

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

Đến tòa soạn 05/12/2016

Đoàn Thị Huyền

Khoa Tự nhiên, Trường Cao đẳng Sư phạm Hà Tây

Đặng Ngọc Định

Khoa Kỹ thuật Phân tích, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

Tạ Thị Thảo, Bùi Xuân Thành

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

SUMMARY

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

In this study, the simultaneous quantitative analysis of Cefadroxil, Cefixim in tablets using multivariate linear regression based on near infrared spectral has been developed. The same model of partial least squares (PLS) with 6 separate vector matrix is built with standard matrix of samples (22 samples containing 4 analytes together with total of excipients) were applied for individual and/or simultaneous determination of Cefadroxil, Cefixim in samples. A matrix of test samples including 10 samples created by known amount of components was used to assess the accuracy of the PLS model. The results indicated the relative error varied from 1.1 to 15%. The optimum experimental conditions were spectral region: 3600 - 2800 cm^{-1} ; volume ratio of sample/ KBr 2/98 (w/w); 15 mg of pellet form. The analytical results of 2 commercial drug samples containing 1 of 2 actives by means of near-infrared spectral and chromatographic methods HPLC mass spectrometry showed the small relative error (<15%) between two methods. The showed results can be used for rapid and simultaneous determination of the active ingredients of Cefadroxil, Cefixim in the pharmaceutical tablets.

Keywords: *Near-infrared method, linear regression, partial least squares, HPLC*

1. MỞ ĐẦU

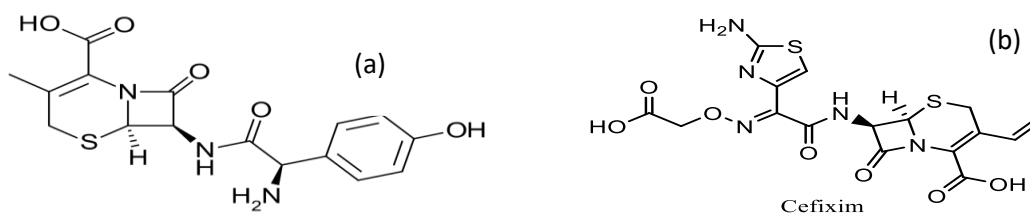
Các hoạt chất Cefadroxil là kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 1, có tác dụng

diệt khuẩn, ngăn cản sự phát triển và phân chia của vi khuẩn bằng cách ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn [1]. Công thức

cấu tạo của Cefadroxil, Cefixim như ở Hình 1.

Trong dược điển Việt Nam, các chất này được phân tích riêng rẽ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) detector tử ngoại (HPLC-UV) với cột tách là cột C18 gồm acetonitril – đệm photphat pH = 5,0 (tỷ lệ thể tích 4:96) khi phân tích Cefadroxil, hỗn hợp đệm photphat pH = 7,0 Acetonitril - dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd (250 : 750) khi phân tích Cefalexin [2]. Trong các đối tượng phức tạp hơn như mẫu sinh học, khi có mặt đồng thời các chất ở dạng lượng vết thì phương pháp LC/MS thường được dùng [3-5]. Ngoài các kỹ thuật phổ biến là HPLC, phương pháp điện hóa cũng có thể định lượng được riêng lẻ từng hoạt chất trong thuốc [6-8]. So với các phương

pháp trên, thì định lượng các hoạt chất kháng sinh trong thuốc bằng phổ hồng ngoại gần (NIR) có ưu điểm nổi trội, không phải xử lý mẫu, phân tích nhanh, giá thành rẻ và nếu kết hợp với thuật toán hồi qui đa biến thì không phải tách riêng các chất ra khỏi nền mẫu chứa tá dược và có thể phân tích đồng thời các hoạt chất trong cùng nhóm thuốc nên hiện là kỹ thuật đang được sử dụng nhiều để phân tích các hoạt chất trong thuốc [9-12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng phương pháp kiểm tra nhanh và đồng thời chất lượng thuốc viên nén chứa các hoạt chất Cefadroxil, Cefixim thuộc họ cephalosporin 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.



