

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG AMOXICILIN TRONG
HUYẾT TƯƠNG LỢN BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

**Đào Văn Đôn*; Nguyễn Văn Bạch*
Nguyễn Thanh Huyền*; Đoàn Cao Sơn***

TÓM TẮT

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector UV (230 nm) được xây dựng và thẩm định để định lượng amoxicilin (AMO) trong huyết tương lợn với cefadroxil (CEF) là nội chuẩn. Sau khi kết tủa protein trong huyết tương bằng axit perchloric, AMO và nội chuẩn được phân tách với điều kiện sắc ký như sau: cột Phenomenex Gemini C18 (5 μ m, 250 x 4 mm) ở 40°C; pha động ACN: Na₂HPO₄ 0,01M pH 4,8 (5/95, v/v), tốc độ 1,0 ml/phút. Phương pháp phân tích có giới hạn định lượng dưới là 0,25 μ g/ml, RSD < 3%; khoảng tuyến tính từ 0,25 - 15 μ g/ml, độ chính xác trong ngày và khác ngày lần lượt là 1,5 - 3,3% và 2,6 - 3,4%; độ đúng trong ngày và khác ngày lần lượt là 93,5 - 105,1% và 93,0 - 107,6%. Phương pháp phân tích đã xây dựng có thể sử dụng trong nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học của AMO trên lợn thực nghiệm.

* Từ khóa: Amoxicilin; Sắc ký lỏng hiệu năng cao; Huyết tương lợn.

**DETERMINATION OF AMOXICILINE IN PIG PLASMA
BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD**

SUMMARY

A sensitive and selective HPLC method with UV detection (230 nm) was developed and validated for quantitation of amoxiciline in pig plasma using cefadroxil as an internal standard (IS). After precipitating protein in plasma by perchloric acid, the analyte and IS were eluted from Phenomenex Gemini C18 column (5 μ m, 250 x 4 mm) at 40°C temperature with a mobile phase consisting of 10 mM phosphate buffer (pH 4.8): acetonitrile (95/5, v/v), at a flow rate of 1.0 mL/min. The lower limit of quantitation was 0.25 μ g/mL, with a relative standard deviation of less than 3%. A linear range of 0.25 - 15 μ g/mL was established. This HPLC method was validated with between-batch and within-batch precision of 1.5 - 3.3% and 2.6 - 3.4%, respectively. The between-batch and within-batch accuracy was 93.5 to 105.1% and 93.0 to 107.6%, respectively. This validated method is sensitive and repeatable enough to be used in bioavailability and bioequivalence studies.

* Key words: Amoxicilin; HPLC; Pig plasma.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Amoxicilin là kháng sinh phổ rộng, thuộc nhóm beta-lactam, được sử dụng rộng rãi trong điều trị nhiễm khuẩn thông thường. AMO có thời gian bán thải ngắn, thời gian

tác dụng từ 6 - 8 giờ, nên phải sử dụng nhiều lần trong ngày (3 - 4 lần) để đạt được hiệu quả điều trị. Đã có một số nghiên cứu được công bố về xây dựng phương pháp

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Nguyễn Liêm

PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

định lượng AMO và các hoạt chất khác trong huyết tương động vật thí nghiệm khác nhau như thỏ, chó [1]. Thử nghiệm trên những động vật này có ưu điểm là tiết kiệm chi phí, dễ triển khai thực hiện. Tuy nhiên, khi triển khai thí nghiệm lấy nhiều máu (nhiều thời điểm khác nhau) trên thỏ và chó dễ làm thay đổi huyết động học, kéo dài thời gian phục hồi thể trạng cho nghiên cứu chéo đôi và có thể làm chết động vật thử nghiệm. Nghiên cứu sinh khả dụng (SKD) và tương đương sinh học (TĐSH) trên lợn (> 30 kg) có nhược điểm tốn kém, nhưng có nhiều ưu điểm như: có thể lấy máu nhiều lần mà ít làm thay đổi huyết động học, lợn nhanh chóng phục hồi thể trạng để triển khai nghiên cứu những lần tiếp theo [5]. Nghiên cứu về SKD/TĐSH còn ít được triển khai trên lợn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này để góp thêm phương pháp trong đánh giá SKD/TĐSH, đặc biệt với những thuốc giải phóng kéo dài, phải lấy máu ở nhiều thời điểm trong quá trình thí nghiệm.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu và thiết bị.

