

# PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG SIÊU HIỆU NĂNG ĐẦU DÒ DIOD ARRAY TỬ NGOẠI ĐỂ XÁC ĐỊNH CEFALEXIN TRONG NƯỚC THẢI

*ThS. Nguyễn Huy Hoài<sup>1</sup>  
PGS. TS. Nguyễn Văn Hợp<sup>2</sup>  
TS. Trần Vĩnh Thiện<sup>3</sup>*

## TÓM TẮT

*Phương pháp sắc ký lỏng nhanh siêu hiệu năng (UPLC), sử dụng đầu dò diod array tử ngoại (UV-PDA) đã được phát triển và đánh giá để xác định cefalexin trong nước thải. Quá trình phân tích được thực hiện trên hệ thống ACQUITY UPLC với cột Cortecs-C18, hệ pha động Methanol - Acetonitril - kali dihydrogen orthophosphate 13,6 g/L - nước cất (2:5:10:83), tốc độ dòng 0,3 ml/phút với đầu dò UV-PDA. Kết quả đánh giá cho thấy phương pháp đạt các yêu cầu về tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ nhạy, tính tuyến tính và độ đúng.*

**Từ khóa:** HPLC, UPLC, MS, FDA, Cefalexin

### 1. Đặt vấn đề

Sự hiện diện ngày càng nhiều của dược chất (API) trong môi trường đã trở thành mối quan tâm do khả năng gây tác động sinh thái không mong muốn [1], là một trong những nguy cơ gây ra những bệnh như ung thư, rối loạn sinh trưởng. Đặc biệt là các chất kháng sinh tồn tại trong môi trường kích thích sự phát triển của các vi sinh vật kháng thuốc. Khi các vi sinh vật kháng thuốc lây nhiễm sang người làm tăng nguy cơ tử vong vì chúng làm giảm hiệu lực của thuốc kháng sinh (Antibiotics) [2].

Trong các thuốc kháng sinh, cefalexin là một trong những thuốc sử dụng khá phổ biến, được chỉ định trong điều trị nhiễm khuẩn đường hô hấp, nhiễm trùng đường tiêu, nhiễm khuẩn da [3]... Hiện nay, rất nhiều chế phẩm chứa cefalexin đã được Cục Quản lý Dược – Bộ Y tế Việt Nam cấp giấy phép sản xuất và lưu hành.

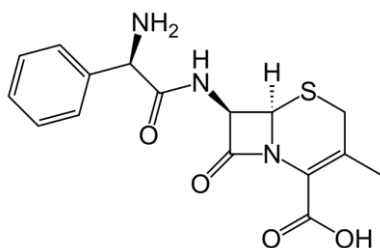
Theo Dược Điển Anh (British Pharmacopoeia 2015), Dược Điển Mỹ (United States Pharmacopoeia 36) thì cefalexin được định lượng trong các dạng chế phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đầu dò tử ngoại khả kiến (UV-VIS) [4,5]. Tuy nhiên, khi phân tích chất ở nồng độ rất thấp “vết” thì phương pháp HPLC/UV-VIS thường không phù hợp do kém nhạy. Hiện nay với sự phát triển kỹ thuật sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) với đầu dò UV-PDA, nhược điểm nêu trên đã được khắc phục [6].

Vì vậy mục đích của đề tài là cải tiến và chuẩn hóa phương pháp UPLC/UV-PDA dựa trên phương pháp HPLC sao cho hội tụ các yêu tố: phân tích nhanh, ít tiêu tốn dung môi, đủ nhạy để xác định vết cefalexin trong nước thải.

