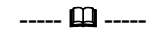


**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**



Lê Thái Bình

**NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN VÀ ỨNG DỤNG
PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI MAO QUẢN DETECTOR
ĐỘ DẪN KHÔNG TIẾP XÚC (CE-C⁴D) ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG
MỘT SỐ NHÓM KHÁNG SINH**

Chuyên ngành: **Hóa phân tích**

Mã số: **9440112.03**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội - 2021

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN
LUẬN ÁN**

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Phạm Thị Ngọc Mai

PGS. TS. Nguyễn Thị Ánh Hương

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước họp tại Khoa Hóa học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội vào hồi giờ ngày tháng năm 2021.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội

- Trung tâm Thông tin - Tư liệu - Đại học Quốc Gia Hà Nội

1. Thi Anh Huong Nguyen, Thi Ngoc Mai Pham, **Thai Binh Le**, Dinh Chi Le, Thi Thanh Phuong Tran, Thi Quynh Hoa Nguyen, Thi Kim Thuong Nguyen, Peter C. Hauser and Thanh Duc Mai (2019), “Cost-effective capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for quality control of beta-lactam antibiotics”, Journal of Chromatography A, Vol. 1605, 360356.
2. **Lê Thái Bình**, Ngô Hữu Tuệ, Chu Thị Huệ, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hương (2019), “Nghiên cứu định lượng một số kháng sinh beta lactam kết hợp với sulbactam bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D)”, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 24, số 4, tr. 177-182.
3. Thi Ngoc Mai Pham, **Thai Binh Le**, Duc Dung Le, Tran Hung Ha, Ngoc Son Nguyen, Tien Duc Pham, Peter C. Hauser, Thi Anh Huong Nguyen and Thanh Duc Mai (2020), “Determination of carbapenem antibiotics using a purpose-made capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 178, 112906.
4. **Thai Binh Le**, Peter C. Hauser, Thi Ngoc Mai Pham, Thi Lan Phuong Kieu, Thi Phuong Quynh Le, Quoc Anh Hoang, Dinh Chi Le, Thi Anh Huong Nguyen and Thanh Duc Mai (2020), “Low-cost and versatile analytical tool with purpose-made capillary electrophoresis coupled to contactless conductivity detection: application to antibiotics quality control in Vietnam”, Electrophoresis Vol. 41, Issue 23, pp.1980-1990.
5. **Lê Thái Bình**, Phạm Thị Quỳnh, Kiều Thị Lan Phương, Nguyễn Thu Phương, Hoàng Quốc Anh, Nguyễn Thị Kim Thường, Chu Thị Huệ, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hương (2021), “Xác định đồng thời hai kháng sinh nhóm glycopeptid trong dược phẩm bằng phương pháp CE-C⁴D”, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 26, số 1, tr. 167-171.
6. Nguyễn Thị Nữ, **Lê Thái Bình**, Nguyễn Thị Thư, Nguyễn Trường Đông, Nguyễn Ngọc Sơn, Nguyễn Thị Kim Thường, Chu Thị Huệ, Phạm Thị Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ánh Hương, Nguyễn Thị Quỳnh Hoa, Hà Trần Hưng, Vũ Anh Phương, Đỗ Thị Trang (2021), “Nghiên cứu định lượng một số kháng sinh aminoglycosid bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D)”, Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, Tập 26, số 2, tr. 60-64.

KẾT LUẬN

Với các mục tiêu, nội dung nghiên cứu đề ra, sau quá trình thực hiện, luận án đã thu được các kết quả như sau:

- Đã khảo sát tối ưu 04 quy trình phân tích các nhóm chất kháng sinh trong mẫu dược phẩm bằng phương pháp CE-C⁴D:
 - + Xác định đồng thời bốn kháng sinh nhóm Aminoglycosid (Amikacin, Kanamycin A, Kanamycin B và Streptomycin): LOD của Amikacin, Kanamycin A, Kanamycin B và Streptomycin lần lượt là 1,0; 0,5; 0,5 và 1,0 ppm.
 - + Xác định đồng thời hai kháng sinh nhóm Glycopeptid (Vancomycin và Teicoplanin): LOD của Vancomycin, Teicoplanin lần lượt là 2,0 ppm và 2,5 ppm.
 - + Xác định đồng thời các kháng sinh β -lactam (Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon) phối hợp với Sulbactam: LOD của Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam lần lượt là 1,0; 1,5; 1,5 và 2,0 ppm.
 - + Xác định đồng thời bốn kháng sinh nhóm Carbapenem (Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem) trong mẫu dược phẩm: LOD của Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem lần lượt là 1,2 ppm; 0,7 ppm; 0,4 ppm và 1,9 ppm.
- Đã xây dựng được quy trình làm sạch, làm giàu Meropenem và Imipenem trong mẫu huyết tương bằng phương pháp chiết pha rắn. Phương pháp cho giá trị MDL của Meropenem và Imipenem lần lượt là 1,5 và 0,75 ppm, độ thu hồi trung bình của Meropenem và Imipenem lần lượt là 97,6 và 98,5%; RSD < 2 %.
- Đã áp dụng các quy trình phân tích thu được để phân tích hàm lượng kháng sinh trong một số mẫu dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D. Đã phân tích hàm lượng Meropenem, Imipenem trong mẫu huyết tương bằng phương pháp CE- C⁴D.

Các kết quả đạt được của luận án đã góp phần công bố 03 bài báo quốc tế trong danh mục ISI và 03 bài gửi đăng trên các hội thảo hoặc tạp chí chuyên ngành trong nước. Điều này thể hiện tính mới của các kết quả nghiên cứu đạt được, không chỉ ở trong nước mà còn ở trên thế giới, mở ra khả năng phát triển và ứng dụng của phương pháp CE –C⁴D được rộng rãi và phổ biến hơn.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Dược phẩm và chất lượng dược phẩm, trong đó có kháng sinh, đóng vai trò quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình điều trị và sinh mạng của người bệnh. Để quá trình điều trị được hiệu quả, chất lượng kháng sinh và sự dung nạp thuốc là hai yếu tố quan trọng. Trong thời gian vừa qua, nhiều vụ sản xuất, buôn bán, tàng trữ và lưu hành trái phép dược phẩm giả, dược phẩm hết hạn sử dụng,... đã được phát hiện và xử lý. Trong đó, một số loại thuốc hết hạn sử dụng đã được làm giả nhãn mác và hạn sử dụng để tiếp tục lưu hành trên thị trường, gây ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng điều trị, quyền lợi và niềm tin của người tiêu dùng.

Trong quá trình sử dụng thuốc, ngoài chất lượng thuốc, hiệu quả điều trị còn tùy thuộc vào sự dung nạp thuốc và ảnh hưởng tương hỗ giữa các triệu chứng bệnh khác nhau (các thông số dược động học) của từng bệnh nhân. Đặc biệt trong điều trị tích cực, diễn biến nặng và sự tồn tại đồng thời của nhiều bệnh lý có thể dẫn đến việc hàm lượng kháng sinh trong máu người bệnh không đáp ứng được liều dùng cần thiết được bác sĩ kê đơn và làm giảm hiệu quả điều trị. Do đó, một trong các xu hướng mới nhất trong điều trị lâm sàng, đặc biệt trong điều trị hồi sức tích cực là giám sát nồng độ thuốc trong điều trị (Therapeutic Drug Monitoring-TDM) để đảm bảo hiệu quả điều trị cao nhất, giảm thiểu nguy cơ độc tính trên thận của bệnh nhân và phòng tránh kháng kháng sinh [1, 7, 9]. Việc phát triển các phương pháp định lượng kháng sinh nhanh, tin cậy để ứng dụng trong phân tích dược phẩm và lâm sàng vì vậy là một nhu cầu rất thiết thực.