- Nguyên liệu: huyết tương lợn (màu trắng).
- Hóa chất: AMO, CEF (chuẩn - Viện Kiểm nghiệm Thuốc TỰ); acetonitrile, methanol và nước cất (HPLC-Merck), các dung môi hoá chất khác đạt tiêu chuẩn PA.
- Thiết bị: hệ thống HPLC Alliance Waters 2695D, 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, detector UV 2487, có buồng gia nhiệt cột; cân phân tích Sartorius (độ chính xác 0,1 mg); máy ly tâm lạnh UNIVERSAL 320 (Hettich - Đức, tốc độ tối đa 18.000 vòng/phút); máy lắc MS1 Minishaker (IKA® - Mỹ); tủ lạnh âm sâu DF8514 (Ilshinlab - Hàn Quốc, nhiệt độ âm tối đa -80°C).

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Xây dựng quy trình định lượng gồm các nội dung: khảo sát điều kiện sắc ký, quy trình xử lý mẫu và chất nội chuẩn, từ đó lựa chọn quy trình định lượng.

- Phương pháp thẩm định quy trình định lượng: theo hướng dẫn FDA (2001) (độ đặc hiệu, giới hạn định lượng dưới, độ tuyến tính, tỷ lệ thu hồi) [2].

* Chuẩn bị mẫu phân tích:

- Dung dịch gốc AMO pha trong Na₂HPO₄ 0,01M pH 4,8 có nồng độ 1 mg/ml, từ đó pha loãng thành các dung dịch thứ cấp để khi thêm 50 µl dung dịch này vào 90 µl huyết tương trắng tạo ra nồng độ AMO trong huyết tương là 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 µg/ml.

- Mẫu QC có nồng độ 0,6 µg/ml (LQC), 4,0 µg/ml (MQC) và 12,0 µg/ml (HQC).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

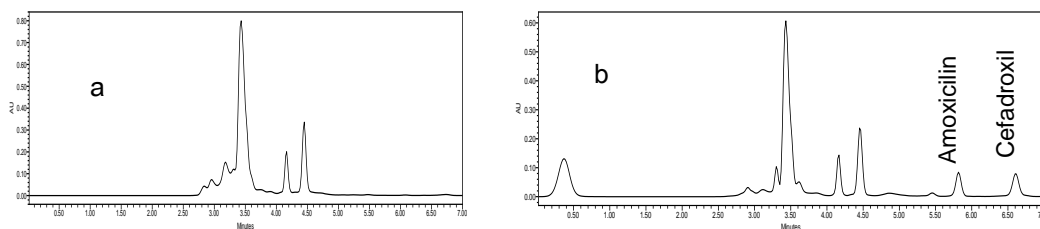
1. Kết quả xây dựng quy trình định lượng AMO trong huyết tương lợn.

Qua khảo sát thử, chúng tôi lựa chọn quy trình định lượng dưới đây để tiếp tục đánh giá thẩm định:

- Xử lý mẫu: lấy 1 ml mẫu, thêm 50 µl nội chuẩn và 100 µl HClO₄ 15% (KL/KL), lắc xoáy 30 giây. Ly tâm lạnh (4°C) với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần dịch trong để phân tích HPLC. Nội chuẩn: CEF 250 µg/ml (pha trong đệm).