<sup>1</sup>Công ty Cổ phần PYMEPHARCO Phú Yên

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Huế

<sup>3</sup> Trường Đại học Phú Yên



Hình 1. Công thức cấu tạo cefalexin

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Vật liệu

**Bảng 1.** Thông tin chất chuẩn

Chuẩn	Nguồn gốc	Số lô	Hàm lượng (%)	Hàm ẩm
Cefalexin	Viện kiểm nghiệm TP.Hồ Chí Minh	QT006 130615	99,27	6,8

Các trang thiết bị được sử dụng gồm: Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ACQUITY UPLC-Mỹ với đầu dò

### 2.2. Phương pháp phân tích

#### Điều kiện sắc ký

Dựa trên điều kiện sắc ký do HPLC đã được đề cập trong Dược điển [4], nhóm nghiên cứu đã thay đổi thông số tốc độ dòng, cột, bước sóng để phù hợp với hệ thống UPLC với điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: Cortecs; C18 (2,7, 4,6 mm x 100 mm)

- Detector UV (PDA): bước sóng 264 nm

- Thể tích tiêm mẫu: 10  $\mu$ l

- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút.

Mẫu nước thải được thu gom từ nhà máy sản xuất cefalexin. Các hóa chất được sử dụng bao gồm: Kali dihydrogen orthophosphate (tinh khiết phân tích), Methanol HPLC (tinh khiết sắc ký), Acetonitril HPLC (tinh khiết sắc ký), nước cất 2 lần. Chất chuẩn: Cefalexin có thông tin như ở bảng 1

(detector) PDA UV-VIS, phần mềm xử lý phổ Empower 3

- Pha động: Methanol - Acetonitril - kali dihydrogen orthophosphate 13,6 g/L - nước cất (2:5:10:83), lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m và đuổi khí.

#### Chuẩn bị

Dãy dung dịch cefalexin chuẩn: Hòa tan chất chuẩn cefalexin trong nước cất và pha loãng với nước cất để được dãy dung dịch chuẩn khoảng 3  $\mu$ g/L- đến 60  $\mu$ g/L.

Dung dịch thử: Lấy 50 ml nước thải, ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút, thu lấy lớp dung dịch trong, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.

#### Tính toán kết quả

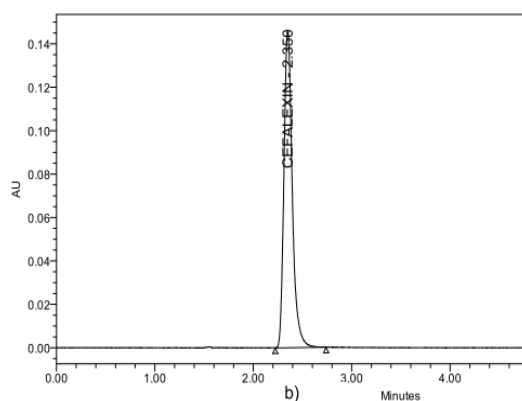
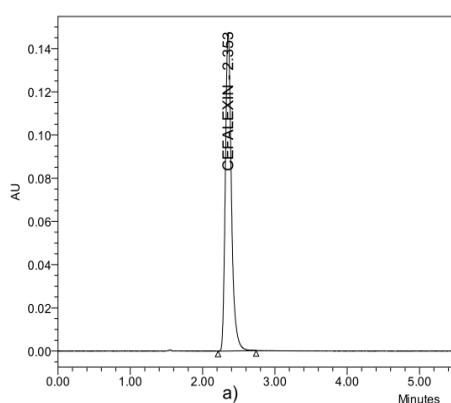
Triển khai sắc ký đồ dãy dung dịch chuẩn, dung dịch thử, xác định lượng cefalexin trong mẫu nước thải bằng phương pháp đường chuẩn dựa trên diện tích đỉnh chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử và đường tuyến tính mô tả sự phụ thuộc giữa diện tích đỉnh/peak và nồng độ cefalexin chuẩn.

### 2.3. Đánh giá chất lượng phương pháp [7]

Chất lượng của phương pháp phân tích được đánh giá bằng tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng (bằng cách phân tích mẫu thêm chuẩn – spiked sample), tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 để xác định giá trị trung bình, độ lệch, thiết lập đường tuyến tính, hệ số tương quan.