Hình 1. Công thức cấu tạo của Cefadroxil (a) và Cefixim (b)

Với một mô hình đường chuẩn đa biến được xây dựng từ bộ mẫu chuẩn rắn tự tạo chứa 2 hoạt chất và 4 tá dược, bằng thuật toán bình phương tối thiểu từng phần (PLS) sẽ cho phép định lượng được thuốc chứa 1 trong số 2 hoạt chất này đang lưu thông trên thị trường và đối chứng với phương pháp phân tích sắc ký lỏng HPLC.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị

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.

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

Phần mềm Matlab 7.6: Chương trình bình phương tối thiểu từng phần để phân tích đồng thời các cấu tử trong cùng hỗn hợp.

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

Bước 1: Chuẩn bị các mẫu chuẩn, mẫu kiểm tra chứa đồng thời các hoạt chất Cefadroxil, Cefixim và các tá dược với tỷ lệ thay đổi trong khoảng nồng độ trong vùng tuyến tính. Tiến hành trộn đều và nghiền mịn, đồng nhất hỗn hợp trong cối mã não khoảng 15 phút.

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

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

Bước 4: Đường chuẩn đa biến được xây dựng dựa trên ma trận độ hấp thụ quang của các mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra đã chuẩn bị ở phần trên. Nhập số liệu ma trận nồng độ các mẫu chuẩn, ma trận các mẫu kiểm tra và các ma trận tín hiệu đo tương ứng vào phần mềm Matlab, chạy chương trình tính toán ma trận hệ số hồi qui theo 2 phương pháp PLS và PCR trên phần mềm và sử dụng ma trận này để tìm nồng độ mỗi hoạt chất trong từng mẫu. So sánh sai số tương đối của mỗi phương pháp, lựa chọn ra phương pháp tối ưu

nhất để tiến hành định lượng các mẫu thực tế.

Bước 5: Tiến hành định lượng các mẫu thực tế bằng cách trộn một lượng bột viên với tá dược để pha loãng nồng độ hoạt chất về nồng độ nằm trong ma trận chuẩn đã xây dựng, đo phổ của các mẫu này, sử dụng phần mềm Matlab để tính toán kết quả. Tính hàm lượng hoạt chất theo công thức:

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

Trong đó: X: Khối lượng của hoạt chất tìm được từ mô hình hồi qui đa biến tuyến tính (mg); m_t : Khối lượng của mẫu thử (mg); m_{tb} : Khối lượng 1 viên thuốc (mg).

2.3. Phân tích đối chứng bằng HPLC

Tiến hành: Định lượng **Cefixim** và Cefadroxil bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao theo DDVN IV như sau:

Điều kiện sắc ký gồm có Cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), detector UV tại λ_{max} = 254 nm, tốc độ dòng 1,0 ml/ phút, thể tích tiêm 20 μ l. Pha động gồm có Acetonitril - dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd (250:750).

Chuẩn bị dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd bằng cách hòa tan 8,2 g tetrabutylamoni hydroxyd (TT) trong nước và pha loãng thành 800 ml với cùng dung môi; điều chỉnh tới pH = 6,5 bằng acid phosphoric loãng (TT) và pha loãng thành 1000 ml bằng nước.

Dung dịch chuẩn được pha bằng cách hòa tan một lượng Cefixim chuẩn trong dung dịch đệm phosphat pH = 7 có nồng độ khoảng 0,1 mg/ml. Với dung dịch thử, trước tiên, cân 20 viên, tính khối lượng

trung bình của viên đã loại bỏ lớp bao phim và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với khoảng 0,2 g Cefixim khan vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml dung dịch đệm phosphat pH = 7 và lắc siêu âm 15 phút. Pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat pH = 7 vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc. Hút chính xác 5,0 ml dịch lọc vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat pH = 7 vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Tiến hành chạy sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tính lượng hàm lượng Cefixim ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$) có trong chế phẩm dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn, hàm lượng của Cefixim chuẩn và các thông số liên quan.