Cho đến nay, phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng các detector khác nhau, chủ yếu là detector UV-Vis, vẫn là lựa chọn đầu tay để định lượng kháng sinh trong dược phẩm và huyết tương [8, 21, 22, 46, 108, 132]. Ngoài HPLC, phương pháp vi sinh cũng được quy định trong Dược điển để xác định một số kháng sinh như streptomycin, neomycin, tobramycin,... Tuy nhiên, phương pháp vi sinh có nhược điểm là không xác định được đồng thời các kháng sinh và thời gian phân tích rất lâu, trong khi thiết bị HPLC sẵn có để triển khai được việc phân tích ngay tại khoa lâm sàng hiện vẫn chưa phổ biến

do chi phí cao dành cho thiết bị. Vì vậy, việc xây dựng một phương pháp định lượng nhanh, đồng thời, đơn giản, chi phí thấp để hỗ trợ cho phương pháp vi sinh và HPLC và có thể triển khai phân tích ngay tại khoa lâm sàng có ý nghĩa thực tiễn rất lớn.

Với đề tài: “**Nghiên cứu phát triển và ứng dụng phương pháp điện di mao quản detector độ dẫn không tiếp xúc (CE - C⁴D) để định lượng một số nhóm kháng sinh**”, mục tiêu của luận án là nghiên cứu phát triển ứng dụng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc theo kiểu kết nối tụ điện (CE - C⁴D) nhằm xác định một số nhóm kháng sinh hiện đang được dùng phổ biến nhất ở Việt Nam trong mẫu dược phẩm và mẫu huyết tương (với nhóm kháng sinh lựa chọn phù hợp) bao gồm:

- Nhóm Aminoglycosid, được sử dụng phổ biến nhưng lại có một số độc tính nên cần được kiểm soát: Amikacin, Kanamycin A, Kanamycin B và Streptomycin.
- Nhóm Glycopeptid, thường được dùng với các trường hợp nhiễm khuẩn nặng, không đáp ứng với các kháng sinh khác: Vancomycin và Teicoplanin.
- Nhóm Beta-lactam:
 - + Thế hệ cũ và dùng phối hợp với Sulbactam: Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon
 - + Thế hệ mới (Carbapenem), dùng phổ biến trong điều trị nhiễm khuẩn nặng: Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem.

2. Nội dung của luận án

Với các mục tiêu trên, nội dung nghiên cứu của luận án bao gồm:

- Nghiên cứu khảo sát phương pháp CE- C⁴D nhằm xác định một số nhóm kháng sinh: tìm các điều kiện thích hợp để xác định đồng thời bốn kháng sinh nhóm Aminoglycosid, hai kháng sinh nhóm Glycopeptid (Vancomycin và Teicoplanin); ba kháng sinh nhóm β -Lactam phối hợp với Sulbactam và bốn kháng sinh nhóm Carbapenem.
- Nghiên cứu khảo sát các điều kiện xử lý mẫu phù hợp tương ứng với đối tượng mẫu dược phẩm và mẫu huyết tương nhằm xác định các nhóm kháng sinh tương ứng bằng phương pháp CE- C⁴D.
- Nghiên cứu thẩm định các quy trình phân tích các nhóm kháng sinh trong mẫu dược phẩm và/hoặc huyết tương bằng phương pháp CE-

Meropenem và Imipenem qua ba lần thực hiện lặp cho giá trị đều lớn hơn 97,6% và RSD nhỏ hơn 5% (n = 6), đáp ứng yêu cầu của AOAC.

3.4.4.5. Phân tích Meropenem và Imipenem trong mẫu huyết tương

3.4.4.5.1. Kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D

Kết quả phân tích hàm lượng Meropenem và Imipenem trong 21 mẫu huyết tương lấy từ 7 bệnh nhân đang điều trị hồi sức tích cực (bệnh nhân điều trị bằng Meropenem 1000 mg/lần, bệnh nhân 4 là Meropenem 500 mg/lần, bệnh nhân 5-7 là Imipenem 500 mg/lần) tại Bệnh viện Bạch Mai được thể hiện trong bảng 3.39.

Bảng 3.39. Kết quả phân tích hàm lượng Meropenem và Imipenem trong mẫu huyết tương của bệnh nhân

Thời điểm lấy mẫu sau khi tiêm truyền (giờ)	t = 0	t = 2	t = 5
Bệnh nhân 1	70,4	34,1	13,9
Bệnh nhân 2	66,8	39,4	11,1
Bệnh nhân 3	78,4	37,0	12,1
Bệnh nhân 4	5,4	-	-
Bệnh nhân 5	18,1	9,4	-
Bệnh nhân 6	20,3	12,4	-
Bệnh nhân 7	17,4	6,2	-

“-”: Nhỏ hơn giới hạn phát hiện (MDL: 0,75 ppm với Imipenem, 1,50 ppm với Meropenem)

Như vậy, từ kết quả phân tích nhận thấy hàm lượng kháng sinh giảm dần theo thời gian và sau 5 giờ tiêm truyền chỉ còn lại lượng vết. Đây sẽ là một căn cứ quan trọng để bác sĩ điều chỉnh liều lượng sử dụng kháng sinh cho bệnh nhân hợp lý hơn.

3.4.4.5.2. Kết quả phân tích đối chứng Meropenem và Imipenem trong huyết tương bằng phương pháp HPLC

Việc phân tích đối chứng được thực hiện với 6 mẫu huyết tương của hai bệnh nhân bằng phương pháp HPLC-PDA [8] thực hiện tại Bộ môn Hóa phân tích và độc chất, Trường Đại học Dược Hà Nội. Kết quả cho thấy, sự sai khác giữa hai phương pháp trong khoảng -9,7 ÷ +5,5 %, cho thấy kết quả phân tích bằng phương pháp CE- C⁴D phù hợp với phương pháp đối chứng HPLC.

ml MeOH 100%, 1 ml MeOH/H₂O (7/3), 1 ml MeOH/H₂O (1/1), 2 ml MeOH 100%) đã lựa chọn được dung môi rửa giải thích hợp là 2 ml MeOH.

Dựa trên các kết quả nghiên cứu thu được, điều kiện thích hợp cho quá trình chiết pha rắn Meropenem và Imipenem trong mẫu huyết tương sử dụng cột C₁₈ 3ml được tổng hợp trong sơ đồ sau:

Cột C₁₈ → Hoạt hoá 1 ml CH₃OH+ 3 ml H₂O → Nạp mẫu 1 ml huyết tương → Rửa tạp 1ml H₂O → Thổi khô cột, rửa giải bằng 2 ml MeOH 100% → Thổi khô bằng dòng khí nitơ ở 45⁰ C → Hòa tan cặn bằng 100 µl MeOH

3.4.4.4. Đánh giá phương pháp phân tích

3.4.4.4.1. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn xác định Meropenem và Imipenem trong khoảng nồng độ 5,0- 80,0 ppm được xây dựng trên nền mẫu huyết tương trắng và xử lý qua cột SPE. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.35.

Bảng 3.35. Phương trình đường chuẩn của Meropenem và Imipenem trên nền huyết tương

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	R	P
Meropenem	$y = (-4,0125 \pm 0,25170) + (1,8842 \pm 0,52355)x$	0,9992	< 0,001
Imipenem	$y = (-0,4821 \pm 0,11470) + (1,0396 \pm 0,12355)x$	0,9972	< 0,001

Kết quả thu được cho thấy, các hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ chất phân tích là khá tốt ($R \geq 0,997$), đồng thời các giá trị $P < 0,05$ (đối với cả 2 chất phân tích) chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính. Tính theo thống kê giá trị P_{value} của Meropenem và Imipenem lần lượt là 0,067 và 0,737 đều lớn hơn 0,05 nên phép phân tích không mắc sai số hệ thống.