- Điều kiện sắc ký: Cột Gemini C18, 5 µm, 250 x 4 mm; 40°C; pha động ACN: Na₂HPO₄ 0,01M pH 4,8 (5/95, v/v), tốc độ dòng 1,0 ml/phút; detector UV 230 nm; thể tích tiêm mẫu 50 µl; nhiệt độ buồng tiêm mẫu 4°C.

2. Kết quả thẩm định quy trình định lượng AMO trong huyết tương lợn.



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng (a) và mẫu huyết tương chứa AMO, CEF (b).

*** Độ đặc hiệu - chọn lọc:**

Phân tích huyết tương trắng và mẫu thử có chuẩn và nội chuẩn. Kết quả cho thấy: tại thời điểm xuất hiện pic chuẩn AMO ($t_R = 5,8$ phút) và nội chuẩn CEF ($t_R = 6,6$ phút), trong mẫu thử không thấy xuất hiện trong mẫu trắng. Phương pháp phân tích đã đảm bảo nhận diện, phân biệt được AMO, CEF và không bị ảnh hưởng bởi các tạp chất có trong huyết tương lợn.

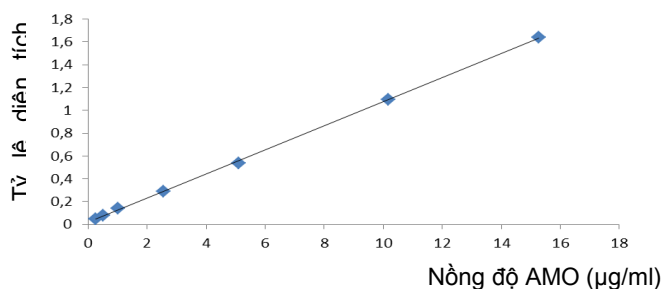
*** Giới hạn định lượng dưới:**

Phân tích 6 mẫu trắng và 6 mẫu chuẩn LLOQ (0,25 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả cho thấy: tỷ lệ đáp ứng của mẫu chuẩn gấp từ 8 - 10 lần (> 5 lần), đáp ứng của mẫu trắng; đáp ứng mẫu chuẩn có độ lặp lại cao với RSD = 2,7% (< 20%); độ đúng so với nồng độ thực có trong mẫu 88 - 96% (trong khoảng 80 - 120%). Như vậy, mẫu chuẩn chứa AMO có nồng độ 0,25 $\mu\text{g/ml}$ đáp ứng được yêu cầu LLOQ của phương pháp phân tích dịch sinh học.

*** Đường chuẩn và khoảng tuyến tính:**

Bảng 1: Tương quan nồng độ AMO và tỷ lệ diện tích pic S/IS.

NỒNG ĐỘ ($\mu\text{g/ml}$)	0,25	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	15,00
Diện tích pic S	20865	35103	62681	145799	266141	505023	811551
Diện tích pic IS	426610	433730	437419	500680	497615	461376	494456
Tỷ lệ diện tích S/IS	0,049	0,081	0,143	0,291	0,535	1,095	1,641
Phương trình hồi quy ($Y = aX+b$)*	$Y = 0,1055X + 0,0225$			$R^2 = 0,9996$			



Hình 2: Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ AMO trong huyết tương với tỷ lệ diện tích pic S/IS.

Tiến hành khảo sát độ tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 0,25 - 15,00 µg/ml. Kết quả cho thấy: trong khoảng nồng độ khảo sát, có tương quan tuyến tính (hệ số tương quan $R^2 \approx 1$) giữa nồng độ AMO trong mẫu huyết tương (X - ng/ml) với tỷ lệ diện tích pic chuẩn/nội chuẩn thu được (Y) và thể hiện qua phương trình hồi quy $Y = 0,1055 \cdot X + 0,0225$.

