiến hành phân tích 6 mẫu thử khác nhau theo quy trình phân tích đã xây dựng. Yêu cầu hàm lượng (%) từ (90-110) % so với hàm lượng ghi trên nhãn và độ lệch chuẩn tương đối hàm lượng (%) không quá 2,0 %.

2.2.2.5 Độ đúng

Thêm dung dịch chuẩn vào thử đã biết về hàm lượng ở các mức (80, 100 và 120) % so với nồng độ lý thuyết.

Bảng 1 Pha dung dịch độ đúng

Tên hoạt chất	Nồng độ của độ đúng		
	80 %	100 %	120 %
Famotidin	$32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử
Metronidazol	$24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử
Levofloxacin	$24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử
Rabeprazol natri	$32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử
Pantoprazol natri	$32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử
Lansoprazol	$24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử	$36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chuẩn + $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ thử

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

3 Kết quả nghiên cứu

3.1 Khảo sát điều kiện tối ưu cho quy trình phân tích

3.1.1 Khảo sát chương trình rửa giải gradient

Chương trình rửa giải gradient với điều kiện sắc ký gồm cột sắc ký: C18 (250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm), nhiệt độ cột 25 $^{\circ}\text{C}$, dùng đầu dò PDA để phát hiện famotidin tại bước sóng 267 nm, rabeprazol natri, pantoprazol natri,



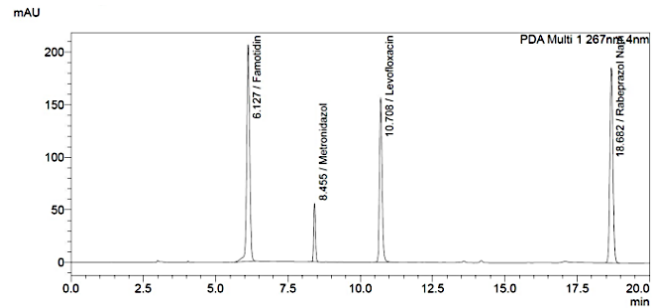
lansoprazol tại 284 nm, levofloxacin tại 294 nm và metronidazol tại 320 nm, tốc độ dòng 1,0 mL.phút⁻¹, thể tích mẫu 20 µL.

Tiến hành khảo sát kiểu rửa giải gradient như Bảng 2.

Bảng 2 Chương trình rửa giải gradient 1

Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi (v/v)	
	Dung dịch đệm phosphate 20 mM (A)	Acetonitril (B)
0,1	9	1
15	6	4
17	6	4
18	9	1
20	9	1

Với điều kiện sắc ký như trên, phân tách được bốn hợp chất lần lượt là famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri. Các chất còn lại là pantoprazol natri và lansoprazol không được rửa giải ra khỏi cột sắc ký do pantoprazol natri, lansoprazol có logK_{ow} lần lượt là 2,2 và 2,8 có tính phân cực kém hơn so với các hợp chất còn lại (famotidin có logK_{ow} -1,43, metronidazol có logK_{ow} -0,02, levofloxacin có logK_{ow} 0,28, rabeprazol natri có logK_{ow} 0,6) [15-20]. Hơn nữa, hình dạng peak famotidin bị biến dạng (đồ đầu) với hệ số kéo đuôi 0,89 (Hình 1).

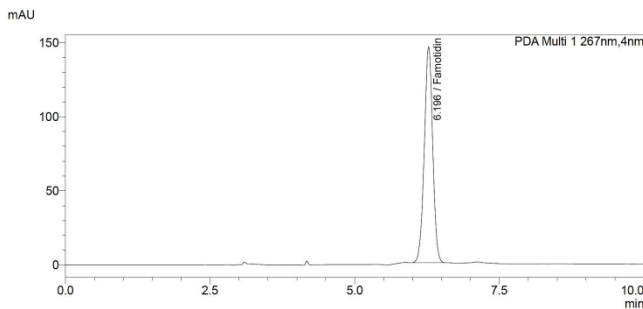


Hình 1 Sắc ký đồ của famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri phát hiện tại 267 nm

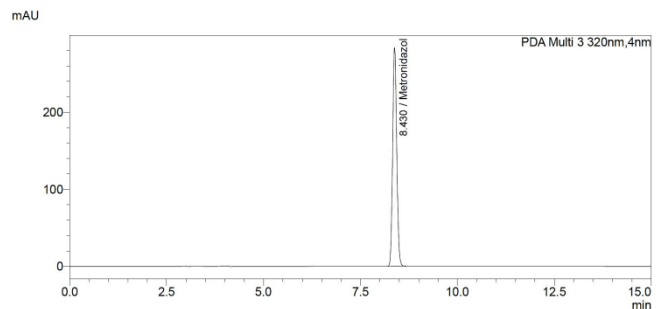
Nghiên cứu tiếp tục điều chỉnh thành phần pha động, tăng phần trăm dung môi phân cực là ACN từ 40 % lên 60 %, đồng thời tăng thời gian chạy gradient để kéo các hợp chất có độ phân cực kém ra khỏi cột sắc ký. Cuối cùng đưa hệ thống về trạng thái ban đầu để tiếp tục sắc ký các mẫu sau đó. Chương trình pha động sau khi điều chỉnh được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3 Chương trình rửa giải gradient 2