3.4.4.4.2. Đánh giá phương pháp phân tích

Giới hạn phát hiện của phương pháp (MDL) xác định được với Meropenem và Imipenem lần lượt là 1,5 và 0,75 ppm. Giới hạn định lượng (MQL) của Meropenem và Imipenem tương ứng là 5,0 và 2,5 ppm.

Độ độ lặp lại và độ đúng của phương pháp được thực hiện ở ba mức thêm chuẩn Meropenem và Imipenem là 10, 20, 30 ppm vào 1ml mẫu huyết tương trắng. Kết quả cho thấy, hiệu suất thu hồi của

C⁴D: xây dựng đường chuẩn, xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, đánh giá độ chụm (thông qua độ lặp) và độ đúng (thông qua độ thu hồi).

- Áp dụng các quy trình phát triển được nhằm phân tích hàm lượng các kháng sinh trong mẫu dược phẩm thu thập được trên thị trường và một số mẫu huyết tương được cung cấp bởi Trung tâm chống độc – Bệnh viện Bạch Mai.
- Đánh giá độ tin cậy của phương pháp CE- C⁴D trong việc phân tích kháng sinh, so sánh, đối chứng kết quả phân tích một số mẫu thực tế với kết quả phân tích bằng các phương pháp phân tích tiêu chuẩn theo Dược điển như: vi sinh, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

3. Những đóng góp mới của luận án

❖ Về mặt khoa học

- Lần đầu tiên đã phát triển thành công phương pháp CE - C⁴D nhằm xác định các nhóm kháng sinh trong mẫu dược phẩm theo 04 quy trình phân tích bao gồm: phân tích đồng thời bốn kháng sinh nhóm Aminoglycosid (Amikacin, Kanamycin A, Kanamycin B và Streptomycin), phân tích đồng thời hai kháng sinh nhóm Glycopeptid (Vancomycin và Teicoplanin); phân tích đồng thời 03 kháng sinh Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon kết hợp với Sulbactam và phân tích đồng thời 4 kháng sinh nhóm Carbapenem (Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem).

- Lần đầu tiên đã xây dựng được quy trình phân tích kháng sinh nhóm Carbapenem trong huyết tương người sử dụng kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) sau đó phân tích trên thiết bị điện di mao quản kết hợp detector độ dẫn không tiếp xúc (CE - C⁴D).

❖ Về mặt thực tiễn

- Phương pháp CE - C⁴D với các ưu điểm về hệ thiết bị gọn nhẹ, giá thành thấp rất phù hợp với hoàn cảnh, điều kiện kinh tế, xã hội ở Việt Nam. Các quy trình phân tích xây dựng trong luận án đơn giản, dễ thực hiện, có độ chính xác cao, phù hợp để áp dụng phân tích các kháng sinh trong mẫu dược phẩm và huyết tương; có tiềm năng áp dụng trong kiểm soát chất lượng dược phẩm và giám sát nồng độ thuốc trong điều trị (TDM); có ý nghĩa thực tiễn lớn đối với việc nâng cao hiệu quả điều trị với từng bệnh nhân, nhất là với các bệnh nhân hồi sức tích cực.

- Kết quả định lượng hai kháng sinh nhóm Carbapenem (Imipenem và Meropenem) trong 21 mẫu huyết tương của 7 bệnh nhân đang điều trị hồi sức tại Trung tâm chống độc - Bệnh viện Bạch Mai cho thấy xu hướng biến đổi của hàm lượng kháng sinh trong máu theo thời gian tiêm truyền và mức độ hấp thu kháng sinh khác nhau của các bệnh nhân khi được điều trị với cùng một liều tiêm truyền. Đây sẽ là căn cứ quan trọng để các bác sĩ điều chỉnh liều lượng kháng sinh phù hợp với từng bệnh nhân, tăng cường hiệu quả điều trị.

4. **Bố cục của luận án**

Luận án gồm 165 trang với 49 hình và điện di đồ; 40 bảng số liệu và 132 tài liệu tham khảo. Luận án được cấu tạo gồm: 16 trang danh mục các bảng biểu, hình vẽ, sắc đồ, đồ thị và mục lục, 4 trang mở đầu, 38 trang tổng quan tài liệu, 12 trang nội dung và phương pháp nghiên cứu, 63 trang kết quả nghiên cứu và thảo luận, 2 trang kết luận. Ngoài ra, luận án còn có 1 trang danh mục công trình của tác giả có liên quan đến luận án, 10 trang tài liệu tham khảo và 35 trang phụ lục.

B. NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Chương này đề cập đến các nội dung như sau:

Tổng quan về kháng sinh, đặc biệt là các kháng sinh lựa chọn nghiên cứu trong luận án: nhóm Aminoglycosid, nhóm Glycopeptid, nhóm β -lactam. Vấn đề kháng kháng sinh trên thế giới và Việt Nam cũng được đề cập.

Tổng quan về các phương pháp xác định kháng sinh trong mẫu dược phẩm và mẫu sinh học: phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử, điện hóa, sắc ký, điện di mao quản.

Phương pháp điện di mao quản được giới thiệu cụ thể với các nguyên tắc cấu tạo, cơ sở lý thuyết, dòng điện di thẩm thấu và sự di chuyển của ion chất phân tích trong mao quản, các detector thông dụng, giới thiệu về detector độ dẫn không tiếp xúc (C^4D).

Từ bảng 3.33 cho thấy, kết quả phân tích bằng phương pháp CE- C^4D cho hàm lượng các hoạt chất kháng sinh Carbapenem trong các mẫu dược phẩm sai khác so với nhãn công bố trong khoảng từ -3,81% đến +13,31%.

3.4.3.2. Kết quả phân tích đối chứng Meropenem, Imipenem và Ertapenem trong mẫu dược phẩm bằng phương pháp HPLC

Kết quả phân tích đối chứng 12 mẫu dược phẩm bằng phương pháp HPLC-PDA theo Dược điển [7] tại Viện Kiểm Nghiệm thuốc Trung ương cho thấy, sai khác về kết quả hàm lượng giữa phương pháp CE- C^4D và HPLC đều nhỏ hơn 10%. Hệ số tương quan về kết quả phân tích giữa hai phương pháp đạt được là khá cao ($R^2 = 0,9721$). Điều này chứng tỏ phương pháp CE- C^4D cho kết quả phù hợp với phương pháp đối chứng, đặc biệt phù hợp với mục tiêu phân tích chất lượng nguyên liệu, bán thành phẩm và sàng lọc, góp phần đảm bảo chất lượng của sản phẩm và bảo vệ quyền lợi người tiêu dùng.

3.4.4. Xây dựng quy trình chiết pha rắn Meropenem và Imipenem trong mẫu huyết tương nhằm xác định bằng phương pháp CE- C^4D

Kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) được lựa chọn để làm sạch, làm giàu nhằm xác định Meropenem và Imipenem trong mẫu huyết tương. Các yếu tố ảnh hưởng quyết định đến hiệu suất chiết và hiệu quả làm sạch như dung dịch chiết, dung môi rửa giải, dung môi rửa tạp,... sẽ được khảo sát để lựa chọn điều kiện thích hợp với chất đại diện là Meropenem.

3.4.4.1. Khảo sát bước kết tủa protein

Bốn cách thức kết tủa protein bằng Acetonitril, MeOH, TCA hoặc không sử dụng bước này mà nạp mẫu trực tiếp lên cột đã được khảo sát. Kết quả đã lựa chọn được quy trình với mẫu huyết tương sẽ được nạp trực tiếp lên cột C_{18} cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.4.2. Khảo sát dung môi rửa tạp chất

Ba dung môi rửa tạp là g 1 ml, 2 ml và 3 ml H_2O đã được khảo sát. Kết quả đã lựa chọn rửa tạp chất bằng 1ml H_2O cho khảo sát tiếp theo.

