

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

dụng trong thiết kế liều dùng và giám sát điều trị amikacin cho trẻ em ở lứa tuổi này.

Vi khuẩn Gr (-) gây bệnh thường gặp có MIC amikacin từ 4 - 6 chiếm tỉ lệ cao.

Mô phỏng Monte Carlo cho thấy: mức liều hiện tại (15 mg/kg) khó đảm bảo hiệu quả điều trị trên bệnh nhân. Mức liều 20 mg/kg cho khả năng đạt hiệu quả điều trị trên hầu hết (>80%) vi khuẩn có MIC 4 - 6 và làm tỉ lệ tích lũy đáp ứng tăng rõ rệt.

Tuy nhiên, nên cập nhật MIC của vi khuẩn tại bệnh viện để có cơ sở lựa chọn mức liều phù hợp.

Mô phỏng Monte Carlo có thể được sử dụng xác định liều dùng phù hợp cho cả các kháng sinh khác dựa trên các thông số dược động học của quần thể bệnh nhân và MIC vi khuẩn thực tế tại bệnh viện.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Kim Chi, Hoàng Thị Kim Huyền, Khu Thị Khánh Dung (2011), "Khảo sát chế độ liều dùng amikacin ở trẻ dưới 1 tuổi tại BV Nhi Trung ương trong năm 2009", *Tạp chí Dược học*, số 418, tháng 2/2011, pp. 14-22

2. Akers K. S., Cota J. M et al (2011), "Once-daily amikacin dosing in burn patients treated with

continuous venovenous hemofiltration", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(10), pp. 4639-42.

3. Bauer A. L. (2008), *Applied Clinical Pharmacokinetics*, Mc Graw Hill Medical, United States of America

4. Gálvez Ricardo, Luengo Cecilia, et al. (2011), "Higher than recommended amikacin loading doses achieve pharmacokinetic targets without associated toxicity", *International journal of Antimicrobial agents*, 38(2), pp. 146-151.

5. J. W. Mouton, D. F. J. Brown et al (2012), "The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach", *Clinical Microbiology and Infection. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18, pp. E37-E45

6. Touw Daniel J., Westerman Elsbeth M et al (2009), "Therapeutic drug monitoring of aminoglycosides in Neonates", *Clin. Pharmacokinet.*, 48(2), pp. 71-88

7. Zazo H., Martin-Suarez A. et al. (2013), "Evaluating amikacin dosage regimens in intensive care unit patients: a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis using Monte Carlo simulation", *Int. J. Antimicrob Agents*, 42(2), pp. 155-60.

8. EUCAST The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - (2011), "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1", The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Truy cập, từ: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints.

(Ngày nhận bài: 27/12/2014 - Ngày duyệt đăng: 03/02/2015)

Nghiên cứu các điều kiện phân tích dư lượng 14 chất nhóm quinolon trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật LC-MS/MS

Cao Công Khánh¹, Nguyễn Tường Vy^{2*}

¹ Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

² Trường Đại học Dược Hà Nội

* E-mail: vynguyentuong@gmail.com

Summary

A liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) method was developed for simultaneous determination of 14 residual quinolones: Nalidixic acid, Oxolinic acid, Flumequinone, Cinoxacin, Ciprofloxacin, Enoxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Lomefloxacin, Difloxacin, Danofloxacin, Enrofloxacin, Orbifloxacin, Sarafloxacin. The separation was performed on a static phase XBridge column (150 mm x 2.1 mm, 3.5 μ m) and Symmetry column (250 mm x 4.6 mm, 5.0 μ m); detector: MS

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

TripQuad ESI (+), MRM mode with one precursor ion and two product ions. By this method, experimental processing of samples with different type of SPE cartridges was analyzed. The method showed helpful in screening, quantification and confirming the action of these residues.

Keywords: Quinolone, LC-MS, SPE.