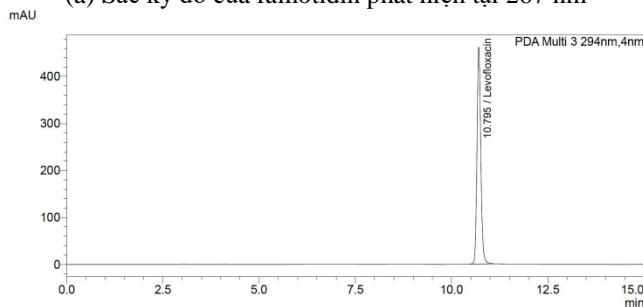
Thời gian (phút)	Tỷ lệ dung môi (v/v)	
	Dung dịch đệm phosphate 20 mM (A)	Acetonitril (B)
0,1	9	1
25	4	6
27	4	6
28	9	1
35	9	1



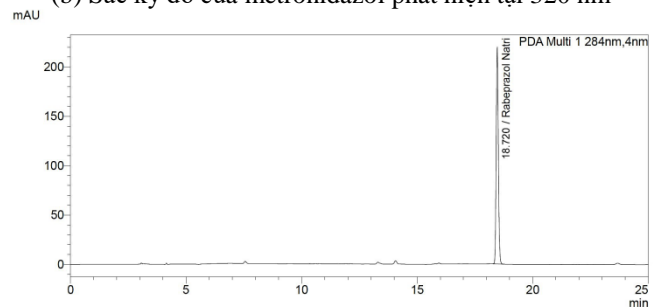
(a) Sắc ký đồ của famotidin phát hiện tại 267 nm



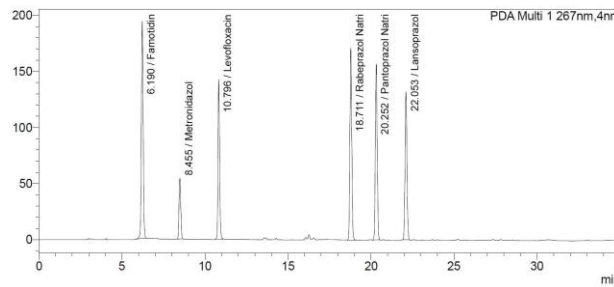
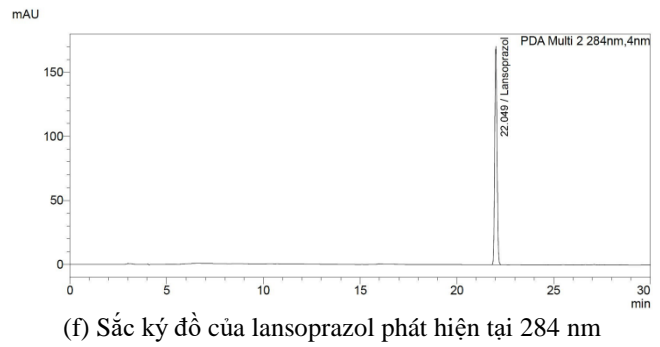
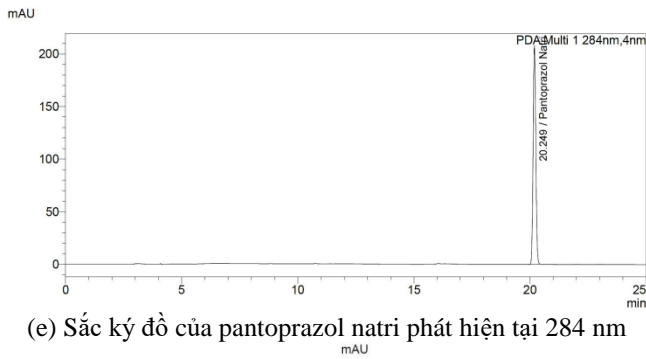
(b) Sắc ký đồ của metronidazol phát hiện tại 320 nm



(c) Sắc ký đồ của levofloxacin phát hiện tại 294 nm



(d) Sắc ký đồ của rabeprazol natri phát hiện tại 284 nm



Hình 2 Sắc ký đồ của (a) famotidin, (b) metronidazol, (c) levofloxacin, (d) rabeprazol natri, (e) pantoprazol natri, (f) lansoprazol, (g) hỗn hợp 6 chất

Với chương trình rửa giải gradient 2, sau khi đã điều chỉnh, sắc ký đồ đã tách được sáu hoạt chất và hình dạng peak rõ ràng, đối xứng. Trong đó, hình dạng peak famotidin được cải thiện đáng kể với hệ số kéo đuôi (1,05) so với chương trình gradient 1 (A_s 0,89).