3.4.4.3. Khảo sát dung môi rửa giải

Kết quả khảo sát 5 dung môi rửa giải (gồm: 1 ml ACN 100%, 1

Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem tương ứng là 3,5 ppm; 2,4 ppm; 1,2 ppm và 6,3 ppm.

3.4.2.3. Đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Từ các kết quả thu được cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối của các chất phân tích (RSD) < 3%, độ thu hồi của các chất phân tích trong khoảng 94,1÷ 102,4%. Như vậy, phương pháp có độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC.

3.4.3. Phân tích đồng thời Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem trong mẫu dược phẩm

3.4.3.1. Kết quả phân tích Meropenem, Imipenem và Ertapenem trong mẫu dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

Kết quả phân tích hàm lượng bốn kháng sinh nhóm Carbapenem trong các mẫu thuốc được thu mua tại các hiệu thuốc trên địa bàn Hà Nội thể hiện trong bảng 3.33.

Bảng 3.33. Kết quả phân tích hàm lượng Meropenem, Imipenem và Ertapenem trong mẫu dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

STT	Tên mẫu	Chất phân tích	Hàm lượng (mg/g)		Sai khác (%)
			CE-C ⁴ D	Nhãn	
1	Meronem	Meropenem	887	1000	-11,30
2	Meronem	Meropenem	489	500	-2,24
3	Meropenem Kabi 1	Meropenem	498	500	-0,40
4	Meropenem Kabi 2	Meropenem	914	1000	-8,62
5	Medozopen	Meropenem	937	1000	-6,33
6	Tienam	Imipenem	515	500	+3,00
7	Tiepanem	Meropenem	980	1000	-2,03
8	Lastinem	Imipenem	519	500	+3,81
9	Cepemid	Imipenem	469	500	-6,2
10	Cepemid	Imipenem	735	750	-2,05
11	Mixipem	Imipenem	478	500	-4,44
12	Ivanz	Ertapenem	867	1000	-13,31
13	Pizulen	Meropenem	486	500	-2,82
14	Nimidine	Imipenem	495	500	-1,04
15	Merugold	Meropenem	975	1000	-2,50

CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

* Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp phân tích: phương pháp điện di mao quản sử dụng detector độ dẫn không tiếp xúc (CE-C⁴D)

- Phương pháp so sánh, đối chứng: phương pháp vi sinh, sắc ký lỏng sử dụng detector quang học hoặc khối phổ hai lần (HPLC-PDA, LC-MS/MS).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định đồng thời Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A, Kanamycin B bằng phương pháp CE-C⁴D

Nhóm kháng sinh Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A, Kanamycin B hầu như không hấp thụ bức xạ vùng UV-Vis nên việc phân tích bằng phương pháp HPLC sử dụng detector UV-Vis gặp nhiều khó khăn. Do đó, đây là một lợi thế khi sử dụng phương pháp CE-C⁴D để xác định nhóm kháng sinh này. Trong công thức phân tử của các kháng sinh này chứa nhiều nhóm NH₂ với các giá trị pK_a > 6,5 nên tại khoảng pH từ 3,0- 5,0 các kháng sinh này tồn tại dưới dạng cation di chuyển cùng chiều với dòng EOF và thuận lợi để tách bằng CE- C⁴D theo phương pháp phân cực bình thường (tức là áp thế dương vào mao quản ở đầu bơm mẫu). Để tìm được điều kiện thích hợp cho quá trình tách điện di, các yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả tách như: dung dịch đệm điện di, pH, thể tích, ... sẽ được khảo sát và biện luận.

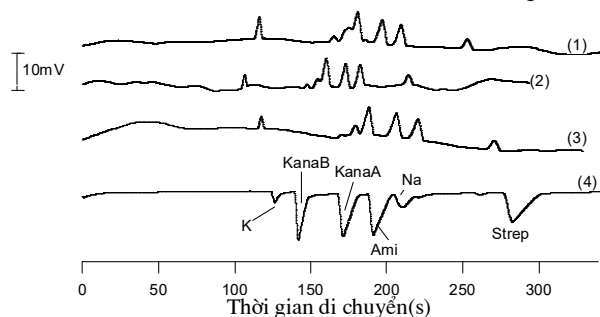
3.1.1. Khảo sát các điều kiện thích hợp

3.1.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

Các hệ đệm điện di phân tích đồng thời Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A, Kanamycin B cần có pH xung quanh khoảng 3,0- 5,0 nhằm đảm bảo các chất phân li hoàn toàn ở dạng cation. Kết quả khảo sát với các hệ đệm Arg/Ace, His/Ace và Tris/Ace cho điện di đồ có đường nền nhiễu và các chất bị trùng pic. Dung dịch điện ly còn lại thường được sử dụng trong phương pháp CE- C⁴D là acid acetic được thay đổi nồng độ (20, 50, 100, 200, 300, 500 mM) nhằm khảo sát tìm giá trị pH phù hợp với điều kiện thực nghiệm. Kết quả được thể hiện trong hình 3.1.

Kết quả cho thấy, với dung dịch acid Acetic 200 mM thì tín hiệu

pic thu được tốt nhất và cân đối, đường nền ổn định. Do đó, dung dịch điện ly Ace 200 mM được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.



Hình 3.1. Điện di đồ khảo sát ảnh hưởng của các loại dung dịch điện ly đến sự phân tách Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A và Kanamycin B nồng độ 50 ppm. (1): His/Ace pH = 3,0; (2): Tris/Ace pH = 3,0; (3): Arg/Ace pH = 3,0; (4): Ace 200mM. Điều kiện CE: Bơm mẫu kiểu xi phong 20 cm, 30 s; Thế tách: +20 kV, mao quản có đường kính trong (ID) là 50µm, tổng chiều dài (L) 45 cm (chiều dài hiệu dụng (l) 30 cm)

3.1.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Việc khảo sát thế tách đồng thời Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A, Kanamycin B được thực hiện ở +15 kV, +18 kV, +20kV và +25 kV. Kết quả đã lựa chọn được thế tách +20 kV phù hợp cho phép phân tích.

3.1.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của chiều cao bơm mẫu và thời gian bơm mẫu

Phương pháp bơm mẫu thủy động lực học kiểu xi phong được lựa chọn trong nghiên cứu này. Do đó, hai thông số ảnh hưởng nhất là chiều cao và thời gian bơm mẫu được khảo sát để đảm bảo thu được tín hiệu lớn nhất mà chân pic không bị dẫn rộng. Các chiều cao và thời gian bơm mẫu được lựa chọn khảo sát là 15 cm, 20 cm, 25 cm và 25 s, 30 s, 35 s. Kết quả khảo sát cho thấy, chiều cao bơm mẫu 20 cm và thời gian 30s là điều kiện thích hợp cho nghiên cứu này.

Từ các kết quả khảo sát thu được, các điều kiện thích hợp nhằm xác định đồng thời Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A và Kanamycin B bằng phương pháp CE- C⁴D được tóm tắt ở bảng 3.4.

Bảng 3.29. Điều kiện thích hợp xác định đồng thời Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem bằng phương pháp CE- C⁴D

Các yếu tố	Điều kiện
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 60 cm, chiều dài hiệu dụng 50 cm, đường kính trong 50 µm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động lực học kiểu xi phong, chiều cao 20 cm trong 20 s
Dung dịch đệm điện di	Tris/Ace 10 mM, pH= 8,0
Thế tách	+20 kV

3.4.2. Đánh giá phương pháp phân tích

3.4.2.1. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn bốn kháng sinh nhóm Carbapenem được xây dựng trong khoảng 1,5 - 250,0 ppm. Kết quả thể hiện trong bảng 3.30.