* **Độ đúng - độ chính xác trong ngày và khác ngày:**

Tiến hành khảo độ đúng - độ chính xác ở 3 mức nồng độ LQC (0,6 µg/ml), MQC (4,0 µg/ml) và HQC (12,0 µg/ml). Ở mỗi nồng độ, xử lý 5 mẫu độc lập và phân tích lặp lại vào 3 ngày khác nhau. Kết quả cho thấy: độ đúng trong ngày và khác ngày lần

lượt là 93,5 - 105,1% và 93,0 - 107,6% (trong khoảng 85 - 115%); độ chính xác trong ngày và khác ngày lần lượt là 1,5 - 3,3% và 2,6 - 3,4% (< 15%).

* **Tỷ lệ thu hồi:**

Xác định tỷ lệ thu hồi của chất chuẩn và nội chuẩn bằng so sánh diện tích pic của AMO và CEF từ mẫu huyết tương định lượng theo phương pháp trên với diện tích pic của chúng trong mẫu pha động có chứa cùng nồng độ chất chuẩn hoặc nội chuẩn. Kết quả cho thấy: tỷ lệ thu hồi của nội chuẩn CEF tại nồng độ 250 µg/ml là $75,4 \pm 1,9\%$ (n = 6). Hiệu suất chiết chuẩn AMO ở 3 mức nồng độ LQC, MQC và HQC cao lần lượt là $78,9 \pm 3,6\%$; $81,6 \pm 3,1\%$ và $82,2 \pm 4,0\%$, cao từ 79% với độ lặp lại cao (RSD < 5%).

* **Độ ổn định:**

Bảng 2: Kết quả nghiên cứu độ ổn định của AMO mẫu huyết tương sau 3 chu kỳ đông - rã đông.

MẪU	LQC (0,605 µg/ml)		HQC (12,10 µg/ml)	
	Ban đầu1	Sau 3 chu kỳ đông - rã đông2	Ban đầu3	Sau 3 chu kỳ đông - rã đông4
1	0,588	0,584	11,68	11,67
2	0,606	0,603	12,00	11,98
3	0,610	0,607	11,73	11,72
4	0,57	0,568	12,21	12,16
5	0,613	0,607	12,24	12,19
$\bar{X} \pm SD$	$0,597 \pm 0,018$	$0,594 \pm 0,017$	$11,97 \pm 0,26$	$11,94 \pm 0,24$
p	0,756 ($p_{1-2} > 0,05$)		0,864 ($p_{3-4} > 0,05$)	

Độ ổn định sau ba chu kỳ đông - rã đông: tiến hành chuẩn bị 3 mẫu LQC và 3 mẫu HQC, bảo quản 24 giờ ở $-40^{\circ}C$. Sau đó, để mẫu rã hoàn toàn ở nhiệt độ phòng,

để lại tủ lạnh. Phân tích mẫu sau 3 chu kỳ đông rã và so sánh với mẫu fresh. Kết quả cho thấy: mẫu ổn định sau 3 chu kỳ đông rã.

Bảng 3: Kết quả nghiên cứu ổn định ngắn ngày của AMO trong huyết tương.

MẪU	LQC (0,610 µg/ml)		HQC (12,20 µg/ml)	
	Xử lý ngay ¹	Sau 6 giờ/ nhiệt độ phòng ²	Xử lý ngay ³	Sau 6 giờ/ nhiệt độ phòng ⁴
1	0,61	0,61	12,07	12,06
2	0,61	0,61	12,18	12,19
3	0,58	0,58	12,21	12,15
4	0,62	0,61	12,02	11,95
5	0,62	0,62	11,74	11,69
$\bar{X} \pm SD$	0,608 ± 0,016	0,606 ± 0,015	12,04 ± 0,19	12,01 ± 0,20
p	0,846 (p1-2 > 0,05)		0,776 (p3-4 > 0,05)	

Độ ổn định ngắn hạn: đánh giá độ ổn định trên 3 mẫu LQC, 3 mẫu HQC phân tích ngay sau khi rã đông và sau rã đông 6 giờ ở nhiệt độ phòng, mẫu ổn định sau rã đông 6 giờ ở nhiệt độ phòng.