Bên cạnh đó, thứ tự rửa giải của các hợp chất lần lượt là famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri, pantoprazol natri và lansoprazol, vì các hợp chất có độ phân cực tăng dần: famotidin có $\log K_{ow}$ -1,43, metronidazol có $\log K_{ow}$ -0,02, levofloxacin $\log K_{ow}$

0,28, rabeprazol natri $\log K_{ow}$ 0,6, pantoprazol natri $\log K_{ow}$ 2,2, lansoprazole $\log K_{ow}$ 2,8. Do đó, chương trình này được lựa chọn để phân tích đồng thời sáu hợp chất khảo sát. Thời gian lưu của các chất phân tích được thể hiện ở Hình 2.

3.1.2 Tối ưu tốc độ dòng

Phân tích mẫu chuẩn với tốc độ dòng lần lượt (0,8; 1 và 1,2) mL.phút⁻¹, dùng chương trình rửa giải gradient đã tối ưu và kết quả ở Bảng 4.

Bảng 4 Kết quả tối ưu tốc độ dòng

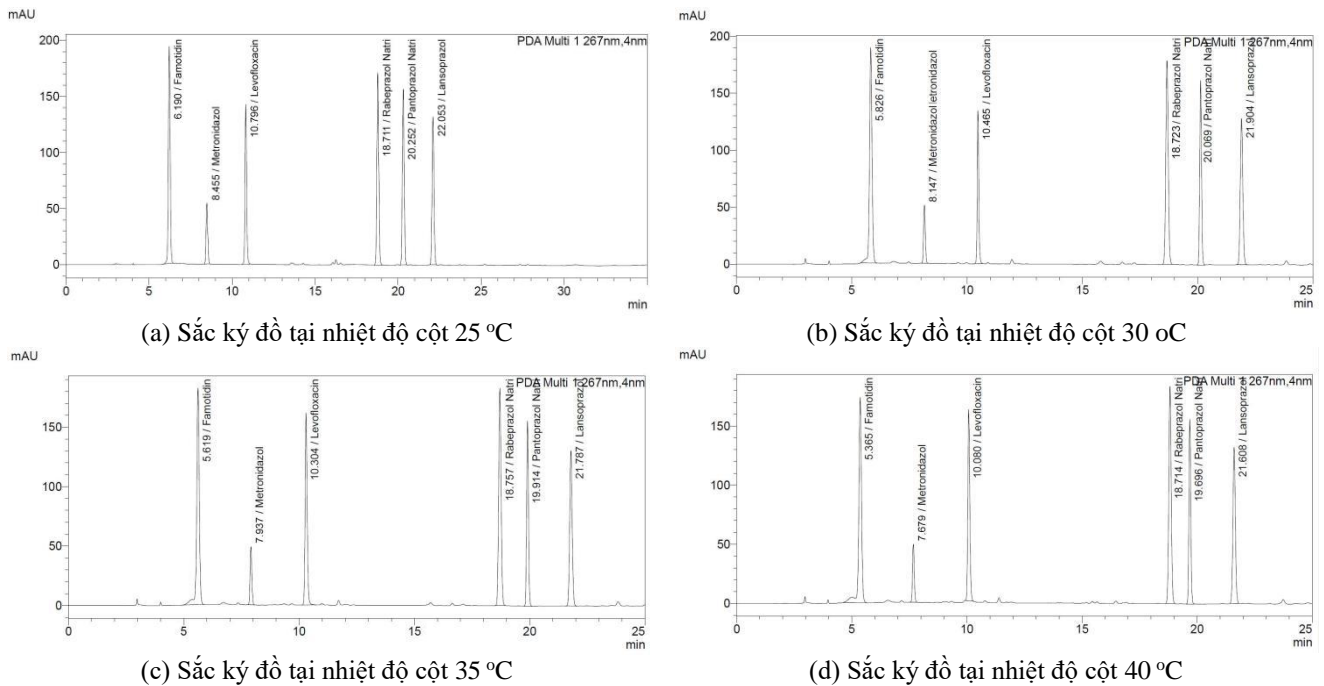
Tên hoạt chất	F=0,8 mL.phút ⁻¹				F=1 mL.phút ⁻¹				F=1,2 mL.phút ⁻¹			
	t _R	S	A _s	R _s	t _R	S	A _s	R _s	t _R	S	A _s	R _s
Famotidin	7,50	1.766.810	0,92		6,19	1.422.347	1,05		5,11	1.187.435	1,05	
Metronidazol	10,14	3.855.932	1,09	11,07	8,44	3.100.448	1,10	11,07	7,21	2.589.624	1,10	10,41
Levofloxacin	12,25	3.865.575	1,15	11,31	10,80	3.079.506	1,14	11,31	9,55	2.569.247	1,14	12,17
Rabeprazol Natri	20,56	2.168.422	1,07	39,58	18,71	1.752.500	1,07	39,58	17,41	1.457.265	1,07	39,88
Pantoprazol Natri	22,12	2.252.246	1,07	6,91	20,25	1.807.852	1,07	6,91	18,88	1.502.767	1,07	6,89
Lansoprazol	23,94	1.683.058	1,07	7,80	22,05	1.349.554	1,07	8,03	20,63	1.126.370	1,06	8,06