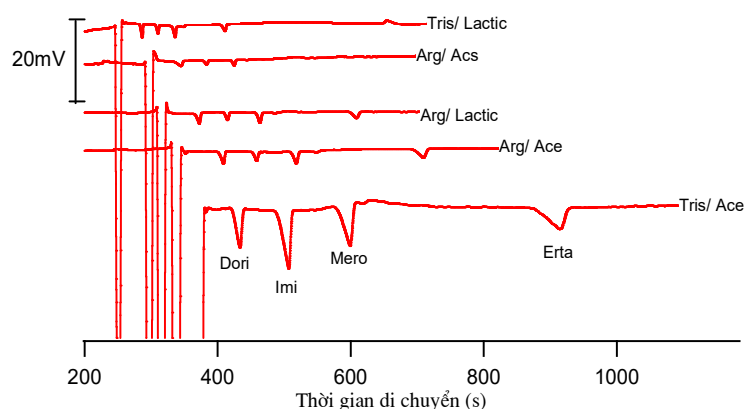
Bảng 3.30. Phương trình đường chuẩn của Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	R	P
Doripenem	$y = (-0,00994 \pm 0,00798) + (0,00634 \pm 0,00006)x$	0,99970	< 0,001
Meropenem	$y = (0,00001 \pm 0,00180) + (0,00174 \pm 0,00002)x$	0,99975	< 0,001
Imipenem	$y = (0,00582 \pm 0,00107) + (0,00368 \pm 0,00002)x$	0,99995	< 0,001
Ertapenem	$y = (-0,00286 \pm 0,001510,00169 \pm 0,00002)x$	0,99960	< 0,001

Kết quả thu được ở bảng 3.30 cho thấy, các hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ chất phân tích là khá tốt ($R \geq 0,9996$), đồng thời các giá trị $P < 0,05$ (đối với cả 4 chất phân tích) chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính. Tính theo thống kê giá trị P_{value} của Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem lần lượt là 0,260; 0,994; 0,072 và 0,107 đều lớn hơn 0,05 nên phép phân tích không mắc sai số hệ thống.

3.4.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giá trị giới hạn phát hiện của phương pháp CE- C⁴D xác định được đối với Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem tương ứng là 1,2 ppm; 0,7 ppm; 0,4 ppm và 1,9 ppm. Giới hạn định lượng của



Hình 3.32. So sánh khả năng phân tích Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem của các đệm điện di ở pH = 8,0. Điều kiện CE: Bom mẫu kiểu xi phông 10 cm, 10 s; mao quản ID = 50µm, l/L = 50/60 cm; Thế tách: +20 kV

Kết quả cho thấy tại pH = 8,0, hệ đệm Arg/Ace cho đường nền ổn định nhất nhưng tín hiệu chất phân tích nhỏ hơn so với hệ đệm Tris/Ace. Do đó, hệ đệm Tris/Ace pH = 8,0 được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Việc khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch đệm được thực hiện với khoảng nồng độ Tris từ 5- 50 mM. Kết quả đã lựa chọn được nồng độ đệm 10mM là phù hợp nhất.

3.4.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Các thế tách được lựa chọn khảo sát là: +15, +20 và +25 kV. Thế tách +20kV cho hiệu quả tách tốt nhất, thời gian phân tích phù hợp nên được chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

3.4.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và chiều cao bơm mẫu

Thời gian bơm mẫu được khảo sát ở 10, 20 và 30 s; chiều cao bơm mẫu được khảo sát ở 5, 10, 15 và 20 cm. Kết quả khảo sát đã lựa chọn được thời gian bơm mẫu 20 s và chiều cao bơm mẫu 20 cm là phù hợp nhất trong nghiên cứu này.

Từ các kết quả khảo sát thu được, điều kiện thích hợp cho phân tích hỗn hợp Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem bằng phương pháp CE- C⁴D được tổng hợp trong bảng 3.29.

Bảng 3.4. Điều kiện thích hợp xác định đồng thời bốn kháng sinh nhóm Aminoglycosid bằng phương pháp CE- C⁴D

Các yếu tố	Điều kiện
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 45 cm, chiều dài hiệu dụng là 30 cm, đường kính trong là 50 µm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động lực học kiểu xi phông: 20 cm trong 30 s
Dung dịch điện ly	Acetic 200mM
Thế tách	+20 kV

3.1.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của các cation K⁺ và Na⁺

Sự có mặt của hai cation là K⁺ và Na⁺ trong chất chuẩn cũng như ở mẫu thực cũng ảnh hưởng đến kết quả của quá trình phân tích hỗn hợp 4 kháng sinh. Kết quả cho thấy, ion K⁺ ảnh hưởng đến Kanamycin B khi nồng độ lớn hơn 150 ppm, Na⁺ ảnh hưởng đến Amikacin khi nồng độ lớn hơn 30 ppm. Do đó, trong trường hợp các mẫu phân tích có hàm lượng các chất ảnh hưởng lớn thì cần pha loãng để đảm bảo quá trình phân tích chính xác. Tuy nhiên, khảo sát thực tế đối với các nền mẫu lựa chọn cho thấy chỉ có Na⁺ có ảnh hưởng đến chất phân tích trong một số mẫu được phẩm có chứa thành phần chính là Amikacin như Chemacin và Itamekacin, còn K⁺ có nồng độ nhỏ hơn ngưỡng ảnh hưởng.

3.1.2. Xây dựng đường chuẩn các chất phân tích và đánh giá phương pháp

3.1.2.1. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn xác định bốn chất kháng sinh Aminoglycosid được xây dựng trong khoảng 5- 50 ppm. Các kết quả được trình bày trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Phương trình đường chuẩn của Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A và Kanamycin B

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	R	P
Amikacin	$y = (0,13880 \pm 0,93430) + (1,79682 \pm 0,03079)x$	0,99940	< 0,001
Kanamycin A	$y = (-0,72270 \pm 0,98810) + (2,13901 \pm 0,03256)x$	0,99955	< 0,001
Kanamycin B	$y = (1,55230 \pm 0,71470) + (2,04475 \pm 0,02355)x$	0,99975	< 0,001
Streptomycin	$y = (-0,61200 \pm 1,10200) + (2,31904 \pm 0,03631)x$	0,99950	< 0,001

Với các kết quả trên cho thấy, hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ chất phân tích là tương đối tốt ($R \geq 0,9994$), đồng thời các giá trị $P < 0,05$ đối với cả 4 chất phân tích, chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính. Tính theo thống kê, các giá trị P_{value} của Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A và Kanamycin B lần lượt là 0,889; 0,608; 0,505 và 0,096, đều lớn hơn 0,05 nên phương pháp không mắc sai số hệ thống.

3.1.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Kết quả xác định giới hạn phát hiện (LOD) của Kanamycin B, Kanamycin A, Amikacin và Streptomycin lần lượt là 0,5; 0,5; 1,0 và 1,0 ppm. Giới hạn định lượng (LOQ) của Kanamycin B, Kanamycin A, Amikacin và Streptomycin lần lượt là 1,67; 1,67; 3,33 và 3,33 ppm.

3.1.2.3. Đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Các kết quả cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của Amikacin, Streptomycin, Kanamycin A và Kanamycin B đạt được từ $0,7 \div 1,1 \%$, độ thu hồi của các kháng sinh từ $79,7 \div 85,7 \%$, đáp ứng được các yêu cầu theo AOAC [25].