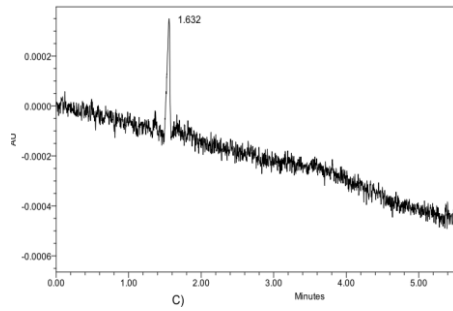
## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Tính đặc hiệu

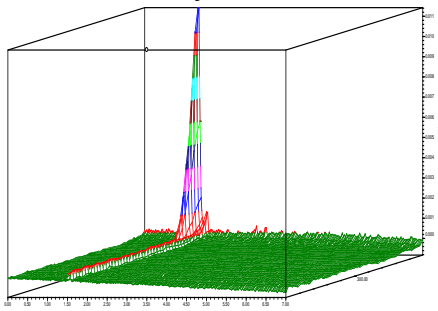


Tính đặc hiệu của phương pháp phân tích được thực hiện bằng cách triển khai sắc ký đồ bằng đầu dò diode array tử ngoại 3 chiều (3D) đồng thời 3 thông số; thời gian lưu đỉnh (RT), bước sóng từ 200-400 nm để đánh giá sự ảnh hưởng điều kiện sắc ký và đỉnh phụ lên chất cần phân tích-cefalexin.

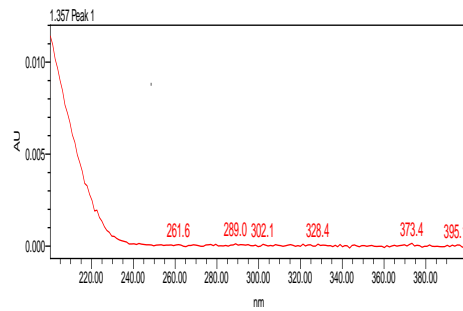
Dựa trên sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu thử (nước thải) và chuẩn cefalexin ở hình 2. nhận thấy; RT (thời gian lưu đỉnh) mẫu trắng không trùng với RT thử (khoảng 2,353 phút) và chuẩn (khoảng 2,350 phút), RT thử tương đương với RT cefalexin chuẩn. Hơn nữa, khi phân tích phổ UV của mẫu trắng (hình 3) không có đỉnh hấp thụ trùng với cực đại hấp thụ mẫu thử (hình 4) và cực đại hấp thụ mẫu thử phù hợp với cực đại hấp thụ chuẩn (264nm) (hình 5). Như vậy, phương pháp phân tích đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.



**Hình 2.** Sắc ký đồ mẫu nước thải (a), chuẩn cefalexin (b), mẫu trắng (c)

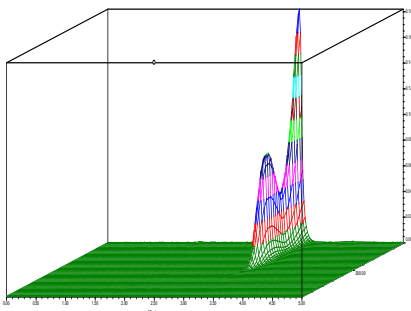


a)

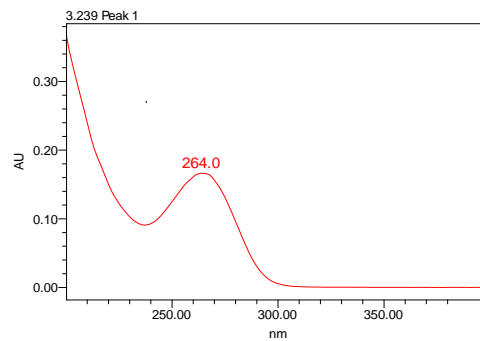


b)

**Hình 3.** Sắc ký đồ 3 chiều (a) và phổ UV (b) của mẫu trắng

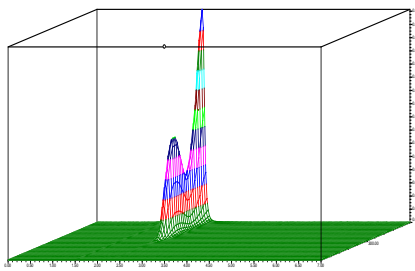


a)