(*)t_R: thời gian lưu (phút), S: diện tích peak, A_s: hệ số kéo đuôi, R_s: hệ số phân giải giữa hai peak liên kế nhau

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy tốc độ dòng ảnh hưởng lớn đến thời gian lưu và hình dạng peak sắc ký. Tốc độ dòng tăng từ 0,8 mL.phút⁻¹ đến 1,2 mL.phút⁻¹ thì thời gian lưu giảm dần, peak rõ ràng và đối xứng. Trong đó, famotidin có sự khác biệt nhất so với các hợp chất còn lại về hình dạng peak sắc ký. Tại tốc độ dòng 0,8 mL.phút⁻¹ thu được hình dạng peak đổ đầu (A_s 0,92)

nhưng khi tăng tốc độ dòng lên 1 mL.phút⁻¹, thu được hình dạng peak đối xứng (A_s 1,05). Tốc độ dòng lớn sẽ làm hao tổn dung môi nhưng tốc độ dòng quá nhỏ sẽ kéo dài thời gian phân tích và làm doãng peak sắc ký, gây ra hiện tượng kéo đuôi hoặc đổ đầu [21,22]. Do đó, nghiên cứu chọn tốc độ dòng 1,0 mL.phút⁻¹ để tiến hành định lượng các hợp chất có trong mẫu thử.

3.1.3 Khảo sát nhiệt độ cột sắc ký: phân tích mẫu chuẩn với nhiệt độ cột lần lượt là (25, 30, 35, 35 và 40) °C, sử dụng điều kiện sắc ký đã tối ưu và kết quả được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3 Sắc ký đồ khảo sát nhiệt độ cột lần lượt (a) 25 °C, (b) 30 °C, (c) 35 °C, (d) 40 °C

So sánh các thông số tín hiệu đáp ứng, tính đối xứng, độ phân giải giữa các nhiệt độ với nhau, hầu hết các hợp chất đều phân tách tốt khi phân tích với nhiệt độ cột từ 25 °C đến 40 °C. Khi phân tích ở nhiệt độ 40 °C cho thấy thời gian phân tích ngắn hơn, các mũi sắc ký gồm rabeprazol natri và pantoprazol natri có xu hướng gần nhau hơn so với phân tích ở nhiệt độ 25 °C, điều này có thể giải thích do nhiệt độ cao, dẫn tới độ nhớt dung môi

giảm giúp quá trình rửa giải diễn ra nhanh hơn, làm cho các mũi sắc ký gần nhau. Bên cạnh đó, hình dạng peak sắc ký của famotidin bị biến dạng khi tăng nhiệt độ từ 30 °C đến 40 °C. Do đó, nghiên cứu chọn nhiệt độ cột tối ưu cho quy trình phân tích tại 25 °C.

3.1.4 Ảnh hưởng của nồng độ đệm

Tiến hành khảo sát các nồng độ đệm lần lượt (10, 20 và 30) mM. Kết quả thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5 Kết quả khảo sát nồng độ đệm

Tên hoạt chất	10 mM				20 mM				30 mM			
	t _R	S	As	Rs	t _R	S	As	Rs	t _R	S	As	Rs
Famotidin	5,80	1.392.284	1,05		6,07	1.422.347	1,05		6,06	1.413.580	0,87	
Metronidazol	8,33	3.095.894	1,09	11,84	8,42	3.100.448	1,10	11,07	8,42	3.178.658	1,10	11,08
Levofloxacin	10,44	3.113.728	1,15	10,63	10,68	3.079.506	1,14	11,31	10,69	3.079.941	1,15	11,38
Rabeprazol Natri	18,68	1.762.114	1,06	40,40	18,74	1.752.500	1,07	39,58	18,73	1.714.082	1,07	39,69
Pantoprazol Natri	20,22	1.806.094	1,06	7,06	20,26	1.807.852	1,07	6,91	20,26	1.789.278	1,07	6,96
Lansoprazol	22,01	1.352.522	1,06	8,11	22,05	1.369.554	1,07	7,98	22,04	1.368.966	1,07	7,89