3.1.3. Phân tích đồng thời Amikacin, Streptomycin và Kanamycin trong mẫu dược phẩm

3.1.3.1. Kết quả phân tích Amikacin, Streptomycin và Kanamycin A trong dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

Tiến hành phân tích tám mẫu dược phẩm được mua ngẫu nhiên tại các hiệu thuốc trên địa bàn Hà Nội. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả phân tích hàm lượng 4 kháng sinh Aminoglycosid trong một số mẫu dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

Kháng sinh	Hàm lượng		Sai khác (%)
	CE-C ⁴ D	Nhãn	
Amikacin (dạng tiêm)	507 (mg/ml)	500 (mg/ml)	+1,4
	497 (mg/ml)	500 (mg/ml)	-0,6
Streptomycin (dạng bột)	976 (mg)	1000 (mg)	-2,4
	979 (mg)	1000 (mg)	-2,1
	1049 (mg)	1000 (mg)	+4,9
	1016 (mg)	1000 (mg)	+1,6

bằng phương pháp LC-MS/MS. Như vậy, kết quả nghiên cứu đã phát hiện 02 trong tổng số 20 mẫu có chất lượng không đúng với nhãn công bố (thiếu hoạt chất). Điều này một lần nữa cho thấy cần thiết phải thường xuyên giám sát, kiểm nghiệm chất lượng thuốc, bảo vệ quyền lợi và sức khỏe người tiêu dùng.

3.3.3.2. Kết quả phân tích đối chứng bằng phương pháp LC-MS/MS

Việc phân tích đối chứng được thực hiện với 9 mẫu (5 mẫu đơn hoạt chất, 4 mẫu hai hoạt chất kết hợp) bằng phương pháp LC-MS/MS [67]. Kết quả phân tích hàm lượng một số mẫu thuốc thu được bằng hai phương pháp CE-C⁴D và phương pháp LC-MS/MS có độ tương quan tốt ($R^2 = 0,9778$), giá trị sai khác trong khoảng $(-11,6 \div +3,3\%)$. Dùng phần mềm Minitab để so sánh từng cặp chuẩn cho giá trị P_{value} đều lớn hơn 0,05, cho thấy phương pháp CE- C⁴D có kết quả phù hợp so với phương pháp LC-MS/MS.

3.4. Xác định đồng thời kháng sinh Doripenem, Meropenem, Imipenem và Ertapenem trong mẫu dược phẩm và mẫu huyết tương bằng phương pháp CE- C⁴D

Ở pH cao, bốn kháng sinh nhóm Carbapenem cũng ở dạng anion nhưng với kích thước cồng kềnh, điện tích nhỏ, độ linh động điện di thấp. Do đó, kỹ thuật phân cực ngược lợi dụng dòng EOF để kéo theo các anion ở pH cao được lựa chọn sử dụng.

3.4.1. Khảo sát các điều kiện thích hợp

3.4.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

Các loại đệm được lựa chọn khảo sát đồng thời thành phần và pH đệm gồm: Arg/Ace, Arg/Asc, Arg/Lactic, Tris/Lactic và Tris/Ace với các pH = 7,0- 9,0. Từ các kết quả khảo sát cho thấy, với 5 đệm khảo sát tại pH > 8,0 tín hiệu thu được của 4 pic kém, thậm chí không xuất hiện pic, đường nền nhiều. Tại các đệm có pH $\leq 7,5$, độ phân giải pic của Doripenem và Meropenem thấp hơn pH= 8,0. Các đệm có pH = 8,0 đều cho tín hiệu đẹp, hiệu quả tách tốt, đường nền ổn định và thời gian xuất hiện pic hợp lý. Để có thể lựa chọn được hệ đệm tốt nhất, điện di đồ ở pH = 8,0 của các đệm khảo sát được so sánh trong hình 3.32.

Bảng 3.27. Kết quả phân tích hàm lượng bốn kháng sinh trong mẫu được phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

STT	Mã thuốc	Chất phân tích	Hàm lượng (mg/viên)		Sai khác (%)
			Nhãn	CE-C ⁴ D	
1	AM1	Amoxicillin	500	495	-1,06
2	AM2	Amoxicillin	500	495	-1,07
3	AM3	Amoxicillin	500	496	-0,87
4	AM4	Amoxicillin	500	508	+1,57
5	AM-CH1	Amoxicillin	500	532	+6,43
6	AM-CH2	Amoxicillin	500	513	+2,51
7	AM-QT1	Amoxicillin	500	525	+5,04
8	AM-QD1	Amoxicillin	500	515	+2,96
9	AM-KD1	Amoxicillin	500	528	+5,68
10	AP-QT1	Ampicillin	500	520	+4,09
11	AP-QD1	Ampicillin	500	529	+5,79
12	AP1	Ampicillin	500	493	-1,49
13	AP2	Ampicillin	500	489	-2,18
14	AP-KD1	Ampicillin	500	527	+5,38
15	AMvSB1	Amoxicillin	250	249	-0,42
		Sulbactam	250	ND	
16	AMvSB3	Amoxicillin	500	548	+9,52
		Sulbactam	125	ND	
17	APvSB1	Ampicillin	1000 (mg/lọ)	982	-1,79
		Sulbactam	500 (mg/lọ)	514	+2,78
18	CPvSB	Cefoperazon	1000 (mg/lọ)	1019	+1,94
		Sulbactam	500 (mg/lọ)	499	-0,19
19	AMvSB2	Amoxicillin	1000 (mg/lọ)	1017	+1,72
		Sulbactam	500 (mg/lọ)	515	+3,10
20	APvSB2	Ampicillin	1000 (mg/lọ)	945	-5,46
		Sulbactam	500 (mg/lọ)	540	+7,95

(ND: Không phát hiện)

Kết quả phân tích 20 mẫu (14 mẫu đơn hoạt chất và 6 mẫu hai hoạt chất kết hợp) cho thấy có 18/20 mẫu cho hàm lượng hoạt chất tương ứng với công bố trên nhãn, riêng hai mẫu có hai chất kết hợp thiếu Sulbactam so với nhãn công bố. Kết quả này đã được khẳng định

Kanamycin A	560 (mg)	500 (mg)	+12
	106 (mg/ml)	100 (mg/ml)	+6,0

Kết quả phân tích được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn cho thấy hàm lượng các kháng sinh có sự sai khác so với nhãn là $-2,4 \div 12$ %. Mặc dù chưa áp dụng được hết cho cả bốn hoạt chất trong mẫu thực tế, nhưng quy trình đã cho thấy tiềm năng áp dụng để phân tích nhiều hoạt chất khác nhau trong nhóm aminoglycosid, đặc biệt hiệu quả khi chỉ sử dụng một quy trình cho nhiều đối tượng mẫu nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm trong các công ty dược, các đội quản lý thị trường và các phòng thí nghiệm tuyến địa phương.

3.1.3.2. Kết quả phân tích đối chứng Amikacin, Streptomycin và Kanamycin A trong dược phẩm bằng phương pháp tiêu chuẩn HPLC

Để kiểm chứng các kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D, tám mẫu dược phẩm đã được phân tích đối chứng bằng phương pháp tiêu chuẩn theo Dược điển [7], do Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương hoặc Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Hà Nội thực hiện. Trong đó, Kanamycin A và Amikacin được phân tích bằng phương pháp HPLC, Streptomycin được phân tích bằng phương pháp vi sinh. Kết quả phân tích hàm lượng các kháng sinh trong các mẫu phân tích bằng hai phương pháp CE- C⁴D và phương pháp đối chứng có độ tương quan cao ($R = 0,9939$); giá trị P_{value} khi so sánh từng cặp chuẩn theo chuẩn t đều lớn hơn 0,5; cho thấy phương pháp CE-C⁴D là đáng tin cậy.