Đặt vấn đề

An toàn thực phẩm là vấn đề đang được toàn xã hội quan tâm, trong đó, công tác kiểm nghiệm thực phẩm đóng vai trò rất quan trọng. Việc này đòi hỏi phải có phương pháp kiểm nghiệm đáp ứng được các yêu cầu trong nước và thế giới, đặc biệt là các phương pháp phân tích dư lượng trong thực phẩm. Hiện nay, mức giới hạn cho phép tối đa của một số chất nhóm quinolon trong thực phẩm rất thấp^[1,2]. Mặt khác, để góp phần kiểm soát được tồn dư kháng sinh trong thực phẩm thì chất lượng của thức ăn chăn nuôi có vai trò rất quan trọng. Vì vậy chúng tôi đã nghiên cứu và lựa chọn các điều kiện phân tích đồng thời 14 chất nhóm quinolon trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật LC-MS/MS. Đây là kỹ thuật hiện đại, có độ nhạy và độ chính xác cao, đáp ứng được các yêu cầu của thế giới.

Đối tượng, hóa chất và thiết bị nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

- Các chất nhóm quinolon (14 chất): Acid oxolinic, acid nalidixic, flumequin, cinoxacin, ciprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, norfloxacin, lomefloxacin, difloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, orbifloxacin, sarafloxacin.

- Các loại cột SPE: Sep-Pak C18-E (500 mg, 3 ml) (Waters); Oasis HLB (200 mg, 6 ml) (Waters); SCX (500 mg, 3 ml); NH₂ (500 mg, 3 ml) (Phenomenex).

Dụng cụ, trang thiết bị

- Hệ thống LC-MS/MS: API 5500 TripQuad (ABS Sciex) kết hợp Shimadzu 20A.

- Cột XBridge (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) (Waters) và tiền cột tương ứng.

- Các loại bình định mức (Isolab) và pipet chính xác (Eppendorf).

- Cân phân tích có độ chính xác đến 0,01 mg (Mettler Toledo).

Hóa chất, chất chuẩn

- Các chất chuẩn nhóm quinolon (14 chất) (Sigma Aldrich).

- Nội chuẩn Ciprofloxacin D8 (Dr Ehrenstorfer).

- Methanol, acetonitril (ACN), acid formic (FA), acid acetic, amoni format, amoni acetat (Merck) và nước cất 2 lần đạt yêu cầu dùng cho HPLC.

Xử lý kết quả

- Sử dụng các phần mềm Analyt 1.5.1 được cài đặt trong hệ thống LC-MS/MS.

- Phương pháp tính toán thống kê có sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả và bàn luận

Các điều kiện phân tích trên LC-MS/MS

Thử nghiệm khảo sát phân tích các chất chuẩn quinolon trên hệ thống LC-MS/MS, chúng tôi lựa chọn được các điều kiện sau:

- Các điều kiện phân tích trên phần LC:

+ Cột sắc kí C18 XBridge (150 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) (Waters) và tiền cột tương ứng.

+ Cột sắc kí C18 Symmetry (250 mm x 4,6 mm; 5,0 µm) (Waters) và tiền cột tương ứng.

+ Thể tích tiêm mẫu 20 µl; nhiệt độ buồng cột: 30°C.

+ Tốc độ dòng pha động: 0,5 ml/phút.

+ Chương trình Gradient pha động như sau:

Bảng 1: Gradient pha động phân tích các chất quinolon trên cột XBridge

Thời gian (phút)	ACN (FA 0,1%)	H ₂ O (FA 0,1%)
Bắt đầu	20%	80%
1,0	50%	50%
7,0	70%	30%
7,5	20%	80%
10,0	20%	80%

Bảng 2: Gradient pha động phân tích các chất quinolon trên cột Symmetry

Thời gian (phút)	ACN (FA 0,1%)	H ₂ O (FA 0,1%)
Bắt đầu	20%	80%
1,0	20%	80%
7,0	50%	50%
7,5	100%	0%
8,5	100%	0%
9,0	20%	80%
12,0	20%	80%

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

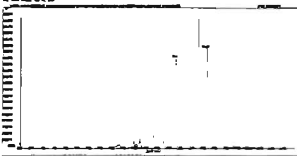
- Các điều kiện phân tích của detector MS:

Bảng 3: Các thông số chung của detector MS

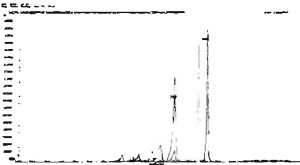
Chế độ ion hóa	ESI (+)	Nhiệt độ (TEM)	450
Khí màn (CUR)	15	Khí nguồn ion 1 (GS1)	20
Khí phân mảnh (CAD)	7	Khí nguồn ion 2 (GS2)	20
Thế ion hóa (IS)	5000	Thế đầu vào (EP)	10

