

**ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI SULFAGUANIDIN,
SULFAMETHOXAZOL VÀ TRIMETHOPRIM TRONG THUỐC VIÊN NÉN
SỬ DỤNG CÙNG MÔ HÌNH HỒI QUY CẤU TỬ CHÍNH (PCR) TỪ DỮ LIỆU
PHỔ HỒNG NGOẠI GẦN**

Đến tòa soạn 23 - 3 - 2016

Tạ Thị Thảo, Bùi Xuân Thành, Vũ Thị Huệ

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

Đoàn Thị Huyền

Khoa Tự nhiên- Trường Cao đẳng sư phạm Hà Tây

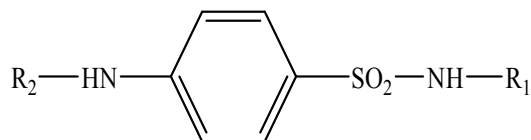
SUMMARY

**SIMULTANEOUS QUANTITATIVE ANALYSIS OF SULFAGUANIDINE,
SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM USING PRINCIPAL
COMPONENT REGRESSION (PCR) BASED ON NEAR INFRARED
SPECTRA**

In this study, Near Infrared Spectroscopy (NIRS) had been applied for analyzing sulfaguanidine, sulfamethoxazole and trimethoprim in tablets without the need of sample digestion. The analytical method was developed with synthetic and doped samples based on synthesis samples containing three analytes and five excipients including maltodextrin, talc, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, starch and magnesium stearate. Eight lots of a commercial solid tablets were also used to assess the validity of the method to quantify one or two among sulfaguanidine, sulfamethoxazole and trimethoprim in the industrial pharmaceutical product. The method proposes measurements in absorption mode using a Fourier-transform near infrared (FT-NIR) spectrometer. Principal component regression was the multivariate method adopted to calibrate the NIR spectra with the analyte mass fraction. The content of sulfaguanidine, sulfamethoxazole and trimethoprim present in the commercial samples was confirmed by titrimetric and HPLC techniques with the relative error below 10%.

1. MỞ ĐẦU

Các sulfonamid kháng khuẩn là dẫn chất của p- aminobenzensulfonamid, có công thức cấu tạo chung như sau:



Trong đó thường gặp R_2 là H, R_1 có thể là mạch thẳng, dị vòng. Nhóm thế R_1 đối với 3 chất sulfaguanidin (SFG), sulfamethoxazol (SMX) và trimethoprim (TMP) có dạng như ở hình 1[1]. Hiện nay, tỷ lệ kháng thuốc và kháng chéo giữa các sulfamid rất cao nên đã hạn chế việc sử dụng sulfamid rất nhiều. Mặt khác, do có nhiều độc tính và đã có kháng sinh thay thế, các sulfamid ngày càng ít dùng độc lập mà thường phối hợp với kháng sinh khác như phối hợp giữa sulfamethoxazol với trimethoprim để tăng khả năng điều trị của thuốc.

Việc kiểm định các chất kháng sinh nhóm này, đặc biệt khi cùng trong một thuốc có nhiều loại kháng sinh thường đòi hỏi phải tách bằng phương pháp sắc ký, phổ biến là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [2]. So với HPLC, thì định lượng chất hữu cơ trong thuốc bằng phổ hồng ngoại gần (NIR) có ưu điểm nổi trội do không phải xử lý mẫu, phân tích nhanh, giá thành rẻ do không tốn dung môi và nếu kết hợp với thuật toán hồi qui đa biến thì không phải tách riêng các chất ra khỏi nền mẫu chứa tá dược

và có thể phân tích đồng thời các hoạt chất trong cùng nhóm thuốc [3].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng phương pháp kiểm tra nhanh và đồng thời chất lượng thuốc viên nén chứa các hoạt chất sulfaguanidin (SFG), sulfamethoxazol (SMX) và trimethoprim (TMP) thuộc nhóm sulfamid bằng phương pháp quang phổ kế hồng ngoại gần truyền qua kết hợp với hồi qui đa biến tuyến tính (MRL) mà không cần phân hủy mẫu. Với một mô hình đường chuẩn đa biến được xây dựng từ bộ mẫu chuẩn rắn tự tạo chứa 3 hoạt chất và 5 tá dược, bằng thuật toán PCR [4] sẽ cho phép định lượng được thuốc chứa 1 hoặc 2 trong số 3 hoạt chất này đang lưu thông trên thị trường.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