(*)t_R: thời gian lưu (phút), S: diện tích peak, As: hệ số kéo đuôi, Rs: hệ số phân giải giữa hai peak liền kề nhau

Khi tăng nồng độ đệm từ 10 mM đến 30 mM, thì diện tích peak của các chất phân tích tăng nhẹ. Tại nồng độ 10 mM và 30 mM, famotidin có thời gian lưu và diện tích peak thay đổi hơn so với hai nồng độ còn lại và quan sát thấy peak của famotidin cũng bị biến dạng (đổ đầu). Bên cạnh đó, nếu nồng độ đệm của pha động cao thì có khả năng hình thành kết tủa khi trộn với pha động

B (ACN) và cần sẽ làm hỏng các bộ phận của HPLC. Vì vậy, dung dịch đệm 20 mM được chọn để thử nghiệm.

3.2 Thẩm định qui trình phân tích

3.2.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc ký

Tiêm lặp sáu lần liên tiếp dung dịch chuẩn để đánh giá độ tương thích của hệ thống máy HPLC. Kết quả cho



thấy peak sắc ký các hợp chất có RSD thời gian lưu $\leq 0,16\%$, RSD diện tích peak $\leq 0,42\%$, hệ số kéo đuôi $\leq 1,10$, $N \geq 3000$ và độ phân giải giữa các peak $> 2,0$. Các thông số này đã đáp ứng yêu cầu đặt ra, nên hệ thống

trên phù hợp cho việc định tính, định lượng đồng thời sáu hợp chất trong thuốc điều trị vi khuẩn HP (Hình 2 và Bảng 6).

Bảng 6 Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của phương pháp định lượng

Tên hoạt chất	Thời gian lưu (n = 6)		Diện tích peak (n = 6)		As	N	Rs
	Trung bình (phút)	RSD %	Trung bình (mAU.s)	RSD %			
Famotidin	6,21	0,13	1.434.387,67	0,13	1,09	24.982,56	
Metronidazol	8,48	0,16	2.111.355,17	0,18	1,10	26.337,17	10,83
Levofloxacin	10,81	0,10	3.060.315,83	0,09	1,09	55.584,00	11,62
Rabeprazol natri	18,79	0,10	1.673.348,33	0,26	1,07	117.867,67	38,54
Pantoprazol natri	20,26	0,16	1.708.576,33	0,42	1,07	135.341,33	6,94
Lansoprazol	22,05	0,12	1.341.178,00	0,19	1,06	151.556,67	7,97

(*): n: số lần thí nghiệm, % RSD: % độ lệch chuẩn tương đối, As: hệ số kéo đuôi, N: số đĩa lý thuyết, Rs: độ phân giải

3.2.2 Khoảng tuyến tính: hòa tan và pha loãng các chất chuẩn trong hỗn hợp methanol – H₂O (50:50; v/v) để được các dung dịch chuẩn famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri, pantoprazol natri, lansoprazol có nồng độ (10-100) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Kết quả đánh giá độ tuyến tính của phương pháp được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7 Kết quả khảo sát tính tuyến tính

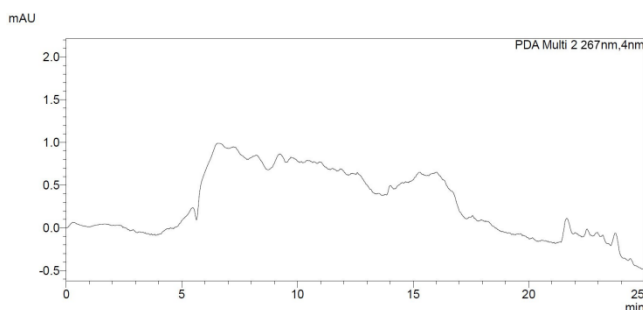
Chất chuẩn	Phương trình hồi quy $S = aCx + b$	R ²	P (95 %)
Famotidin	$S = 35.805 \times Cx - 47.441$	1,0000	0,83
Metronidazol	$S = 25.149 \times Cx - 352,58$	0,9999	0,90
Levofloxacin	$S = 99.963 \times Cx + 13.419$	1,0000	0,99
Rabeprazol Natri	$S = 41.727 \times Cx - 3.264,5$	1,0000	0,70
Pantoprazol Natri	$S = 44.473 \times Cx - 42.452$	0,9998	0,12
Lansoprazol	$S = 44.459 \times Cx + 2.674,1$	1,0000	0,28