Bảng 4: Các thông số chi tiết của các chất phân tích trên detector MS

Chất phân tích	(M+H) ⁺ m/z	DP (volt)	Sản phẩm ion 1			Sản phẩm ion 2		
			m/z	CE	CXP	m/z	CE	CX
Acid oxolinic	262	56	224	23	30	216	39	28
Acid nalidixic	233	96	215	19	22	187	23	24
Flumequin	262	106	202	43	26	244	25	28
Cinoxacin	263	111	189	37	18	245	21	20
Ciprofloxacin	332	91	314	27	34	288	23	22
Enoxacin	321	111	303	27	18	232	47	30
Ofloxacin	362	116	318	25	18	261	35	26
Norfloxacin	320	96	276	23	26	302	25	14
Lomefloxacin	352	86	265	31	30	308	23	18
Difloxacin	400	61	356	25	20	299	37	18
Danofloxacin	358	76	340	29	20	283	31	22
Enrofloxacin	360	41	316	25	18	342	27	20
Orbifloxacin	396	71	352	31	18	295	23	22
Sarafloxacin	386	51	342	37	18	299	25	20
Ciprofloxacin d8	340	96	322	25	34	296	27	38



Hình 1: Sắc đồ phân tích các chất nhóm quinolon trên cột Symmetry



Hình 2: Sắc đồ phân tích các chất nhóm quinolon trên cột Xbridge

Nhân xét: Tại Việt Nam hiện nay chưa thống nhất ban hành được phương pháp phân tích đa dư lượng kháng sinh nhóm quinolon. Một số phòng thí nghiệm mới chỉ bắt đầu triển khai xây dựng và phân tích một số kháng sinh đại diện cho nhóm quinolon. Vì vậy phương pháp trong nghiên cứu này xác định đồng thời 14 chất nhóm quinolon sẽ góp phần nâng cao năng lực kiểm nghiệm thực phẩm của nước ta. Ưu điểm của phương pháp này là khoảng thời gian phân tích ngắn (10 – 12 phút cho phân tích 14 chất) và có thể triển khai áp dụng trên cột C18 thông thường và C18 siêu cao áp.

Quy trình xử lý mẫu

- **Xử lý mẫu sơ bộ:** các mẫu thịt được bỏ phần da, gân, xương và xay nhỏ cho đồng nhất. Các mẫu thức ăn chăn nuôi được xay nghiền nhỏ và trộn đều cho đồng nhất.

- **Giai đoạn chiết mẫu:** Cân khoảng 2 g mẫu đã đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 ml có nắp kín. Thêm lượng nội chuẩn tương ứng với khoảng 100 ng/ml khoảng 30 ml acetonitril/TCA 4% trong nước cất (70/30), lắc đều, đem rung siêu âm 15 phút. Sau đó đem ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút, lấy ra gạn phần dịch trong cho vào bình cổ quay 100 ml. Chiết lại lần 2 với 15 ml acetonitril/TCA 4% trong nước cất (70/30). Gộp dịch chiết thu được, đem cô quay chân không đến khi còn khoảng 10 ml. Thêm khoảng 20 ml nước cất, lắc đều, làm sạch qua cột SPE.

- **Giai đoạn làm sạch mẫu** được tiến hành thử nghiệm với 04 loại cột SPE (C18-E, HLB, SCX, NH₂) trên 02 loại nền mẫu là mẫu thịt lợn và mẫu thức ăn chăn nuôi:

+ **Quy trình làm sạch mẫu qua cột SPE C18-E, cột SPE NH₂ và cột SPE HLB** hoạt hóa với 6 ml methanol, 6 ml nước cất; loại tạp bằng 3 ml nước cất, 3 ml methanol:H₂O (10/90) và rửa giải lấy chất phân tích bằng 2 x 2 ml acetonitril.

+ **Quy trình làm sạch mẫu qua cột SPE SCX:** hoạt hóa với 6 ml methanol, 6 ml HCl 0,1 N; loại tạp bằng 6 ml nước cất; rửa giải bằng 2 x 2 ml methanol:NH₃OH (95/5).

