XÁC ĐỊNH CEFALEXIN TRONG NƯỚC THẢI BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG SIÊU HIỆU NĂNG VỚI DETECTOR PHOTODIOIDE ARRAY

DETERMINATION OF CEFALEXIN IN WASTEWATER BY ULTRA-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PHOTODIODE ARRAY DETECTOR

Nguyễn Huy Hoài, Nguyễn Văn Hợp
Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Ngày tòa soạn nhận bài 28/3/2016, ngày phản biện đánh giá 25/5/2016, ngày chấp nhận đăng 15/6/2016

TÓM TẮT

Phương pháp sắc ký lỏng nhanh siêu hiệu năng đã được xây dựng để xác định Cefalexin trong nước thải. Quá trình phân tích được tiến hành 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), lưu lượng dòng 0,3 ml/phút với đầu dò UV-PDA. Kết quả đánh giá cho thấy, phương pháp phân tích đạt các yêu cầu tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ nhạy, tính tuyến tính và độ đúng. Nồng độ cefalexin tuyến tính trong khoảng từ 4 - 60 µg/L. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) lần lượt là 1,2 µg/L và 4,0 µg/L. Từ kết quả nghiên cứu, phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng có thể ứng dụng để xác định cefalexin trong nước thải ở nồng độ thấp (µg/L).

Từ khóa: *Sắc ký lỏng siêu hiệu năng; cefalexin; nước thải; đầu dò diod array tử ngoại; pha đảo.*

ABSTRACT

The Ultra Performance Liquid Chromatography method has been developed for the determination of cefalexin in wastewater samples. The chromatography was performed by ACQUITY UPLC with Cortecs-C18 column using a mobile phase containing the mixture of methanol R, acetonitrile R, 13.6 g/l solution of potassium dihydrogen phosphate R and water R in the ratio of 2:5:10:83 (v/v), at a flow rate 0,3 ml/min and a UV-PDA detector. The statistical data analysis of the method such as the specificity, sensitivity, linearity, precision, accuracy, giving results within the acceptable range. Linearity for cefalexin concentrations was established in the range of 4 - 60 µg/L. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) were found to be 1.2 µg/L and 4.0 µg/L, respectively. The method has showed the advantages of the Ultra Performance Liquid Chromatography for determination of cefalexin in wastewater at very low concentration levels (µg/L).

Keywords: *Ultra-Performance Liquid Chromatography; cefalexin; wastewater;UV-PDA detector, reversed phase.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự hiện diện ngày càng nhiều của nhiều dược chất (API/active pharmaceutical ingredient) trong môi trường đã gây lo lắng về các tác động bất lợi của chúng đến sức khỏe và các hệ sinh thái [1]: có thể gây ung thư, rối loạn sinh trưởng của sinh vật, kích thích sự phát triển của các vi sinh vật kháng thuốc.

Trong các API thuộc nhóm kháng sinh (Antibiotics), cefalexin là một trong những chất được sử dụng khá phổ biến, như chỉ định trong điều trị nhiễm khuẩn đường hô hấp, chống nhiễm trùng đường tiểu, nhiễm khuẩn da [2]. 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. Tuy nhiên, trong quá trình sản xuất, sử dụng và tiêu huỷ, dư lượng cefalexin có trong nước thải và lan tryền trong môi trường làm ảnh hưởng đến sức khỏe con người [3] .

Dược điển Anh (BP2015), Dược Điển Mỹ (United States Pharmacopeia 36) [4], [5] chỉ đưa ra quy trình phân tích cefalexin trong dược phẩm (sản phẩm thuốc) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò tử ngoại (UV). Song, nồng độ cefalexin trong nước thải rất thấp, thường ở mức siêu vết (< ppb hay µg/L) thì phương pháp trên tỏ ra không hiệu quả [6], Để khắc phục nhược điểm này chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xác định cefalexin trong nước thải bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC–Ultra-Performance Liquid Chromatography) với đầu dò (detector) photodiod array tử ngoại (UV-PDA) và định lượng bằng phương pháp đường chuẩn.

2. PHƯƠNG PHÁP – THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thuốc thử, thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ACQUITY UPLC (Mỹ) với đầu dò (detector) PDA UV-VIS, phần mềm xử lý phổ Empower 3, phần mềm ACQUITY columns Calculator của Waters, cột tách Cortecs C18 (Mỹ), cột chiết pha rắn Oasis HLB cartridges – Oasis (200 mg, 6 mL).