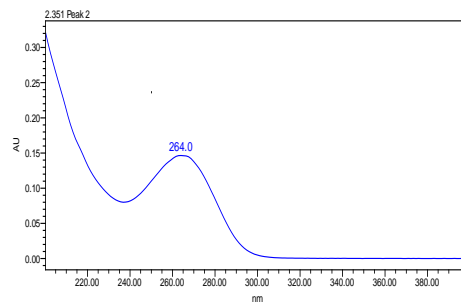


b)

**Hình 4.** Sắc ký đồ 3 chiều (a) và phổ UV (b) của mẫu thử



a)



b)

**Hình 5.** Sắc ký đồ 3 chiều (a) và phổ UV (b) của chuẩn cefalexin

### 3.2. Độ lặp lại

Để xác định độ lặp lại của phương pháp phân tích, tiến hành phân tích lặp lại 6 lần mẫu thử - nước thải rồi tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) :

$$RSD(\%) = \frac{SD \times 100}{X_{tb}} \quad (1)$$

**Bảng 3.** Kết quả xác định độ lặp lại của phương pháp phân tích

Lần đo	Nồng độ cefalexin ( $\mu\text{g/L}$ )
1	5,2
2	6,1
3	5,5
4	5,0
5	5,3
6	5,8
$X_{tb}$	5,5
SD	0,4
RSD (%)	7,0
$\frac{1}{2}RSDH$ (%)	17,5

Theo Horwitz [8], sai số giữa các phòng thí nghiệm (đánh giá qua độ lệch chuẩn tương đối – RSD) khi phân tích nồng độ C nếu đạt được RSD nhỏ hơn  $RSD_H$  (độ lệch chuẩn tương đối, tính theo phương trình Horwitz (2)) là chấp nhận được.

$$RSD(\%) = 2^{1-0,5\lg C} \quad (2)$$

Trong đó, C là nồng độ chất phân tích được biểu diễn bằng phân số;

$$\text{Với } C = 5,6 \times 10^{-9} \rightarrow$$

$$RSD_H = 35 \%$$

Khi xác định nồng độ C trong nội bộ một phòng thí nghiệm, thì RSD nhỏ hơn  $\frac{1}{2}RSD_H$  xác định theo phương trình (2) là chấp nhận được. Như vậy,

Trong đó, SD là độ lệch chuẩn của các kết quả phân tích  $x_1, x_2, \dots, x_6$  ( $n = 6$ );  $X_{tb}$  là trung bình số học của các kết quả phân tích ( $n = 6$ ).

Tiến hành phân tích lặp lại 6 lần mẫu nước thải có chứa cefalexin, kết quả xác định độ lặp lại được nêu ở bảng 3.

theo kết quả xác định và tính toán ở bảng 3 cho thấy, phương pháp phân tích đã đạt được độ lặp lại theo yêu cầu quốc tế.

### 3.3. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp phân tích được đánh giá qua độ thu hồi (Recovery/Rev), bằng cách phân tích mẫu thêm chuẩn:

$$Rev(\%) = \frac{X_2 - X_0}{X_1} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó,  $X_0$  là nồng độ chất phân tích trong mẫu;  $X_1$  là nồng độ chất chuẩn thêm vào mẫu;  $X_2$  là nồng độ xác định được trong mẫu đã thêm chuẩn. Kết quả xác định độ đúng của phương

pháp phân tích cefalexin được nêu ở bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả xác định độ đúng của phương pháp phân tích vết cefalexin

Lần đo	$X_0^{(*)}$	$X_1$	$X_2$	Rev (%)
1	5,4	5,0	9,4	79,8
2	5,4	5,0	9,9	89,8
3	5,4	5,0	9,8	87,2
$X_{tb}$				<b>85,6</b>

Theo quy định số 2002/657/EC của Ủy ban Châu Âu (EU) [9], khi phân tích những nồng độ trong mẫu cỡ 1 ppm – 10 ppm, nếu đạt được độ thu hồi từ 70 – 110% là đạt yêu cầu. Như vậy, có thể cho rằng, phương pháp phân tích đạt được độ đúng tốt khi phân tích cefalexin.