- Chất chuẩn Sulfaguanidin (Viện kiểm nghiệm thuốc trung ương, chuẩn phòng thí nghiệm), số kiểm soát: 0100111. Hàm lượng: 100,7% $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (khan). Độ ẩm: 7,89%. Hàm lượng nguyên trạng: 92,11%
- Chất chuẩn Sulfamethoxazol (viện kiểm nghiệm thuốc trung ương, chuẩn dược điển Việt Nam), số kiểm soát: 0107110. Hàm lượng: 100,24% $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (khan). Độ ẩm: 0,19%. Hàm lượng nguyên trạng: 100,05%
- Chất chuẩn Trimethoprim (Viện kiểm nghiệm thuốc trung ương, chuẩn dược điển Việt Nam), số kiểm soát: 0201109. Hàm lượng: 99,89% $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$

(khan). Độ ẩm 0,1%. Hàm lượng nguyên trạng: 99,79%

- Các tá dược:

+ Tinh bột sắn (Nhà máy sản xuất tinh bột mì Quảng Ngãi), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo ĐĐVN 4

+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Công ty cổ phần hóa dược Việt Nam), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo BP 2009.

+ Maltodextrin (Yisui dadi Corn developing Co., LTD), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo BP 2009.

+ Magie stearat (Peter Greven Asia SDN. BHD), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo USP34.

+ Bột Talc (Công ty cổ phần hóa dược Việt Nam), đạt tiêu chuẩn đã kiểm tra theo ĐĐVN 4

- Hóa chất tinh khiết phân tích (P.A.) gồm KBr (dùng cho phép đo hồng ngoại) và dùng cho HPLC như axit axetic, NaOH, axetonitrin, triethylamin, methanol (Merck)

- Cân phân tích Sartorius độ đọc 0,0001g.

- Bộ dụng cụ ép viên: Agilent Technologies standard sampling kit (part no: Pike - 162 - 1000).

- Máy quang phổ hồng ngoại Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR spectrometer, dải số sóng đo 7500-2800 cm^{-1} . Detector nhiệt DTGS. Thiết bị được đặt trong phòng đo duy trì độ ẩm dưới 30%.

- Thư viện phổ chuẩn: ST- Japan spectral libraries (part no: K8159 - 1000)

- Phần mềm Matlab 7.6: Chương trình hồi qui thành phần chính (PCR) để phân tích đồng thời các cấu tử trong cùng hỗn hợp.

- Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu LC-20A.; Cột tách C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)

2.2. Quy trình định lượng nhanh và đồng thời sulfaguanidin, sulfamethoxazol, và trimethoprim trong viên thuốc bằng phương pháp NIR

- Bước 1: Mô hình hồi quy đa biến tuyến tính xác định cả ba hoạt chất và tổng hàm lượng các tá dược được xây dựng từ 30 mẫu chuẩn dạng bột và 15 mẫu kiểm tra chứa đồng thời các hoạt chất là sulfaguanidin, sulfamethoxazol, và trimethoprim cùng với ba tá dược là tinh bột sắn, maltodextrin, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, magie stearat, bột Talc với tỷ lệ thay đổi trong khoảng hàm lượng khảo sát sao cho tín hiệu độ hấp thụ quang trong vùng tuyến tính.

- Bước 2: Nghiền và trộn từng mẫu trong 15 phút để hỗn hợp được đồng nhất.