- **Tiến hành thêm dung dịch chuẩn** của các chất phân tích vào nền mẫu trắng với một lượng xác định (100 ppb). Xử lý mẫu theo quy trình như trên, với mỗi loại cột SPE làm lặp lại 06 lần. Phân tích dịch chiết cuối cùng trên hệ thống LC-MS/MS. Hiệu quả của mỗi loại cột SPE được đánh giá về độ thu hồi trung bình (R_m) và độ lặp lại (thông qua giá trị RSD).

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

- **Tính toán kết quả:** Từ các diện tích pic thu được trên các sắc đồ mẫu phân tích và phương trình đường chuẩn tương ứng, tính hàm lượng các chất nghiên cứu trong từng mẫu. Sau đó tính SD và RSD theo công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$RSD(\%) = \frac{100 \times SD}{\bar{X}}$$

Trong đó:

x_i : là giá trị đo được thứ i

$\bar{X}$: là giá trị trung bình

n : là số lần đo

Tính toán độ thu hồi của các chất phân tích theo công thức sau:

$$R\% = \frac{C_n}{C_c} \times 100$$

Trong đó:

$R\%$: Độ thu hồi, %

$C_{m.c}$: Nồng độ chất phân tích trong mẫu thêm chuẩn

C_m : Nồng độ chất phân tích trong mẫu thử

C_c : Nồng độ chuẩn thêm (lý thuyết)

C_n : Nồng độ chất phân tích trong mẫu trắng thêm chuẩn

Kết quả thu được như sau:

Bảng 5: Kết quả phân tích trên các loại cột SPE trên nền mẫu thịt lợn

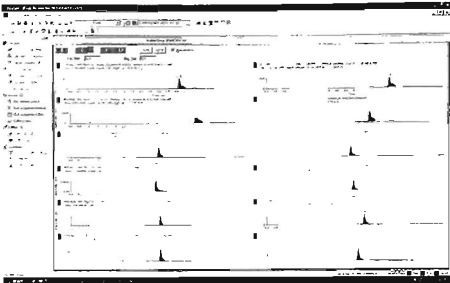
Chất PT	SPE C18-E		SPE HLB		SPE SCX		SPE NH ₂	
	R_p %	RSD %	R_p %	RSD %	R_p %	RSD %	R_p %	RSD %
Acid Oxolinic	81,5	5,03	84,9	5,28	68,4	7,21	88,9	5,35
Acid Nalidixic	83,7	5,42	88,6	6,04	80,1	6,36	93,0	5,72
Flumequine	85,8	6,59	89,4	6,29	57,4	6,90	89,5	6,06
Cinoxacin	74,6	6,29	86,3	5,77	91,9	5,44	87,4	5,94
Ciprofloxacin	79,1	7,28	83,4	7,03	46,4	6,17	63,6	6,85
Enoxacin	81,3	5,63	87,8	6,11	78,6	6,53	58,8	6,33
Ofloxacin	85,9	6,23	86,3	5,97	85,8	5,98	54,3	7,21
Norfloxacin	86,5	5,85	88,7	5,34	55,6	7,06	58,7	7,59
Lomefloxacin	84,8	5,35	87,7	5,91	67,2	6,83	<40	-
Difloxacin	80,7	6,87	81,5	7,26	74,8	6,25	<40	-
Danofloxacin	79,4	5,91	83,8	5,73	68,6	6,04	<40	-
Enrofloxacin	82,5	7,57	84,3	6,44	72,9	5,79	<40	-
Orbifloxacin	83,7	6,62	88,5	5,71	52,8	7,36	<40	-
Sarafloxacin	85,5	5,56	86,8	4,87	80,1	6,12	<40	-