Điều kiện sắc ký gồm có cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), detector UV tại $\lambda_{\text{max}} = 230$ nm, tốc độ dòng 1,5 ml/ phút, thể tích tiêm 10 μl . Pha động gồm có Acetonitril - đệm phosphat pH = 5 (4:96).

Dung dịch chuẩn được chuẩn bị bằng cách hòa tan một lượng Cefadroxil chuẩn trong đệm phosphat pH = 5, để có nồng độ khoảng 1,0 mg/ml.

Với dung dịch thử, trước tiên, cân 20 viên thuốc đã loại bỏ lớp bao phim, tính khối lượng trung bình, trộn đều, rồi nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với khoảng 100 mg Cefadroxil vào bình định mức 100 ml, thêm 75 ml đệm phosphat pH = 5 và lắc siêu âm 5 phút. Thêm dung dịch đệm trên đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc

0,45 μm . Tiến hành chạy sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Tính lượng hàm lượng Cefadroxil ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$) có trong chế phẩm dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ của dung dịch thử, dung dịch chuẩn, hàm lượng của Cefadroxil chuẩn và các thông số liên quan.

Công thức tính toán hàm lượng Cefixim, Cefadroxil (mg/ viên)

$$\text{HL (mg/viên)} = \frac{E_T}{E_S} \times \frac{m_S \times \text{HL}_S \times m_{tb}}{m_t}$$

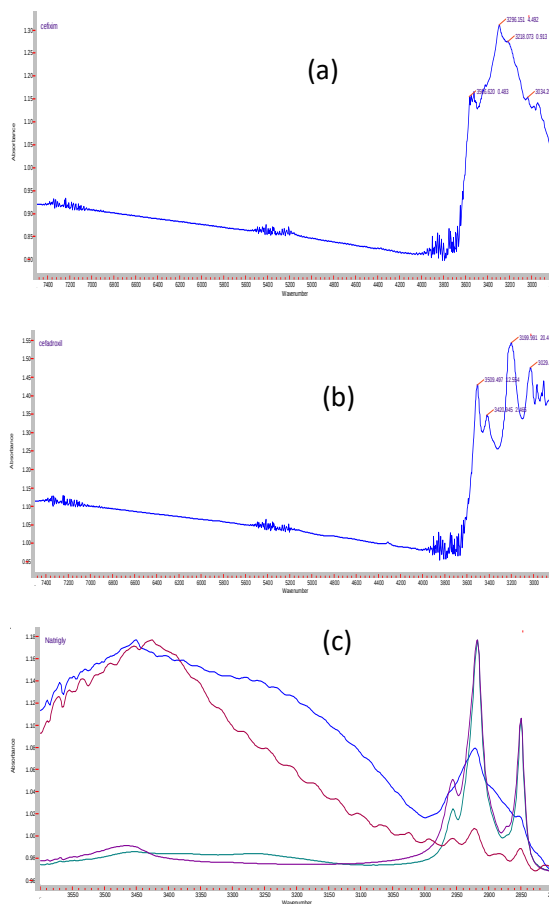
Trong đó: E_S , E_T : lần lượt là diện tích pic của dung dịch chuẩn, thử; m_S , m_t : lần lượt là khối lượng cân của chuẩn, của thử (mg); HL_S : hàm lượng nguyên trạng của Cefixim chuẩn (%); m_{tb} : khối lượng trung bình của một viên thuốc (mg).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

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

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



Hình 2. Phổ hấp thụ hồng ngoại của Cefixim(a), Cefadroxil(b) và các tá dược (c)