- Bước 3: Lấy 2 mg mẫu vừa đồng nhất, trộn đều với 98 mg KBr rồi tiến hành nghiền mịn đồng nhất mẫu trong cối mã não trong 10 phút.

- Bước 4: Lấy khoảng 15 mg lượng bột vừa nghiền được, cho vào bộ ép viên và

đo độ hấp thụ quang trong vùng phổ NIR từ 3600-3000 cm^{-1} , ghi lại file số liệu biểu diễn độ hấp thụ quang theo số sóng của từng mẫu, xuất số liệu thu được dưới dạng ASCII và chuyển toàn bộ dữ liệu vào phần mềm Matlab để tính toán kết quả.

- Bước 5: Đường chuẩn đa biến và các bộ dữ liệu dự đoán được xây dựng trên ma trận độ hấp thụ quang của các mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra đã chuẩn bị ở phần trên, tính toán ma trận hệ số hồi quy theo phương pháp PCR trên phần mềm và sử dụng ma trận này để tìm nồng độ mỗi hoạt chất trong từng mẫu.

- Bước 6: Định lượng các mẫu thực tế bằng cách trộn một lượng bột viên với tá dược để pha loãng hàm lượng hoạt chất sao cho thuộc khoảng hàm lượng xây dựng đường chuẩn, ghi phổ hấp thụ của các mẫu này, chuyển dữ liệu thu được vào phần mềm Matlab để tính toán kết quả. Tính toán hàm lượng hoạt chất trong các mẫu thuốc viên theo công thức dưới đây:

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

Trong đó: X: Lượng (mg) hoạt chất tìm được từ mô hình hồi quy đa biến

m_t : khối lượng cân của mẫu thử (mg)

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

2.3. Phân tích đối chứng

Hàm lượng sulfaguanidin trong thuốc viên nén được định lượng bằng phương

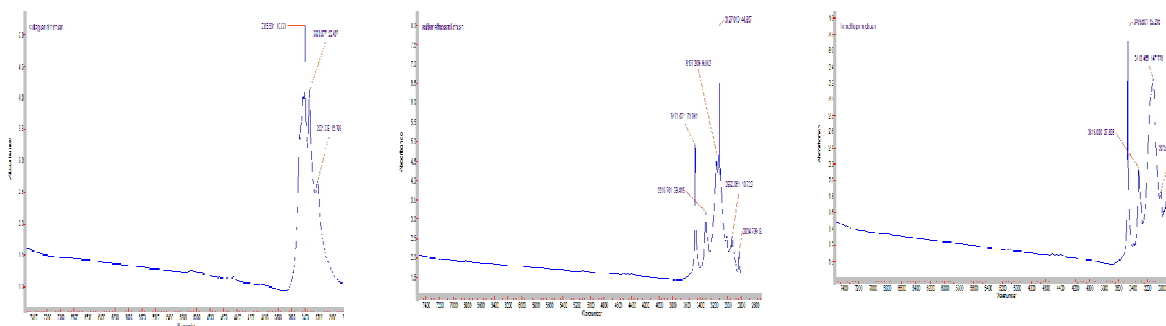
pháp chuẩn độ thể tích theo ĐĐVN 4 [5]. Hàm lượng sulfamethoxazol và trimethoprim trong cùng viên nén được định lượng theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao như được điển Mỹ USP 34- NF 29 [6].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim trong cùng hỗn hợp

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

Phổ hấp thụ vùng NIR khảo sát (7500-3000 cm^{-1}) của 3 hoạt chất nghiên cứu thu được ở hình 1 cho thấy các hoạt chất này đều hấp thụ mạnh tia IR trong vùng phổ 3600- 3000 cm^{-1} . Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số loại tá dược thường được sử dụng để sản xuất các kháng sinh nhóm sulfamid cũng cho thấy mẫu bột talc hấp thụ mạnh trong vùng hồng ngoại 3750-3650 cm^{-1} , mẫu bột magie stearat hấp thụ mạnh trong vùng phổ hồng ngoại từ 2950-2800 cm^{-1} , ba tá dược khác là tinh bột sắn, maltodextrin và canxiphosphat đều hấp thụ bức xạ hồng ngoại từ 3600- 3000 cm^{-1} . Do đó, không thể xác định riêng rẽ các hoạt chất này trong viên thuốc khi có mặt của các loại tá dược trên bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang đơn thuần.