Bảng 6: Kết quả phân tích trên các loại cột SPE trên nền mẫu thức ăn chăn nuôi

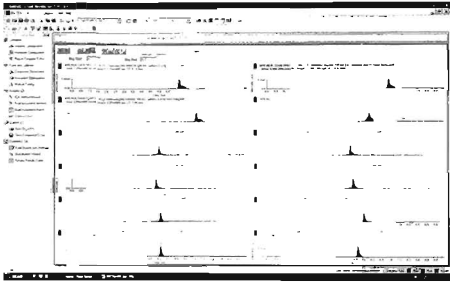
Chất PT	SPE C18-E		SPE HLB		SPE SCX		SPE NH ₂	
	R_p %	RSD %	R_p %	RSD %	R_p %	RSD %	R_p %	RSD %
Acid oxolinic	84,8	4,97	86,4	5,37	59,5	6,87	83,0	5,92
Acid nalidixic	77,3	4,82	87,7	5,25	86,5	6,04	84,3	6,13
Flumequin	80,8	5,86	88,6	6,72	84,0	5,91	92,1	5,76
Cinoxacin	81,6	7,06	86,2	7,51	78,2	6,32	85,6	6,45
Ciprofloxacin	77,8	5,14	81,1	5,43	57,1	6,69	59,7	7,18
Enoxacin	74,9	6,11	77,5	6,82	60,8	7,22	56,2	6,64
Ofloxacin	72,4	7,26	84,4	5,85	83,0	5,54	52,2	7,37
Norfloxacin	74,7	5,86	81,8	5,77	62,5	7,35	54,6	7,09
Lomefloxacin	84,7	4,99	86,4	6,06	57,2	6,78	<40	-
Difloxacin	71,3	5,87	87,8	5,64	73,3	6,11	<40	-
Danofloxacin	61,2	6,43	81,1	5,73	65,7	6,96	<40	-
Enrofloxacin	81,5	7,05	89,9	4,82	76,2	7,07	<40	-
Orbifloxacin	83,6	6,85	89,1	5,49	76,8	7,64	<40	-
Sarafloxacin	84,5	5,82	85,8	5,91	78,1	6,58	<40	-

Nhận xét: Theo quy định của châu Âu thì khi phân tích dư lượng kháng sinh trong thực phẩm, ở mức nồng độ 100 ppb thì độ thu hồi phải đạt từ 70% đến 110% và độ lặp lại phải < 15%. Như vậy, cột SPE HLB cho hiệu quả cao nhất đối với các chất. Cột SPE C18-E cho hiệu quả kém hơn sau đó đến cột SPE SCX và kém nhất là cột SPE NH₂.

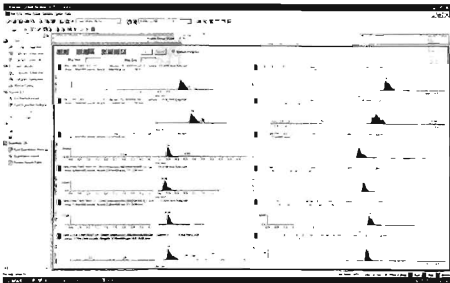
Số sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới^[3-5], phương pháp của chúng tôi có độ lặp lại rất tốt, có hiệu quả tương đương với các nghiên cứu khác (thậm chí một vài chất cho hiệu quả cao hơn như acid oxolinic, acid nalidixic trên cả hai loại cột SPE C18 và SPE HLB). Tuy nhiên độ thu hồi trong nghiên cứu của chúng tôi không tốt bằng các nghiên cứu khác. Điều này có thể do chất lượng lô hàng cột SPE và các hóa chất khác nhập về Việt Nam không tốt bằng các nước khác. Ngoài ra, điều kiện tại phòng thí nghiệm phân tích nước ta và một số nguyên nhân chủ quan khác cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Các nguyên nhân trên chúng tôi sẽ tiếp tục theo dõi trong quá trình nghiên cứu, phân tích tiếp theo



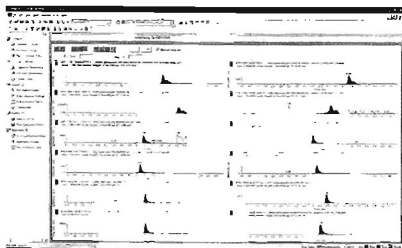
Hình 3: Kết quả thử nghiệm cột SPE HLB trên nền mẫu thịt lợn



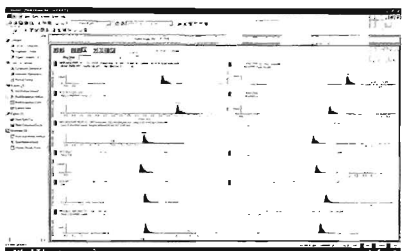
Hình 4: Kết quả thử nghiệm cột SPE HLB trên nền mẫu thức ăn chăn nuôi