Bảng 4: Kết quả nghiên cứu ổn định dài ngày của AMO trong huyết tương.

MẪU	LQC (0,600 µg/ml)			HQC (12,00 µg/ml)		
	Ban đầu ¹	Sau 14 ngày ²	Sau 28 ngày ³	Ban đầu ⁴	Sau 14 ngày ⁵	Sau 28 ngày ⁶
1	0,601	0,613	0,591	11,79	11,76	11,74
2	0,633	0,622	0,623	12,00	11,98	11,92
3	0,585	0,581	0,570	11,86	11,8	11,74
4	0,596	0,580	0,582	12,18	12,19	12,13
5	0,611	0,614	0,614	11,72	11,7	11,66
TB	0,605	0,602	0,596	11,91	11,886	11,838
SD	0,018	0,020	0,022	0,180	0,200	0,190
p		p1-2 = 0,797	p1-3 = 0,492		p4-5 = 0,848	p4-6 = 0,556

Độ ổn định dài ngày: đánh giá độ ổn định của mẫu huyết tương trên các mẫu LQC và HQC. Xác định nồng độ AMO có trong mẫu tại những thời điểm ngay sau khi pha và sau 14,28 ngày bảo quản mẫu ở -40°C, theo phương pháp phân tích đã được xây dựng. Kết quả cho thấy mẫu ổn định trong thời gian 28 ngày (p > 0,05).

Kết quả thẩm định độ đặc hiệu - chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, hiệu suất chiết và độ ổn định cho thấy: phương pháp xây dựng đáp ứng yêu cầu của một phương pháp phân tích dùng trong sinh học, có thể áp dụng để định lượng AMO trong huyết tương lợn khi nghiên cứu sinh khả dụng và đánh giá TĐSH các chế phẩm chứa AMO.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng AMO trong huyết tương lợn như sau: lấy 1 ml mẫu được thêm 50 µl nội chuẩn và 100 µl HClO₄ 15% (KL/KL), lắc xoáy 30 giây. Ly tâm lạnh (4°C) với 10.000 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần dịch trong để phân tích HPLC. Điều kiện sắc ký: cột Gemini C18, 5 µm, 250 x 4 mm; 40°C; pha động ACN: Na₂HPO₄ 0,01M pH 4,8 (5/95, v/v), 1,0 ml/phút; detector UV 230 nm; thể tích tiêm mẫu 50 µl; nhiệt độ buồng tiêm mẫu 4°C. Nội chuẩn: CEF 250 µg/ml (pha trong đệm).

Quy trình định lượng AMO trong dịch sinh học xây dựng đã đáp ứng tất cả yêu cầu của phương pháp phân tích dịch sinh học theo quy định của FDA Mỹ về thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học (2001).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Văn Đôn, Quách Thị Hà Vân và CS. Nghiên cứu định lượng pantoprazol trong huyết tương chó bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tạp chí Y - Dược Quân sự. 2010, số 7, tr.12-19.
2. Center for drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation. FDA, US, Department of Health and Human Service. 2001.
3. N.V.S. Ramakrishna, K.N. Vishwottam, S. Wishu, M. Koteshwara. High-performance liquid chromatography method for the quantification of amoxiciline in human plasma. Journal of Chromatography B. 2005, 822, pp.326-329.
4. M. A. Pue, J. Laroche, I. Meineke, C. de Mey. Pharmacokinetics of amoxiciline following single intravenous and oral administration to healthy male subjects. Eur J Clin Pharmacol. 1993, 44, pp.575-578.
5. T.R. Krishnan, Isaac Abraham and Sylvia Craig. Use of the domestic pig as a model for oral bioavailability and pharmacokinetic studies. Biopharmaceuticals and Drug Disposition. 1994, 15, pp.341-346.

Ngày nhận bài: 4/9/2012

Ngày giao phản biện: 10/10/2012

Ngày giao bản thảo in: 16/11/2012