Hình 1: Phổ hấp thụ vùng NIR của các chất SFG, SMX và TMP (từ trái qua phải)

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

Khi trộn bột của mẫu thuốc viên Bisepton ngoài thị trường (chứa hàm lượng sulfamethoxazol 400 mg và trimethoprim 80 mg/ viên) với KBr theo tỷ lệ khối lượng khác nhau, kết quả cho thấy khi tỷ lệ khối lượng mẫu/ KBr tăng thì độ hấp thụ quang của các mẫu viên cũng tăng lên nhưng độ lặp lại của phép đo càng kém. Còn nếu lượng mẫu đưa vào quá nhỏ thì dễ gây sai số trong quá trình cân, do đó tỷ lệ khối lượng mẫu/ KBr là 2/98 là phù hợp.

Mặt khác, thực nghiệm cũng cho thấy, độ lặp lại (đánh giá qua độ lớn của độ hấp thụ quang trong mỗi lần ép viên) khi đo với cùng mẫu ban đầu rất kém vì đây là phép đo mẫu rắn. Do vậy, không thể dùng phương pháp định lượng thông thường trong phân tích công cụ dựa trên mối quan hệ tuyến tính giữa độ hấp thụ quang và nồng độ để định lượng chất phân tích mà phải kết hợp phương pháp này với các công cụ toán thống kê đa biến (chemometrics). Ưu điểm của chemometrics là trích xuất thông tin về chất theo mối quan hệ giữa hàm lượng các chất với nhau và mối tương quan tỉ lệ

thu được giữa các mẫu chứ không phải theo giá trị tuyệt đối của tín hiệu đo, nên hoàn toàn có thể sử dụng để định lượng các hoạt chất cần phân tích.

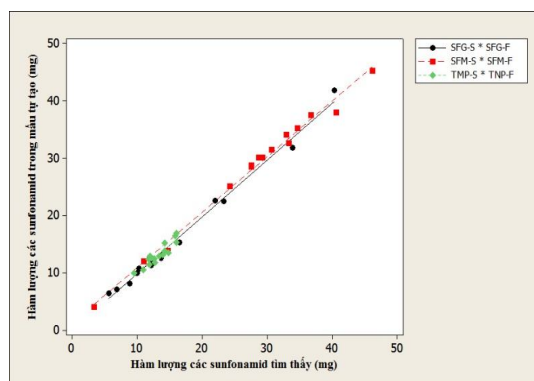
3.2. Xác định đồng thời SFG, SMX và TMP sử dụng cùng mô hình PCR

3.2.1. Xây dựng phương trình đường chuẩn đa biến

Phương trình đường chuẩn đa biến PCR xác định đồng thời SFG, SMX và TMP và tổng hàm lượng tá dược dựa trên ma trận hàm lượng của 30 mẫu chuẩn dạng bột chứa đồng thời SFG có khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 0g đến 46g; SMX có khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 0g đến 40g và TMP có khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 0g đến 20g và 3 tá dược thường sử dụng trong thành phần viên thuốc là tinh bột sắn có khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 4g đến 35g, maltodextrin có khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 5g đến 15g và canxiphosphat có khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 10g đến 42g. Ma trận tín hiệu đo của 30 mẫu tại 312 số sóng là độ hấp thụ quang trong vùng phổ từ 3600-3000 cm^{-1} . Bằng thuật toán phân tích thành phần chính (PCA) trên