### 3.4. Tính tuyến tính

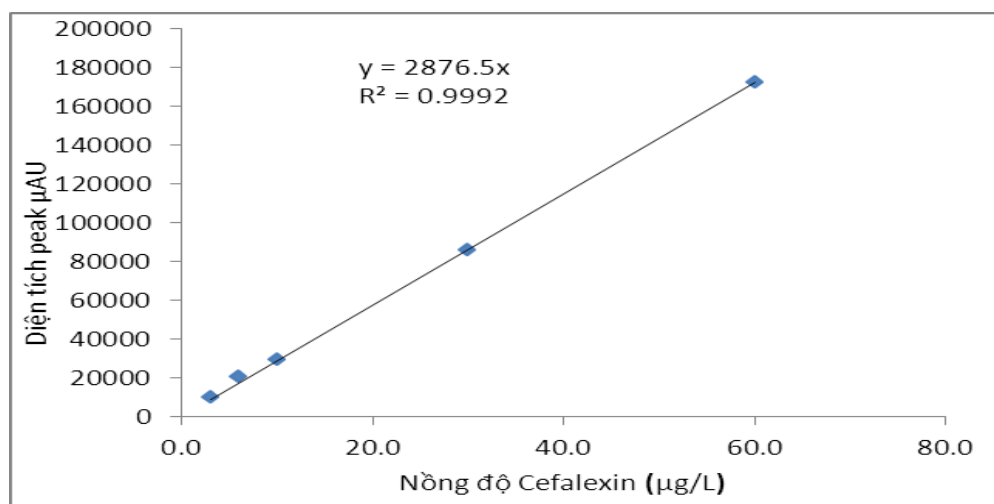
Pha các dung dịch cefalexin có nồng độ  $x_i$  trong khoảng 3  $\mu\text{g/L}$ - đến 60  $\mu\text{g/L}$ . Đo tín hiệu diện tích đỉnh/peak bằng phân tích sắc ký thu được các giá trị  $y_i$  tương ứng.

**Bảng 5.** Diện tích đỉnh (peak) sắc ký tương ứng với các nồng độ cefalexin

STT	Nồng độ cefalexin ( $\mu\text{g/L}$ )	Diện tích đỉnh ( $\mu\text{Au.min}$ )
1	3,0	10097
2	6,0	20551
3	10,0	29561
4	30,0	85990
5	60,0	172250

Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính  $y = ax + b$  sự phụ thuộc giữa diện tích đỉnh và nồng độ của cefalexin bằng cách xác định hệ số góc (a), hằng số (b), hệ số tương quan ( $R^2$ ), kết quả được trình bày ở bảng 5 và hình 6. Kết

quả cho thấy quy trình phân tích đạt độ tuyến tính tốt với phương trình hồi quy  $y = 2876,5x$  có  $R^2 = 0,9992 > 0,99$ , đạt yêu cầu theo hướng dẫn của Hiệp hội các nhà khoa học phân tích Mỹ (AOAC) [9]



**Hình 6.** Phương trình đường chuẩn của cefalexin

### 3.5. Giới hạn phát hiện (LOQ) và giới hạn định lượng (LOD)

Dựa trên dữ liệu của phép thử tuyến tính, xác định LOD và LOQ theo công thức:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times s}{a} \quad (4) \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times s}{a} \quad (5)$$

Trong đó:  $s$  là số dư độ lệch chuẩn,  $a$  là hệ số góc của đường hồi quy tuyến tính ( $y = ax + b$ ) giữa nồng độ và diện tích đỉnh.

Với quả thu được:  $\text{LOQ}_{\text{cefalexin}} = 1,3 \mu\text{g/L}$ ,  $\text{LOQ}_{\text{cefalexin}} = 4,2 \mu\text{g/L}$ .