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), Na_2EDTA (tinh khiết phân tích), Acid formic (tinh khiết phân tích), Methanol HPLC (tinh khiết sắc ký), Acetonitril HPLC (tinh khiết sắc ký), nước cất 2 lần. Chất chuẩn Cefalexin (Viện kiểm nghiệm TP.Hồ Chí Minh).

2.2. Phương pháp thực nghiệm

2.2.1. Kỹ thuật UPLC

Kỹ thuật UPLC sử dụng cột tách thước hạt nhỏ và áp suất hệ thống cao để tăng độ nhạy, tăng độ phân giải, giảm thời gian phân tích. Trong nghiên cứu này sử dụng cột tách Cortecs; chất nhồi cột octadeclsilyl silica (ODS/C18), kỹ thuật tạo hạt lõi rắn).

2.2.2. Xác định điều kiện sắc ký

Do cefalexin có đặc điểm cấu tạo phân tử chứa nhóm carbonxylic, cho nên phân tử cefalexin phân cực và tan trong nước. Chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký pha đảo (Reversed Phase/RP) dùng để phân tích cefalexin đã được công bố trong Dược điển [4]. Tuy nhiên, các điều kiện sắc ký được công bố chỉ phù hợp cho hệ thống HPLC, vì vậy cần phải chuyển đổi để thích hợp cho phương pháp UPLC bằng phần mềm ACQUITY columns Calculator của Hãng Waters - phần mềm dùng chuyển đổi điều kiện HPLC sang UPLC.

2.2.3. Quy trình phân tích

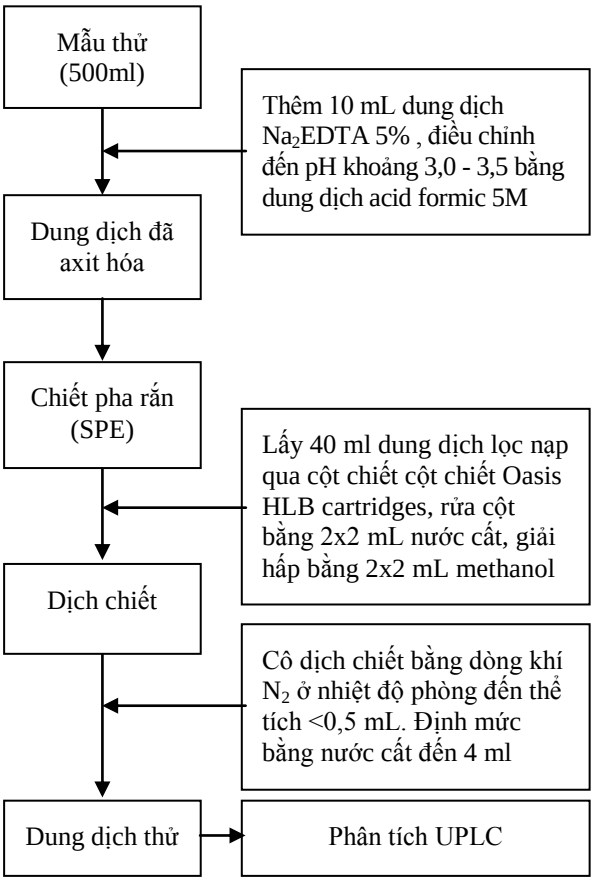
Lấy mẫu: Mẫu nước thải được lấy theo quy định của Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4556:1988: Mẫu được đựng trong chai thủy tinh sạch, kín, tránh sáng và được bảo quản ở nhiệt độ 4^oC trước khi phân tích (không quá 24 giờ kể từ khi lấy mẫu);

Dãy dung dịch cefalexin chuẩn: Hòa tan cefalexin chuẩn trong nước cất và pha loãng bằng nước cất để được dãy nồng độ dung dịch chuẩn từ 4 µg/L- đến 60 µg/L.

Mẫu trắng (blank) hay mẫu nền: Là mẫu nước cất, xử lý và phân tích tương tự với mẫu nước thải.

Chiết pha rắn (SPE): Hoạt hóa cột chiết pha rắn Oasis HLB cartridges lần lượt bằng 4 mL methanol và 4 ml nước cất, tốc độ nạp dung dịch qua cột không quá 3 mL/phút. [7].

Xử lý mẫu: Mẫu thử và chuẩn được lọc qua màng lọc 0,45 µm và tiến hành xử lý và phân tích theo như quy trình ở hình 1.