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

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

3.2. Xác định đồng thời cefadroxil, Cefixim sử dụng cùng mô hình PLS

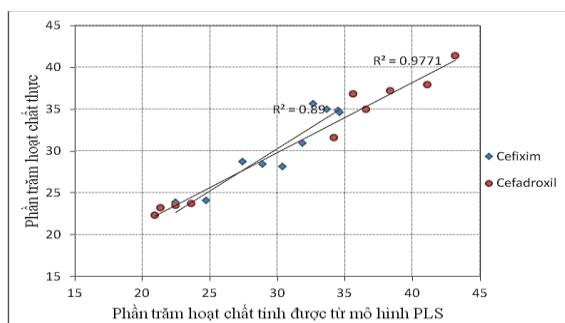
3.2.1. Xây dựng phương trình đường chuẩn đa biến

Phương trình đường chuẩn đa biến PLS xác định đồng thời Cefadroxil, Cefixim và tổng hàm lượng tá dược dựa trên ma trận hàm lượng của 22 mẫu chuẩn dạng bột chứa đồng thời Cefadroxil có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 8,45-73,65%; Cefixim có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 8,31-80,59% và tổng các tá dược là magie stearate, bột talc, natriglycolat starch, natrilaurysulfat có phần trăm khối lượng trong các mẫu trong khoảng từ 6,37-57,69%. Ma trận tín hiệu đo của 22 mẫu tại 417 số sóng là độ hấp thụ quang trong vùng phổ từ 3600-2800 cm^{-1} . Dùng câu lệnh tìm số cấu tử chính trong phần mềm Matlab thì thấy rằng PC = 4 chiếm 95% lượng thông tin của tập số liệu từ số PC = 4 trở đi lượng thông tin thu được thay đổi không đáng kể. Do đó có thể kết luận chỉ cần 4 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 4 để làm cơ sở tính toán hệ số hồi qui theo phương pháp PLS với không gian mới của tập số liệu và ma trận nồng độ đã xây dựng.

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

Một ma trận gồm 10 mẫu kiểm tra với hàm lượng các hoạt chất và tá dược biết trước nằm trong khoảng đường chuẩn đã xây dựng được dùng để kiểm chứng tính phù hợp của mô hình hồi quy. Hình 3 cho thấy có sự phù hợp rất tốt giữa hàm lượng

hai hoạt chất có trong mẫu tự tạo (synthesis (S)) với hàm lượng hai hoạt chất tìm lại được ((F)) bằng mô hình. Các giá trị sai số mắc phải chỉ từ 0,58-8,48%. 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.



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

Bảng 1. Kết quả phân tích Cefixim và Cefadroxil trong các mẫu thuốc viên

Ký hiệu mẫu	Tên thuốc	Nhà sản xuất	Lô sản xuất	Hàm lượng hoạt chất (mg/viên)	
				PP NIR	PP đối chứng HPLC
CFD	Cefadroxil 500 mg	CTCP Dược phẩm TW2- Dopharma	V1055-H12-05	500,52 ± 1,69	511,53 ± 0,62
CFX	Cefixim 200mg	CTCP Dược phẩm TW2- Dopharma	VNA-3485-05	195,85 ± 2,19	196,22 ± 0,21

Các kết quả thu được cho thấy hàm lượng các hoạt chất thu được theo phương pháp NIR-PLS so với phương pháp đối chứng HPLC có sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Độ chênh tương đối 2 hoạt chất phân tích với giá trị xác định theo phương pháp đối chứng HPLC đều dưới 15%.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành xây dựng mô hình hồi qui PLS xác định đồng