Kết quả khảo sát cho thấy bình phương hệ số tương quan $R^2 \geq 0,9998$ nên có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak trong khoảng nồng độ khảo sát. Hệ số $P \geq 0,05$ nên hệ số b không có ý nghĩa thống kê [23]. Do đó, khi định lượng các hợp chất trong khoảng nồng độ đang khảo sát thì có thể sử dụng dung dịch chuẩn có nồng độ trong khoảng này để

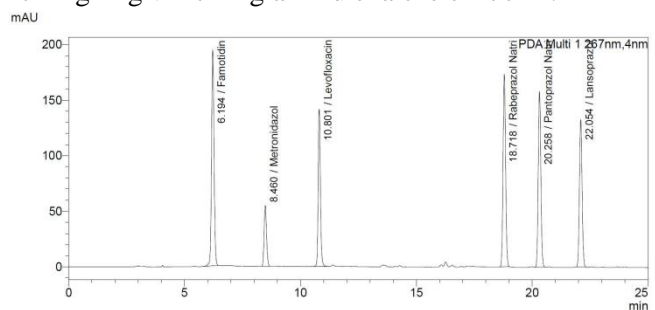
tính toán kết quả mà không cần xây dựng lại dãy nồng độ chuẩn.

3.2.3 Độ đặc hiệu

Trong sắc ký đồ dung dịch thử xuất hiện sáu peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của peak trong sắc ký đồ dung dịch chuẩn (Hình 2 và Hình 4). Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện các peak có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các chất trên.



(a) Sắc ký đồ mẫu trắng



(b) Sắc ký đồ mẫu thử

Hình 4 Sắc ký đồ (a) mẫu trắng, (b) mẫu thử của 6 hợp chất phát hiện tại 267 nm

3.2.4 Độ lặp lại của phương pháp phân tích
Độ lặp lại thể hiện tính chính xác của quy trình phân

tích khi áp dụng trong cùng một điều kiện. Tiến hành định lượng sáu mẫu thử có nồng độ lần lượt famotidin

(40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), metronidazol (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), levofloxacin (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), rabeprazol natri (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pantoprazol natri (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), lansoprazol (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Tính tỷ lệ (%) độ lệch chuẩn tương đối các kết quả định lượng theo công thức sau:

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

Độ lệch chuẩn (Standard Deviation):

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

Tỷ lệ (%) độ lệch chuẩn tương đối:

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

Kết quả ở Bảng 8 và các kết quả định lượng < 2,0 % nên phương pháp đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Bảng 8 Hàm lượng các hoạt chất trong thuốc viên

STT	Tên chất	S (mAUs)	Hàm lượng (mg)	Hàm lượng so nhãn (%)	%RSD
1	Famotidin	1.447.822,33	39,98	99,94	0,97
2	Metronidazol	2.130.159,33	250,05	100,02	0,68
3	Levofloxacin	3.043.881,00	499,32	99,86	0,48
4	Rabeprazol natri	1.678.102,01	40,06	100,16	0,85
5	Pantoprazol natri	1.731.816,83	39,94	99,85	0,42
6	Lansoprazol	1.334.770,33	29,76	99,19	0,89

3.2.5 Độ đúng của phương pháp phân tích

Thêm một lượng chính xác dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là (80, 100 và 120) % vào mẫu thử, và tính lượng tìm thấy để suy ra tỷ lệ độ đúng (%) theo biểu thức sau:

$$\frac{C_T - C_M}{C_{TV}}$$

Ghi chú:

C_T : Nồng độ của mẫu thử có sẵn và lượng chuẩn thêm vào ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

C_M : Nồng độ của mẫu thử có sẵn ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

C_{TV} : Nồng độ của mẫu chuẩn thêm vào ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Kết quả được trình bày ở Bảng 9.

Bảng 9 Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp phân tích

Tên chất	Famotidin	Metronidazol	Levofloxacin	Rabeprazol natri	Pantoprazol natri	Lansoprazol
80%	99,36	99,70	99,57	99,81	98,64	98,88
	98,68	99,87	98,93	99,91	99,41	100,83
	99,93	100,30	99,03	100,04	99,08	99,65
100%	99,84	100,57	99,57	99,04	100,66	99,83
	100,26	100,25	100,07	100,06	100,73	99,89
	99,73	99,91	100,55	98,95	98,81	100,16
120%	100,79	101,27	100,45	99,99	100,26	99,99
	99,74	99,26	98,97	99,50	99,57	99,77
	100,67	99,33	100,63	100,08	99,54	100,56
TB	99,89	100,05	99,75	99,71	99,63	99,95
%RSD	0,65	0,63	0,70	0,44	0,77	0,56

Kết quả xác định độ đúng thông qua tỉ lệ độ thu hồi của phương pháp cho thấy tỷ lệ độ thu hồi trung (%) bình đạt trong giới hạn cho phép (98-102) % và % RSD (%) đều nhỏ hơn 2,0 %. Vì vậy, phương pháp đạt yêu cầu về độ đúng.