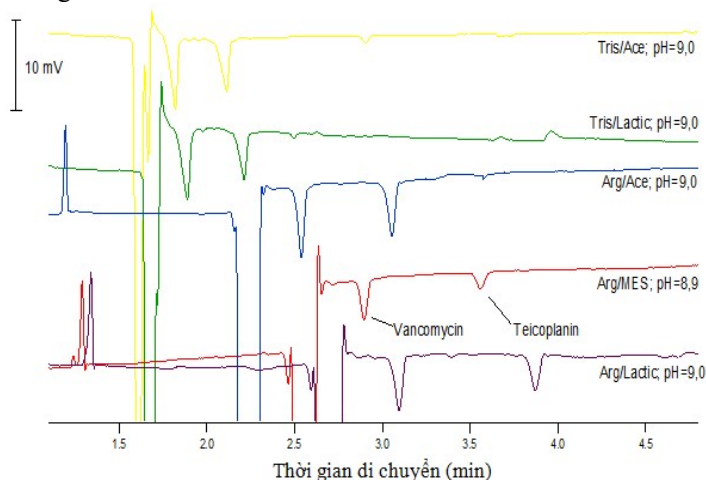
3.2. Xác định đồng thời Vancomycin và Teicoplanin trong dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

Vancomycin và Teicoplanin là hai kháng sinh thuộc nhóm Glycopeptid. Trong dung dịch có pH = 8,0÷ 10, các kháng sinh này tồn tại chủ yếu dưới dạng anion nhưng có kích thước công kênh, điện tích nhỏ, có độ linh động điện di thấp. Vì vậy sẽ rất khó thực hiện quá trình phân tích điện di đối với các chất này ở khoảng pH thấp và theo kiểu phân cực thuận. Khi đó, việc lợi dụng dòng EOF nhằm kéo theo các anion kháng sinh về phía cực âm ở pH cao theo kỹ thuật phân cực ngược là cần thiết.

3.2.1. Khảo sát các điều kiện thích hợp

3.2.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

Với mục đích tạo ra dung dịch đệm điện di có pH cao (pH khoảng 8,5- 10), các hệ đệm được khảo sát có hợp phần bazơ là Arg và Tris kết hợp với hợp phần acid là acetic (Ace), Lactic và MES. Các kết quả cho thấy, các hệ đệm đều có độ dẫn lớn hơn độ dẫn của Vancomycin và Teicoplanin nên pic của hai chất đều quay xuống (cho tín hiệu âm). Nhìn chung, khi pH tăng, thời gian phân tích của hai kháng sinh đều giảm do khi tăng pH, tốc độ dòng EOF cũng tăng, cuốn theo hai kháng sinh đi chuyển nhanh hơn, từ đó làm giảm thời gian di chuyển. Đồng thời, 5 đệm khảo sát đều cho tín hiệu đẹp tại pH= 9 với hiệu quả tách tốt, đường nền ổn định và thời gian xuất hiện pic hợp lý. Để lựa chọn được hệ đệm tốt nhất, các điện di đồ ở pH = 9 được so sánh trong hình 3.14.



Hình 3.14. So sánh khả năng phân tích Vancomycin và Teicoplanin của các đệm điện di ở pH = 9,0. Điều kiện CE: Bom mẫu kiểu xi phong 10 cm, 30 s; mao quản, ID = 50µm, l/L = 30/60 cm; Thế tách: +20 kV

Kết quả khảo sát đã lựa chọn được hệ đệm Arg/Ace pH = 9,0 cho các khảo sát tiếp theo. Việc khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung dịch đệm cũng được thực hiện với các giá trị 10 mM, 15 mM và 20 mM. Kết quả nồng độ đệm Arg 15 mM đã được lựa chọn là phù hợp nhất.

Đường chuẩn xác định bốn chất kháng sinh được xây dựng trong khoảng 10 - 70 ppm. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.24.

Bảng 3.24. Phương trình đường chuẩn của Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	R	P
Amoxicillin	$y = (0,64286 \pm 0,04518) + (0,11286 \pm 0,00101)x$	0,99980	< 0,001
Ampicillin	$y = (0,65714 \pm 0,05714) + (0,11429 \pm 0,00128)x$	0,99970	< 0,001
Cefoperazon	$y = (0,38571 \pm 0,04041) + (0,09714 \pm 0,00090)x$	0,99980	< 0,001
Sulbactam	$y = (0,11429 \pm 0,08777) + (0,14107 \pm 0,00193)x$	0,99950	< 0,001

Kết quả các đường chuẩn của Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam có hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ chất phân tích là tương đối tốt ($R^2 > 0,9995$) và các giá trị $P < 0,05$, chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính. Tính theo thống kê giá trị P_{value} của Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam lần lượt là 0,070; 0,103; 0,092 và 0,250 đều lớn hơn 0,05 nên phương pháp không mắc sai số hệ thống.

3.3.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giới hạn phát hiện của Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam đạt được tương ứng là 1,0; 1,5; 1,5 và 2,0 ppm. Từ đó, giới hạn định lượng xác định được với Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam tương ứng là 3,3; 5,0; 5,0 và 6,7 ppm.

3.3.2.3. Đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

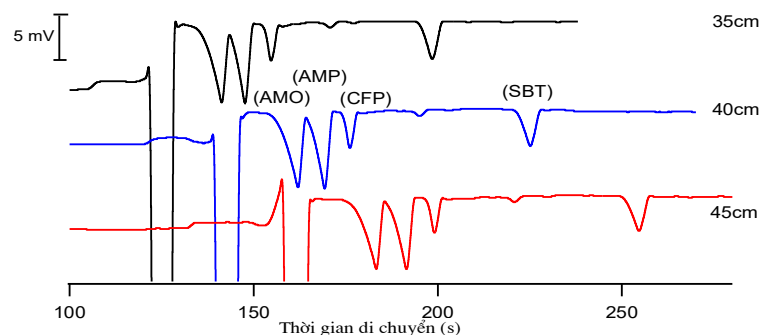
Kết quả đánh giá ở ba mức nồng độ 30, 40 và 50 ppm cho độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các chất phân tích nhỏ hơn 3%, độ thu hồi trong khoảng 98,3 ÷ 101,7%. Như vậy, phương pháp có độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC.

3.3.3. Phân tích đồng thời kháng sinh Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam trong dược phẩm

3.3.3.1. Kết quả phân tích Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam trong dược phẩm bằng phương pháp CE- C^dD

Kết quả phân tích hàm lượng bốn kháng sinh trong 20 mẫu dược phẩm được trình bày ở bảng 3.27.

cm được lựa chọn là phù hợp nhất vì cho diện tích pic đủ lớn, độ phân giải của các chất phù hợp, tín hiệu pic ổn định.



Hình 3.24. Ảnh hưởng của chiều dài hiệu dụng đến sự phân tách Amoxicillin (AMO), Ampicillin (AMP), Cefoperazon (CFP) và Sulbactam (SBT). Điều kiện CE: Dung dịch đệm Tris 10mM/Ace pH= 7,5; bơm mẫu kiểu xi phông 15 cm, 30s; mao quản ID = 50 μm, l/L = 35/60 cm; Thế tách: +17 kV

3.3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và chiều cao bơm mẫu

Sau khi khảo sát các thời gian bơm mẫu là 20, 30, 40s và chiều cao bơm mẫu 10, 15, 20 cm đã lựa chọn được thời gian bơm mẫu 30 s và chiều cao bơm mẫu 15 cm là phù hợp nhất.

Từ các kết quả thu được, điều kiện thích hợp để phân tích đồng thời Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam bằng phương pháp CE- C⁴D được tóm tắt trong bảng 3.23.