phần mềm Minitab, chúng tôi nhận thấy cấu tử chính thứ nhất (PC1) đã chiếm 96,4% lượng thông tin của tập dữ liệu, nếu thêm cấu tử thứ hai (PC2) thì phương sai tích lũy đã đạt 98,8%. Khi thêm một cấu tử chính nữa (PC3) thì 3 cấu tử đầu này đã chiếm 99,6% lượng thông tin tập dữ liệu. Từ cấu tử thứ 4 trở đi lượng thông tin thu được thay đổi không đáng kể. Do đó có thể kết luận chỉ cần 3 cấu tử có ảnh hưởng chính tới các thông tin chứa trong tập số liệu, vì vậy chúng tôi lựa chọn số cấu tử chính là 3 để làm cơ sở tính toán hệ số hồi qui theo phương pháp PCR với không gian mới của tập số liệu và ma trận nồng độ đã xây dựng.

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



Hình 2: Mối tương quan hàm lượng các sulfamid trong mẫu tự tạo với thời lượng tìm được

Một ma trận gồm 15 mẫu kiểm tra với hàm lượng các hoạt chất và tá dược biết trước nằm trong khoảng đường chuẩn đã xây dựng được dùng để kiểm chứng tính phù hợp của mô hình hồi quy. Hình 2 cho thấy có sự phù hợp rất tốt giữa

hàm lượng ba hoạt chất có trong mẫu tự tạo (synthesis (S) với hàm lượng ba hoạt chất tìm lại được (found (F) bằng mô hình (hệ số tương quan đạt gần 1) và không có sai số hệ thống (hệ số chẵn ≈ 0). Các giá trị sai số mắc phải chỉ từ 0,5% đến 14,7%. Do đó, hoàn toàn có thể áp dụng phương pháp này để xác định đồng thời các hoạt chất trên trong cùng một hỗn hợp mà không cần tách loại.

3.2.3. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp PCR xác định đồng thời SFG, SMX, TMP và tá dược

Việc xác định giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) đối với phương pháp phân tích đồng thời hồi qui đa biến thường có rất ít nghiên cứu công bố. Áp dụng qui tắc 3σ , chúng tôi đã đưa tiến hành đo lặp lại 7 lần phổ nền của mẫu phân tích chỉ có tá dược, tính độ lệch chuẩn (σ) của các tín hiệu này tại tất cả các số sóng và sử dụng mô hình PCR để tính nồng độ nhỏ nhất thu được tương ứng với tín hiệu $y_{\text{nền}} + 3\sigma$. Khi đó giá trị LOD của các chất SFG, SMX và TMP lần lượt là 5,9 μg , 19,7 μg và 10,4 μg với mẫu trước khi đo. Giá trị LOQ được tính là 3,3 lần LOD.

3.3. Ứng dụng phân tích mẫu thuốc viên

Trong các phép phân tích, mỗi mẫu thuốc viên nén của các nhà sản xuất khác nhau được thu thập trên thị trường. Cân 20 viên thuốc, tính khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột mẫu (m_t) ứng với một viên và làm như qui trình ở mục

2.2. Các kết quả phân tích mẫu thực tế chỉ chứa một hoạt chất SFG trong thuốc viên sulfaguanidin 500 mg bằng chính ma trận chứa đồng thời 3 hoạt chất cho thấy phù hợp với phép phân tích đối

chứng với sai số chỉ khoảng dưới 10%. Với các mẫu thuốc viên chứa đồng thời hai hoạt chất với hàm lượng SFM 400 mg/viên và TMP 80 mg/viên, kết quả trong các mẫu cụ thể thu được ở bảng 1.