Hình 1. *Quy trình xử lý mẫu và phân tích cefalexin trong nước thải*

2.2.4. Tính toán kết quả

Dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính dạng y = ax + b để tính nồng độ cephalexin có trong nước thải C (µg/L) theo công thức:

$$C = \frac{Y - b}{a} \quad (1)$$

Trong đó, y; tín hiệu đo (diện tích đỉnh/peak) của cefalexin chuẩn, x (µg/L); nồng độ Cefalexin chuẩn, a; hệ số góc, b; đoạn cắt trên trục tung. Y; tín hiệu đo của mẫu nước thải.

2.3. Kiểm soát chất lượng của phương pháp [8]

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), khoảng 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. Xác định điều kiện UPLC

Dựa trên điều kiện sắc ký HPLC đã được công bố trong Dược điển, bằng phần ACQUITY UPLC columns Calculator chuyển để đổi điều kiện thích hợp cho hệ thống UPLC, kết quả được mô tả ở bảng 2.

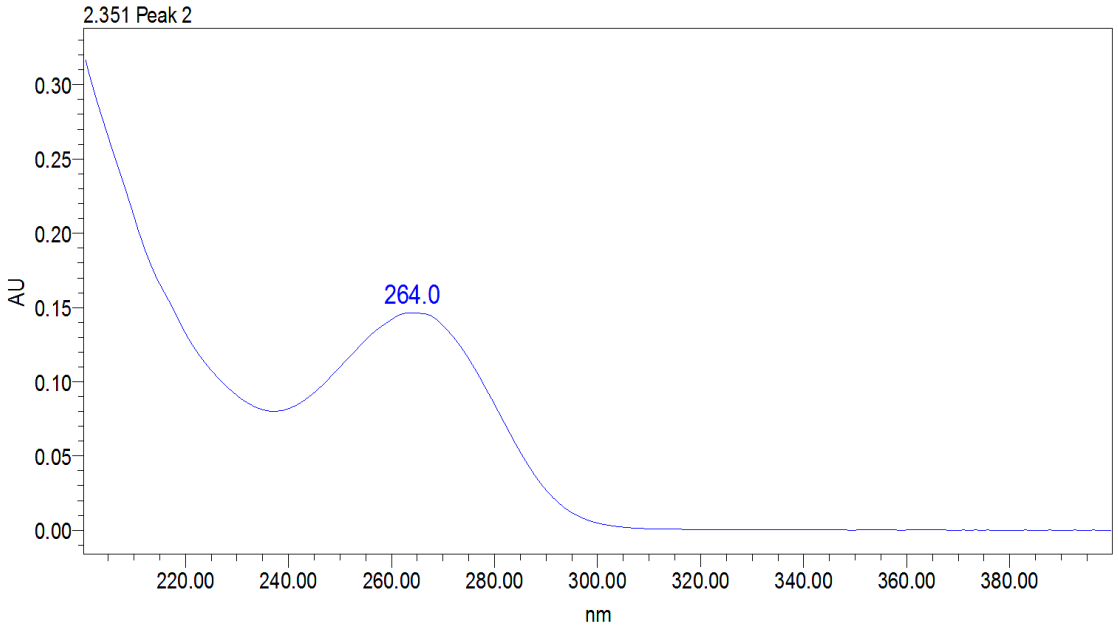
Bảng 2. *Kết quả chuyển đổi điều kiện HPLC sang điều kiện UPLC*

Thông số	Hệ thống HPLC-UV	Hệ thống UPLC/UV-PDA
Cột phân tách	Xterra : pha đảo với chất nhồi C18; 4,6 mm x 250 mm,5µm).	Cortecs: pha đảo với chất nhồi C18; 4,6 mm x 100 mm,2,7µm)
Thể tích tiêm mẫu	20 µl	10 µl
Pha động	Methanol – Acetonitril -Kali dihydrogen orthophosphate 13,6 g/L-Nước cất (2:5:10:83)	Methanol-Acetonitril-Kali dihydrogen orthophosphate 13,6 g/L-Nước cất (2:5:10:83)
Lưu lượng dòng	1,5 mL/phút	0,3 mL/phút

3.2. Khảo sát điều kiện đo

Điều kiện đo được khảo sát bằng cách phân tích sắc ký mẫu trắng, cephalexin chuẩn bằng đầu dò diod array tử ngoại đồng thời 3 thông số; thời gian lưu đỉnh (RT), bước sóng

từ 200-400 nm với các điều kiện UPLC đã được nêu ở bảng 1. Kết quả khảo sát cho thấy phổ hấp thụ phân tử (UV) của cephalexin chuẩn có một đỉnh cực đại hấp thụ ở bước sóng (λ) 264 nm (hình 2) và mẫu trắng không có đỉnh hấp thụ trùng với cực đại hấp thụ chuẩn. Vì vậy, bước sóng được chọn để đo là 264 nm, Bước sóng này khác với thông báo trong phương pháp Dược điển (254 nm) [4].