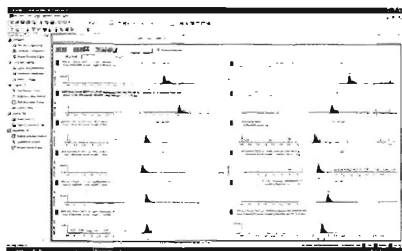
Hình 5: Kết quả thử nghiệm cột SPE C18-E trên nền mẫu thịt lợn



Hình 6: Kết quả thử nghiệm cột SPE C18-E trên nền mẫu thức ăn chăn nuôi



Hình 7: Kết quả thử nghiệm cột SPE SCX trên nền mẫu thịt lợn



Hình 8: Kết quả thử nghiệm cột SPE SCX trên nền mẫu thức ăn chăn nuôi

Các kết quả phân tích trên cũng cho thấy các phòng thí nghiệm tại Việt Nam có thể sử dụng cột SPE C18 và SPE HLB để phân tích dư lượng các chất nhóm quinolon các mẫu thịt và thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên cột SPE SCX và cột SPE

NH_2 thì không phù hợp để phân tích các chất nhóm quinolon có độ thu hồi nhỏ hơn 70%, chỉ nên nghiên cứu thử nghiệm với các chất có độ thu hồi lớn hơn 70%.

Kết luận

Kỹ thuật LC-MS/MS là một kỹ thuật hiện đại, đáp ứng rất tốt các yêu cầu của thể giới về phân tích dư lượng thuốc kháng sinh. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu, thử nghiệm và lựa chọn được các thông số kỹ thuật của phần sắc ký lỏng (LC) và phần detector khối phổ (MS) phù hợp để có thể phân tích đồng thời 14 chất trong nhóm quinolon. Đồng thời qua quá trình thử nghiệm khảo sát các giai đoạn xử lý mẫu, chúng tôi cũng đã đánh giá được hiệu quả làm sạch mẫu của 05 loại cột SPE khác nhau. Đây là các nghiên cứu ban đầu, cần phải theo dõi, đánh giá và hoàn thiện phương pháp phân tích trong thời gian tiếp theo.

Tài liệu tham khảo

1. Quyết định 46/2007/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2007 của Bộ Y tế về quy định mức giới hạn ô nhiễm hóa học và vi sinh vật trong thực phẩm.

2. Quyết định 26/2005/QĐ-BTS ngày 18 tháng 8 năm 2005 của Bộ Thủy sản bổ sung nhóm quinolon vào danh mục cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thủy sản xuất khẩu vào thị trường Bắc Mỹ và Hoa Kỳ.

3. R. Amalya (2010), "Multi-class, multi residue method for determination of penicillins, cephalosporins and quinolones in cow milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC", *Masters Thesis*, University of Barcelona, Barcelona.

4. Susan B. Clark, Joseph M. Storey (2008), "Optimization and validation of multi-class, multi-residue LC-MS/MS screening and confirmation method for drug residues in milk", *Food and Drug Administration*, USA.

5. E. Rodriguez, M. C. Moreno-Bondi, M. D. Marazuela (2008), "Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of fluoroquinolone residues in powdered infant formulae application to the analysis of samples from the Spanish and Latin American market", *Journal of Chromatography A*, 1209, pp. 136–144.

(Ngày nhận bài: 02/12/2014 - Ngày duyệt đăng: 03/02/2015)

Thiết lập chất đối chiếu captopril disulfid và xây dựng qui trình HPLC định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm captopril

Lữ Thiện Phúc¹, Trần Văn Mười², Nguyễn Tấn Đạt¹
Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ¹, Đặng Văn Tịnh³, Nguyễn Đức Tuấn³

¹ Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

² Sở Y tế TP Hồ Chí Minh

³ Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

* E-mail: diemnhim@yahoo.com

Summary

Captopril disulfide (CPDS) was established as a reference standard, basing on the ISO guide. The assigned value of captopril disulfide reached the purity of 99.50%. With this, it showed applicable to quality control of captopril disulfide and related compounds. In addition, an HPLC-PDA method for assay of CPDS was developed and validated, proving applicable to quantitative determination of CPDS in raw captopril materials and pharmaceuticals.

Keywords: Captopril, captopril disulfide, HPLC.