**Bảng 6.** So sánh các phương pháp sắc ký phân tích cefalexin trong nước thải

Thông số	HPLC-UV (*)	UPLC/UV-PDA
Cột sắc ký	Xterra; C18 (5,0 $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm)	<b>Cortecs</b> ; C18 (2,7 $\mu\text{m}$ , 4,6 x 100 mm)
Áp suất (psi)	2000	6000
Thời gian phân tích (phút)	5,6	2,3
Lượng pha động tiêu tốn (ml)/lần phân tích	500	100
Tín hiệu thu nhận	Sắc ký đồ đơn bước sóng	Sắc ký đồ đa bước sóng và cả phổ UV-VIS
LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	20	1,3

Phương pháp là đủ nhạy để kiểm vết cefalexin trong nước thải [10].

### 3.6. So sánh giữa phương pháp UPLC/UV-FDA và HPLC-UV

Sự kết hợp của cột kích thước nhỏ-rỗng (Cortecs) với kỹ thuật sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò PDA để phân tích cefalexin trong nước thải cho thấy phương pháp UPLC/UV-FDA có nhiều ưu điểm như: độ nhạy cao, giảm thời gian phân tích mẫu và có thể thu nhận được tín hiệu đa bước sóng..., Kết quả so sánh được mô tả ở bảng 6.

\*Ghi chú: Kết quả nghiên cứu chi tiết của phương pháp phân tích HPLC-UV đã được trình bày ở nghiên cứu khác [11].

#### 4. Kết luận

Phương pháp UPLC đầu dò UV-PDA đã được phát triển và chuẩn hóa

dùng để định danh và định lượng dư lượng cefalexin trong nước thải. Chất lượng của phương pháp đã được đánh giá đạt yêu cầu quốc tế về tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ nhạy, tính tuyến tính và độ đúng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Irena Branowska (2011), *Using HPLC Method with DAD Detection for the Simultaneous Determination of 15 Drugs in Surface Water and Wastewater*, Polish Journal of Environmental Studies; Vol. 20 Issue 1, Pages 21
2. Jhon F. NARVAEZ V (2012), *Pharmaceutical Products in the Environment: Sources, Effects And Risks*, Vol 19, no.1
3. Dược Thư Quốc Gia (2012)
4. Dược Điển Mỹ 36 (2014)
5. Dược Điển Anh (2015)
6. Angela L. Batt (2008), *Analysis of Ecologically Relevant Pharmaceuticals in Wastewater and Surface Water Using Selective Solid-Phase Extraction and UPLC-MS/MS*, Analytical Chemistry 80 (13), pp 5021-5030
7. J.C. Miller and J.N. Miller (1988), *Statistics for Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2nd Edition
8. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (December 12, 2002)
9. Jared Anderson (2015), *Analytical Separation Science*, Wiley -VCH, December
10. Johan Bengtsson-Palme, *Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation*, Environment International, Volume 86, January 2016, Pages 140-149
11. Nguyễn Huy Hoài (2012), *Xác định dư lượng kháng sinh nhóm Beta-lactam trong trong nhà máy sản xuất dược phẩm (đề tài cơ sở)*, Công ty cổ phần PYMEPHARCO



**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD WITH PDA DETECTOR FOR DETERMINATION OF CEFALEXIN IN WASTE WATER****ABSTRACT**

*A rapid Ultra Performance Liquid Chromatography method has been developed and validated for the determination of cefalexin in waste water. Chromatography was performed by ACQUITY UPLC with Cortecs-C18 column using a mobile phase comprising methanol R, acetonitrile R, a 13.6 g/l solution of potassium dihydrogen phosphate R, water R (2:5:10:83 V/V/V/V), at a flow rate 0,3 ml/min and a UV-PDA detector. Method validation investigated parameters such as the specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy, giving results within the acceptable range.*

**Key words:** HPLC, UPLC, MS, FDA, Cefalexin