***Hình 2**. Phổ UV của cefalexin chuẩn*

3.3. Kiểm soát chất lượng phương pháp

3.3.1. Tính đặc hiệu và độ ổn định hệ thống

Tính đặc hiệu của phương pháp phân tích được đánh giá bằng sự ảnh hưởng nền mẫu lên chất cần phân tích-cefalexin. Kết quả cho thấy mẫu trắng (nền mẫu) không có đỉnh ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu cefalexin (2,353 phút). Như vậy, phương pháp phân tích đạt tính đặc hiệu.

Độ ổn định hệ thống được thực hiện bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn vào hệ thống UPLC, kết quả ở bảng 3.

***Bảng 3**. Kết quả xác định độ ổn định hệ thống*

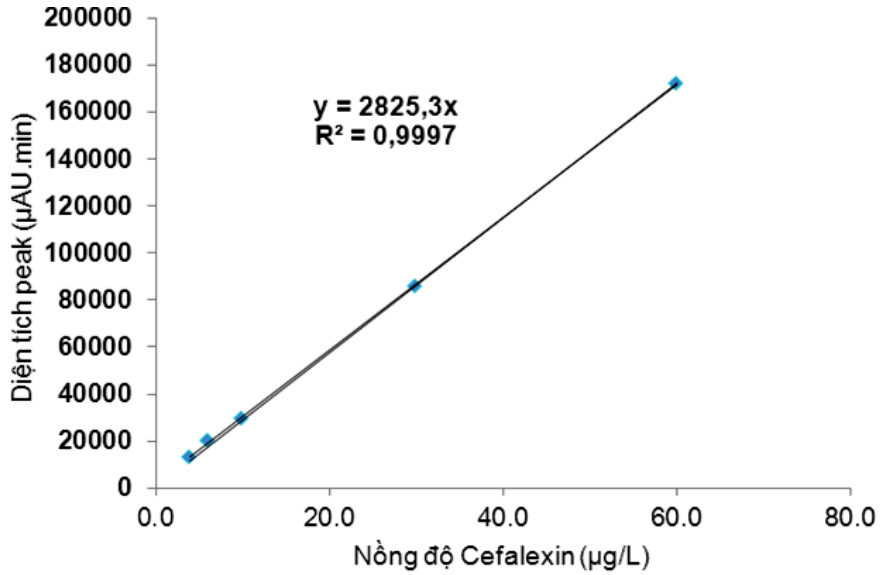
TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (µAu.min)	Hệ số đối xứng (T)
1	2,345	206257	1,29
2	2,367	202990	1,30
3	2,347	202922	1,27
4	2,365	208295	1,28
5	2,353	209561	1,26
6	2,342	203187	1,28
X_{TB}	2,354	205535	1,28
RSD	0,5%	1,4%	1,1%

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, điều kiện sắc ký đạt độ ổn định hệ thống; RSD đối với thời gian lưu, diện tích đỉnh đều < 2%, hệ số đối xứng <1,5;

3.3.2. Khoảng tuyến tính

Pha các dung dịch chuẩn cefalexin có nồng độ x trong khoảng từ 4 µg/L- đến 60 µg/L. Tiến hành phân tích sắc ký theo quy trình ở hình 1, thu được đường hồi quy tuyến tính ở hình 3.

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ cefalexin 4,0 – 60,0 µg/L, giữa tín hiệu đo (y) và nồng độ (x) có tương quan tuyến tính tốt với $R^2 > 0,99$.



***Hình 3**. Đường hồi quy tuyến tính (phương trình đường chuẩn): $y = 2825,3x$ với $R^2 = 0,9997$.*

3.3.3. Độ lặp lại

Để xác định độ lặp lại của phương pháp phân tích UPLC/UV-PAD, tiến hành phân tích lặp lại 6 lần (n = 6) trên mẫu thực tế (mẫu nước thải), xác định nồng độ cefalexin (C) theo công thức (1), rồi tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Kết quả ở bảng 4 cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt (RSD < ½RSD yêu cầu).