3.3. Áp dụng quy trình phân tích

Nghiên cứu đã vận dụng phương pháp phân tích đề xuất để xác định đồng thời các hoạt chất có trong mẫu thử và kết quả phân tích ở Bảng 10.

Bảng 10 Kết quả định lượng của một số chế phẩm

STT	Tên hoạt chất	Tên mẫu	HL so nhãn (%)
1	Famotidin	Famotidin 40 mg (công ty dược phẩm F.T.Pharma)	99,43
		Famotidin 40 mg (công ty dược phẩm T.W Vidipha)	99,32
		Famotidin 40 mg (công ty dược phẩm 3/2)	100,04



STT	Tên hoạt chất	Tên mẫu	HL so nhãn (%)
2	Metronidazol	Metronidazol 250 mg (công ty dược phẩm DHG Pharma)	99,42
		Metronidazol 250 mg (công ty dược phẩm Domesco)	99,13
		Metronidazol 250 mg (công ty dược phẩm Sanofi)	100,64
3	Levofloxacin	Levofloxacin Stada 500 mg (công ty dược phẩm Stada)	100,20
		L - Stafloxin 500 mg (công ty dược phẩm Stellapharm)	99,32
		Levofloxacin 500 mg (công ty dược phẩm Imexpharm)	99,68
4	Rabeprazol	Rabeto 40 mg (công ty dược phẩm Flamingo Pharmaceuticals)	100,62
5	Pantoprazol	Pantoprazol 40 mg (công ty dược phẩm Domesco)	100,67
		Pantoprazol 40 mg (công ty dược phẩm Stada)	100,27
		Pantostad 40 mg CAP (công ty dược phẩm Stellapharm)	99,21
6	Lansoprazol	Lansoprazol Stada 30 mg (công ty dược phẩm Stada)	97,67
		Lansoprazol Stella 30 mg (công ty dược phẩm Stellapharm)	98,39
		TV.Lansoprazol 30 mg (công ty dược phẩm TV.Pharm)	97,94

Tỷ lệ hàm lượng của các chế phẩm đều đạt yêu cầu về % hàm lượng so với nhãn trong khoảng (90-110) % theo tiêu chuẩn của Dược điển USP 43 [24].

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển một phương pháp phân tích để định lượng đồng thời sáu hoạt chất famotidin, metronidazol, levofloxacin, rabeprazol natri, pantoprazol natri và lansoprazol trong thuốc viên bằng phương pháp HPLC với kiểu rửa giải gradient. Bước sóng phát hiện các hợp chất bằng đầu dò PDA lần lượt là famotidin 267 nm, metronidazol 320 nm, levofloxacin 294 nm, rabeprazol natri, pantoprazol

natri và lansoprazol 284 nm. Kết quả thu được cho thấy các hợp chất tách hoàn toàn với độ phân giải cao và thời gian chạy tương đối ngắn, khoảng 30 phút, do đó có thể phân tích một số lượng mẫu lớn trong khoảng thời gian ngắn nên tiết kiệm được thời gian và chi phí. Kết quả thẩm định phương pháp có độ nhạy tốt, độ tin cậy cao với khoảng làm việc cho hoạt chất từ (10-100) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Phương pháp đã được thẩm định và đáp ứng các yêu cầu của ICH về độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ đúng, độ chính xác. Bên cạnh đó, quy trình đã áp dụng để kiểm tra các mẫu thuốc trên thị trường, và các mẫu đều có hàm lượng như công bố.