3.3. Ứng dụng phân tích mẫu thuốc viên

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

thời các hoạt chất nghiên cứu trong cùng hỗn hợp khi có mặt các tá dược, các kết quả sai số thu được từ các mô hình trên phần lớn có sai số $\leq 15\%$ (có sai số nằm trong giới hạn cho phép). Mặt khác có thể ứng dụng mô hình hồi qui tuyến tính PLS kết hợp với phương pháp phổ hồng ngoại gần để xác định nhanh các mẫu thuốc thực tế đang lưu hành trên thị trường hiện nay, với độ chệnh của phương pháp nghiên cứu hoạt chất Cefadroxil theo

phương pháp phổ hồng ngoại gần so với phương pháp đối chứng là 5,5%; Độ chệch của hàm lượng Cefixim khi định lượng bằng phương pháp phổ hồng ngoại gần so với phương pháp đối chứng là: 2,0%. Độ chệch khi phân tích các mẫu là tương đối nhỏ và dao động trong vùng sai số cho phép của phép đo. Do đó có thể dùng mô hình này để định lượng nhanh các mẫu thuốc thực tế mà không phải xử lý mẫu thành dung dịch.

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-NDT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, “Dược lý học”, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, (2009).
2. Bộ Y Tế, “Dược điển Việt Nam”, tái bản lần thứ 4, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, (2009).
3. C. Huang, W. Wang, L. Miao, “Determination of Cefaclor by UPLC–MS-MS for a Chinese Pharmacokinetic Study”, *Journal of Chromatographic Science*, 52(7), 636-40 (2014).
4. W. J. Blanchflower, S. A. Hewitt, D. G. Kennedy, "Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry", *Analyst*, 119(12), 2595-2601 (1994).
5. J. A. McAteer, M. F. Hiltke, B. M. Silber, R. D. Faulkner, “Liquid-chromatographic determination of five orally active cephalosporins-Cefixime, cefaclor, Cefadroxil, cephalixin, and cephradine-in human serum”, *Clin. Chem.*, 33(10), 1788-1790 (1987).
6. A. H. Alghamdi, F. A. A. Alghamdi, M. A. Alomar, "Study of Stripping Voltammetric Behaviour of Cefadroxil Antibiotic in the Presence of Cu (II) and its Determination in Pharmaceutical Formulation”, *Port. Electrochim. Acta*, 27(6) (2009).
7. L. N. C. Rodrigues, M. V. B. Zanoni A. G. Fogg, “Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Cefaclor in Pharmaceutical Formulations”, *Analytical Letters*, 32, 97-109 (1999).
8. L. N. C. Rodrigues , M. V. B. Zanoni, A. G. Fogg, “Indirect polarographic and cathodic stripping voltammetric determination of cefaclor as an alkaline degradation product”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21, 497–505 (1999).
9. Y. Y. Li, “Spectral ranges of near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of cefazolin sodium and the construction of a quantitative model for the determination of cefazolin sodium content in different crystal forms”, *Science China Chemistry*, 56, 789-798 (2013).
10. A. P. Argekar, S. V. Ra, S. U. Kapadia, “Simultaneous Determination of

Cephalexin and Carbocisteine from Capsules by Reverse Phase High Performan Liquid Chromatography (RP-HPLC)”, *Analytical Letters*, 30(4), 821-831 (1997).

11. Đoàn Thị Huyền, Tạ Thị Thảo, Bùi Xuân Thành, Vũ Thị Huệ, “Nghiên cứu phát triển phương pháp quang phổ hồng ngoại gần định lượng nhanh chất Sulfaguanidin trong thuốc viên nén”, *Tạp*

chí Phân tích Hóa lý và Sinh học, 21, 153-162 (2016).

12. Tạ Thị Thảo, Bùi Xuân Thành, Vũ Thị Huệ, Đoàn Thị Huyền, “Định lượng đồng thời Sulfaguanidin, Sulfamethoxazol và Trimethoprim trong thuốc viên nén sử dụng cùng mô hình hồi quy cấu tử chính (PCR) từ dữ liệu phổ hồng ngoại gần”, *Tạp chí Phân tích Hóa lý và Sinh học*, 21, 127-134 (2016).