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

Ký hiệu mẫu	Tên thuốc	Nhà sản xuất	Lô sản xuất	Hạn sử dụng	Hàm lượng SFM (mg/viên)		Hàm lượng TMP (mg/viên)	
					PP NIR	PP đối chứng	PP NIR	PP đối chứng
ST1	Trimesepton	CTCP Dược phẩm Hà Tây	281014	13/10/17	364,6±1,8	391,2±0,2	76,9±1,8	77,5±0,3
ST2	Vamidol 480	Công ty cổ phần SPM	1402003	21/02/17	371,2±1,2	395,2±0,9	78,1±1,2	81,6±0,4
ST3	Biseptol	SX nhượng quyền của: Pharmaceutical Works Polfa-Pabianice, Poland tại công ty cổ phần SPM	1401003	17/01/17	365,9±1,0	394,4±0,2	77,0±1,0	77,5±0,2
ST4	Trimezola	CTCP Dược phẩm TW2-Dopharma	00113	11/11/16	368,6±0,7	389,2±0,6	77,6±0,70	80,6±0,4

Các kết quả thu được cho thấy hàm lượng các hoạt chất thu được theo phương pháp NIR-PCR tuy luôn thấp hơn kết quả xác định theo phương pháp đối chứng HPLC nhưng sự khác nhau giữa chúng là không có ý nghĩa thống kê. Độ chệch tương đối hàm lượng 3 hoạt chất phân tích với giá trị xác định theo phương pháp đối chứng của Dược điển qui định đều dưới 10%.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, các thuốc viên nén chứa một hoặc hai trong số 3 hoạt chất sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim được định lượng nhanh bằng cùng mô hình PCR có chứa cả 3 cấu tử và tá dược (chứa 5 thành phần). Thuật toán PCR với ưu điểm là tính toán trên toàn tập số liệu nhưng kết quả thu được từ mô hình này lại không phụ thuộc vào tập số liệu thô ban đầu (độ hấp thụ quang theo số sóng) mà phụ thuộc vào các mô hình trung gian lựa

chọn. Phương pháp này cho phép loại bỏ sai số nhiều phổ và sai số ngẫu nhiên trong quá trình đo nhờ lựa chọn được số PC phù hợp. Áp dụng phương pháp PCR với 3 cấu tử chính để phân tích các mẫu kiểm chứng đều cho kết quả khá tốt, với sai số nằm trong ngưỡng cho phép. Phương pháp NIR kết hợp với PCR tỏ ra khá ưu việt khi áp dụng vào phân tích một số hoạt chất nhóm sulfamid và hoạt chất khác đi kèm. Đây là một kỹ thuật phân tích rất nhanh, chuẩn bị mẫu đơn giản, lượng mẫu phân tích ít, không cần phá hủy mẫu phân tích, chi phí thấp do không tốn dung môi hóa chất (như phương pháp phân tích truyền thống HPLC), hạn chế được các sai số trong quá trình chuẩn bị mẫu nên có thể mở rộng để phân tích nhanh hàm lượng hoạt chất trong các mẫu thuộc ngoài thị trường.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện nhờ hỗ trợ kinh phí và thiết bị đo hồng ngoại gần Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR spectrometer của đề tài nghị định thư với Cộng hòa Pháp Lotus 2014- 2016, mã số 39/2014/HD- NĐT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Minh Trí, Huỳnh Thị Ngọc Phương (2010), *Hóa dược* tập 1, NXB Giáo dục Việt Nam, Hà Nội.
- [2]. Cemal Akay, Sibel A. Ozkan (2002), “Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, pp. 1207-1213.
- [3]. Emil W.Ciurczak (2002), *Pharmaceutical and Medical Applications of Near- Infrared Spectroscopy*, Marcel Dekker
- [4]. J. Luypaert, D.L. Massart, Y. Vander Heyden (2006), “Review Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis”, *Talanta*, 72 , pp. 865-883.
- [5]. Bộ Y Tế (2009), *Dược điển Việt Nam tái bản lần thứ 4*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [6]. The United State Pharmacopoeia 34 (2012).