Tài liệu tham khảo

- Viện Dược liệu (2016). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*. NXB Khoa học Kỹ thuật, tr. 163-164
- Bộ Y tế (2013). *Hoá dược 2*. NXB Giáo dục Việt Nam, tr. 138-143
- Bộ Y tế (2017). *Dược điển Việt Nam V*. NXB Y học, tr. 405
- S. Naveed et al (2014). A new HPLC method for the assay of levofloxacin and its application in drug-metal interaction studies. *Journal of Scientific and Innovative Research*, Vol. 3(1), pp. 91-96
- Bộ Y tế (2011). *Hoá dược 1*. NXB Giáo dục Việt Nam, tr. 145-150
- M. Alamgir1 et al (2017). HPLC determination of metformin, famotidine and ranitidine by derivatization with benzoin from drugs and biological samples. *Pharm Anal Acta*, Vol 8(5), pp. 1-7
- N. Rahman and S. Khan (2018). An experimental design approach in the optimization of potentiometric method for lansoprazole determination using lansoprazole-tungstate based ion-selective electrode. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, DOI: 10.1021/acs.iecr.8b01281, pp. 1-36
- S.A. Abdel-Gawad, H.H. Arab and A.B. Alabbas (2021). Validated simultaneous gradient ultra-performance liquid chromatographic quantification of some proton pump inhibitor drug residues in saudi pharmaceutical industrial wastewater. *Molecules*, Vol. 26, pp. 1-11
- M. Gülfen, Y. Canbaz and A. Özdemir (2020). Simultaneous determination of amoxicillin, lansoprazole and levofloxacin in pharmaceuticals by HPLC with UV-Vis detector. *Journal of Analysis and Testing*, Vol. 4, pp. 45-53
- V. Maslarska et al (2023). Development and validation of analytical procedure for analysis of amoxicilline, metronidazole and omeprazole, used as anti-*Helicobacter pylori* agents alone and in mixture. *Pharmacia*, Vol. 70(3), pp. 681-688



11. D.A. Gawad, M.M. Elnaggar and T.S. Belal (2022). Multi-analyte HPLC–DAD method for concurrent analysis of six antimicrobials and three proton pump inhibitors frequently used in management of *Helicobacter pylori* infection: Application to simulated intestinal fluid samples. *Chromatographia*, Vol. 85, pp. 617-628
12. John Dolan (2023). A guide to HPLC and LC-MS buffer selection. *Advanced Chromatography Technologies*, www.ace-hplc.com, pp. 1-16
13. International Conference on Harmonization (2023). Guideline on validation of analytical procedures. *European Medicines Agency*, pp. 1-33
14. Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia (2010). *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr. 15-58
15. J.W. Kim et al (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of Toxicological Sciences*, vol. 34(2), pp. 227-232
16. F. Huang and R. Bodmeier (2017). Preparation and evaluation of oral multiparticulate formulations of acid-labile drugs. *Freie Universität Berlin*, pp. 1-123
17. R. Onuku (2016). Drug profile of famotidine. *University of Michigan*, pp. 1-22
18. Horizon Pharma Ireland Limited (2019). Product monograph including patient medication information. *Innomar Strategies Inc.*, pp. 1-50
19. H. Sun, H. Wang and X. Ge (2012). Simultaneous determination of the combined drugs of ceftriaxone sodium, metronidazole, and levofloxacin in human urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 26, pp. 486-492
20. J.C. Serna-Carrizales (2023). Optimization of binary adsorption of metronidazole and sulfamethoxazole in aqueous solution supported with dft calculations. *Processes*, Vol. 11, pp. 1-13
21. Bộ Y tế (2012). *Hóa phân tích, phân tích công cụ tập 2*. NXB Y học, tr. 126-129
22. Nguyễn Minh Đức (2016). *Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm và hợp chất tự nhiên*. NXB Y học, tr. 139-171
23. Hà Diệu Ly (2015). *Kiểm nghiệm thuốc*. NXB Đại học Quốc gia TP.HCM, tr. 58-59
24. The United States Pharmacopoeia 43 (2020). The United States Pharmacopoeial Convention, 27th Edition, pp. 1-2

Quantification of different drugs in the treatment regimen for *Helicobacter pylori* infection using high performance liquid chromatography (HPLC) method

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

Abstract The research has applied the HPLC-PDA method to simultaneously quantify six types of drugs used in the treatment of *Helicobacter pylori* infection, including famotidine, metronidazole, levofloxacin, sodium rabeprazole, sodium pantoprazole, and lansoprazole. The separation was performed using a C18 reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and a mobile phase consisting of a phosphate buffer solution at pH = 5.0 and acetonitrile, flow rate of 1 mL/min using a gradient elution program. The gradient elution started with a phosphate buffer:acetonitrile ratio of 9:1 (v/v), which was then changed to reach a ratio of 4:6 (v/v) over 25 minutes. The quantification of the analytes was based on the peak area measurements of famotidine at 267 nm, metronidazole at 320 nm, levofloxacin at 294 nm, and sodium rabeprazole, sodium pantoprazole, and lansoprazole at 284 nm. The validation of the analytical procedure, including system suitability, linearity, specificity, repeatability, and accuracy, met the requirements of the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. As a result, this analytical approach can be used to routinely monitor the quality of these chemicals in pharmaceutical dosage forms.

Keywords Capsules, antibiotic, antihistamines, *Helicobacter pylori*, high performance liquid chromatography (HPLC), PDA detector