***Bảng 4.** Kết quả xác định độ lặp lại của phương pháp phân tích*

TT	C (µg/L)	Thông số thống kê
1	5,2	C_{TB} : 5,4 µg/L RSD: 7,0 % ½RSD yêu cầu[(a)]: 17,5 %
2	6,1	
3	5,5	
4	5,0	
5	5,3	
6	5,8	

(a) Độ lệch chuẩn tương đối tính theo hàm Horwitz, RSD= $2^{1-0,5\lg C}$ với C là nồng độ chất phân tích được biểu diễn bằng phân số [9].

3.3.4. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp phân tích được đánh giá qua độ thu hồi (Recovery/Rev) khi phân tích mẫu thêm chuẩn; với C_0 là nồng độ cefalexin trong mẫu nước thải; C_1 là nồng độ cefalexin chuẩn thêm vào mẫu; C_2 là nồng độ cefalexin xác định được trong mẫu đã thêm chuẩn. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp phân tích cefalexin được nêu ở bảng 5

***Bảng 5.** Kết quả xác định độ đúng của phương pháp phân tích cefalexin*

Thí nghiệm	C_0 (µg/L)	C_1 (µg/L)	C_2 (µg/L)	Rev (%)
1	5,4	5,0	9,4	79,5
2	5,4	5,0	9,9	89,4
3	5,4	5,0	9,8	86,8
Trung bình (n=3)				85,2

Theo quy định số 2002/657/EC của Ủy ban Châu Âu (The European Commission) [10], khi phân tích những nồng độ trong mẫu cỡ 1 ppb – 10 ppb, 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 cao khi phân tích cefalexin.

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

Xác định LOD theo quy tắc 3σ và dựa vào hồi quy tuyến tính theo công thức (2); Từ đó xác định LOQ theo (3)

$$LOD = \frac{3 \times s}{a} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{a} \quad (3)$$

Trong đó, s độ lệch chuẩn của tín hiệu y trên đường hồi quy tuyến tính (còn được gọi là độ lệch chuẩn dư), a là hệ số góc của đường hồi quy tuyến tính ở hình 2.

Từ (2) và (3), với s = 1151,1 và a = 2825,3, tính được LOD = 1,2 µg/L và LOQ= 4,0 µg/L. Với giới hạn phát hiện đó, phương pháp đủ nhạy để phân tích những lượng vết cefalexin trong nước thải. [11].

4. KẾT LUẬN

Phương pháp UPLC đầu dò UV-PDA xây dựng được thích hợp cho định tính và định lượng cefalexin trong nước thải với thời gian phân tích nhanh, tiết kiệm dung môi. Chất lượng của phương pháp đã được đánh giá đạt yêu cầu về tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ nhạy, tính tuyến tính và độ đúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Irena Branowska, *Using HPLC Method with DAD Detection for the Simultaneous Determination of 15 Drugs in Surface Water and Wastewater*, Polish Journal of Environmental Studies; Volume 20, Issue 1, Pages 21, 2011.
[2] *Dược Thư Quốc Gia*, nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, 2012.
[3] I. Arslan Alaton, *Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent*, Journal of Environmental Management, Volume 73, Issue1, Pages 155–163, 2004.
[4] *Dược Điển Anh* (BP2015), Volume 2, Pages 2015, 2015.
[5] *Dược Điển Mỹ* (USP 36), Volume 1, Pages 2587, 2014.
[6] M.I. Bailon-Perez, *Determination of 10 beta-lactam antibiotics in environmental and food samples by capillary liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, Volume 1216, Issue 47, Pages 8355–8361, 2009.
[7] A. Gulkowska, *Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China, Water Research*, Volume 42, Issues 1–2, January 2008.
[8] J.C. Miller and J.N. Miller, Statistics for Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, 2nd Edition , 1998.
[9] *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplementsand otanicals*, 2002.
[10] Jared Anderson, *Analytical Separation Science*, Pages 1794, Wiley–VCH, December 2015.
[11] Johan Bengtsson-Palme, *Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation*, Environment International, Volume 86, Pages 140–149, 2016.

Tác giả chịu trách nhiệm bài viết
Nguyễn Huy Hoài
Trường Đại học Khoa học Huế, Đại học Huế
Email: huyhoai79@gmail.com