Bảng 3.23. Điều kiện thích hợp xác định đồng thời Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam bằng phương pháp CE- C⁴D

Các yếu tố	Điều kiện phân tích
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 60 cm, chiều dài hiệu dụng 40 cm, đường kính trong 50 μm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động học kiểu xi phông: 15 cm trong 30 s
Thế tách	+17 kV
Dung dịch đệm	Tris 10mM/Ace pH = 7,5

3.3.2. Đánh giá phương pháp phân tích

3.3.2.1. Xây dựng đường chuẩn

3.2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thế tách

Thế tách được khảo sát tại các giá trị +15, +20 và +25 kV. Kết quả đã lựa chọn được thế tách +20 kV cho các khảo sát tiếp theo.

3.2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian và chiều cao bơm mẫu

Thời gian và chiều cao bơm mẫu được khảo sát theo phương pháp thủy động học kiểu xi phông tại các giá trị 20, 30 và 40 s và 10, 15 và 20 cm. Kết quả thời gian bơm mẫu 30 s và chiều cao bơm mẫu 15 cm được lựa chọn là phù hợp nhất.

3.2.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của chiều dài hiệu dụng

Chiều dài hiệu dụng của mao quản được tiến hành khảo sát ở 3 giá trị là 25, 30 và 35 cm. Kết quả chiều dài hiệu dụng của mao quản là 30 cm được lựa chọn vì diện tích pic đủ lớn, thời gian di chuyển của chất phù hợp và thuận tiện trong việc thiết kế thí nghiệm.

Từ các kết quả khảo sát thu được ở trên, điều kiện thích hợp cho phân tích đồng thời Vancomycin và Teicoplanin bằng phương pháp CE- C⁴D được tổng hợp trong bảng 3.15.

Bảng 3.15. Điều kiện thích hợp xác định đồng thời Vancomycin và Teicoplanin bằng phương pháp CE- C⁴D

Các yếu tố	Điều kiện
Detector	C ⁴ D
Mao quản	Mao quản silica, tổng chiều dài 60 cm, chiều dài hiệu dụng 30 cm, đường kính trong 50 μm
Phương pháp bơm mẫu	Thủy động lực học kiểu xi phông 15 cm trong 30 s
Dung dịch đệm điện di	Arg 15mM/Ace pH= 9,0
Thế tách	+20 kV

3.2.2. Đánh giá phương pháp phân tích

3.2.2.1. Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn 7 điểm được xây dựng trong khoảng nồng độ 10-150 ppm. Kết quả được trình bày trong bảng 3.16.

Bảng 3.16. Phương trình đường chuẩn của Vancomycin và Teicoplanin

Tên chất	Phương trình đường chuẩn	R	P
Vancomycin	$y = (-1,76620 \pm 0,36160) + (0,35470 \pm 0,00433)x$	0,99970	<0,001
Teicoplanin	$y = (-1,33570 \pm 0,25820) + (0,27369 \pm 0,00309)x$	0,99975	<0,001

Kết quả thu được ở bảng 3.16 cho thấy, các hệ số tương quan biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ chất phân tích là khá tốt ($R \geq 0,9997$), đồng thời các giá trị $P < 0,05$ với cả hai chất chứng tỏ x và y có quan hệ tuyến tính. Tính theo thống kê, giá trị P_{value} của Vancomycin và Teicoplanin lần lượt là 0,058 và 0,067 đều lớn hơn 0,05 nên phép phân tích không mắc sai số hệ thống.

3.2.2.2. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Kết quả xác định LOD của phương pháp CE- C⁴D đối với Vancomycin là 2,0 ppm và Teicoplanin là 2,5 ppm. Từ đó, LOQ của phương pháp xác định Vancomycin và Teicoplanin tương ứng là 6,7 và 8,3 ppm.

3.2.2.3. Đánh giá độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Kết quả đánh giá độ lặp của hai chất kháng sinh u qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) đều nhỏ hơn 3 %. Độ thu hồi của Vancomycin nằm trong khoảng 97,43- 107,04 % và Teicoplanin trong khoảng 94,30- 103,5%. Như vậy, phương pháp có độ lặp lại và độ thu hồi tốt.

3.2.3. Phân tích đồng thời Vancomycin và Teicoplanin trong mẫu dược phẩm

3.2.3.1. Kết quả phân tích Vancomycin và Teicoplanin trong dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

Quy trình tối ưu được áp dụng để phân tích Vancomycin và Teicoplanin trong 9 mẫu dược phẩm mua tại các nhà thuốc tại Hà Nội. Các kết quả phân tích được thể hiện trong bảng 3.19.

Bảng 3.19. Kết quả phân tích hàm lượng Vancomycin và Teicoplanin trong 9 mẫu dược phẩm bằng phương pháp CE- C⁴D

Tên thuốc	Chất phân tích	Hàm lượng (mg)		Sai khác (%)
		CE-C ⁴ D	Nhãn	
Vancomycin	Vancomycin	494	500	-1,2
Valacin 500		453	500	-9,4
Valacin 1000		922	1000	-7,8
Vagonxin		459	500	-8,2
Voxin		542	500	+8,4
Vammybivid's 1		520	500	+4,0
Vammybivid's 2		482	500	-3,6

Targosid	Teicoplanin	384	400	-4,0
Tapocin		196	200	+8,0

Kết quả định lượng bằng phương pháp thêm chuẩn cho thấy, hàm lượng các kháng sinh có sự sai khác so với nhãn nhỏ hơn 9,4%.

3.2.3.2. Kết quả phân tích đối chứng Vancomycin và Teicoplanin trong dược phẩm bằng phương pháp tiêu chuẩn HPLC

Để kiểm chứng các kết quả phân tích bằng phương pháp CE-C⁴D, 9 mẫu dược phẩm đã được phân tích đối chứng bằng phương pháp tiêu chuẩn theo Dược điển (Phương pháp HPLC) [7] tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Hà Nội. Kết quả cho sự sai khác nhỏ hơn 12,5 %, chứng tỏ phương pháp CE- C⁴D phù hợp và có tiềm năng để phân tích hàm lượng hai kháng sinh này trong mẫu dược phẩm.

3.3. Xác định đồng thời Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon và Sulbactam bằng phương pháp CE- C⁴D

3.3.1. Khảo sát các điều kiện thích hợp

Nhóm kháng sinh Amoxicillin, Ampicillin, Cefoperazon phối hợp với Sulbactam ở pH cao cũng tồn tại dưới dạng anion nhưng với kích thước cồng kềnh, điện tích nhỏ, độ linh động điện di thấp. Do đó, kỹ thuật phân cực ngược lợi dụng dòng EOF nhằm kéo theo các anion ở pH cao từ cực dương về cực âm được sử dụng.

3.3.1.1. Khảo sát dung dịch đệm điện di

Tiến hành khảo sát bốn hệ đệm Arg/Asc, Arg/Ace, Tris/Asc, Tris/Ace với các giá trị pH khác nhau. Kết quả cho thấy, đệm Tris/Ace ở pH = 7,5 cho tín hiệu pic tốt và cân đối, đường nền ổn định, các pic tách khỏi nhau rõ ràng, thời gian di chuyển của các chất hợp lý, do đó được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Việc khảo sát nồng độ của Tris thay đổi từ 8mM, 10mM và 15mM cũng được thực hiện. Đệm Tris 10 mM/Ace được lựa chọn vì cho đường nền ổn định, pic chất cân đối, có độ phân giải tốt. Vì vậy,

3.3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của chiều dài hiệu dụng

Kết quả khảo sát chiều dài hiệu dụng của mao quản với các giá trị 35, 40 và 45 cm được thể hiện trong hình 3.24. Chiều dài hiệu dụng 40