

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



TẠ MẠNH HÙNG

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG
ATENOLOL VÀ CÁC ĐỒNG PHÂN ĐỐI
QUANG TRONG MỘT SỐ CHẾ PHẨM
THUỐC VÀ TRONG DỊCH SINH HỌC**

Chuyên ngành: **KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT**
Mã số: **62720410**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2016

Công trình được hoàn thành tại:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Trịnh Văn Lầu**
- 2. PGS.TS. Nguyễn Thị Kiều Anh**

Phản biện 1:

.....

Phản biện 2:

.....

Phản biện 3:

.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
họp tại:

.....

.....

Vào hồigiờ.....ngày.....tháng.....năm 2016.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia Việt Nam

Thư viện Trường đại học Dược Hà Nội.

A – GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Theo thống kê, khoảng 50% số hoạt chất đang lưu hành trên thị trường dược phẩm là các hợp chất có đồng phân đối quang (ĐPDQ) và gần 1/3 trong số này, các ĐPDQ của dược chất có đặc tính dược lý, dược lực học, độc tính... không giống nhau. Atenolol (ATN) dẫn chất của benzenacetamid, có tác dụng ức chế chọn lọc β -adrenergic, được dùng trong điều trị tăng huyết áp là một trong số những dược chất có các đặc điểm nêu trên. Trong hai ĐPDQ, đồng phân tả tuyền (*S*-ATN) có tác dụng ức chế β -adrenergic cao hơn khoảng 50 lần và ít tác dụng phụ hơn so với đồng phân hữu tuyền (*R*-ATN). Để giảm lượng dược chất đưa vào cơ thể, giảm tác dụng không mong muốn của *R*-ATN và duy trì quyền bảo hộ, nhiều công ty dược đã và đang nghiên cứu sản xuất các chế phẩm thuốc chỉ có dược chất *S*-ATN với hàm lượng bằng 1/2 thuốc ATN racemic.

Xu hướng nghiên cứu chuyển các thuốc có các ĐPDQ tác dụng dược lý khác nhau ở dạng racemic thành thuốc chứa một ĐPDQ đang là một hướng phát triển mới của ngành công nghiệp dược trong những năm gần đây. Hướng phát triển này, đòi hỏi phải có các phương pháp phân tích ĐPDQ trong kiểm tra chất lượng, nghiên cứu sinh khả dụng (SKD) và đánh giá tương đương sinh học (TĐSH) các thuốc. Tuy nhiên, các ĐPDQ có cấu tạo hóa học giống nhau, nhiều tính chất lý-hóa tương tự nhau nên phân tích ĐPDQ trong chế phẩm thuốc và đặc biệt trong dịch sinh học còn gặp nhiều khó khăn.

Do vậy, luận án “**Nghiên cứu định lượng atenolol và các đồng phân đối quang trong một số chế phẩm thuốc và trong dịch sinh học**” đã được thực hiện.

2. Mục tiêu của luận án

Luận án được thực hiện với mục tiêu nghiên cứu các phương pháp phân tích ATN và các ĐPDQ trong chế phẩm thuốc và trong huyết tương (HT) nhằm góp phần kiểm soát chất lượng thuốc và so sánh SKD,

TĐSH các thuốc ATN đang lưu hành trên thị trường. Để đạt được mục tiêu này, luận án thực hiện các nội dung chính sau:

- 1) Nghiên cứu xây dựng, thẩm định phương pháp phân tích các ĐPĐQ của ATN trong chế phẩm thuốc.
- 2) Nghiên cứu xây dựng, thẩm định phương pháp phân tích ATN và các ĐPĐQ trong huyết tương.
- 3) Ứng dụng các phương pháp phân tích (PPPT) đồng phân trong kiểm tra chất lượng và nghiên cứu SKD, đánh giá TĐSH một số chế phẩm thuốc ATN đang lưu hành trên thị trường.

3. Những đóng góp mới của luận án

✧ *Lần đầu tiên tại Việt Nam, xây dựng thành công các phương pháp điện di mao quản (CE), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lỏng–khối phổ (LC-MS/MS) phân tích ATN và các ĐPĐQ trong chế phẩm thuốc và trong HT người.*

- Phương pháp CE phân tách các ĐPĐQ của ATN trong chế phẩm với cột mao quản silica nung chảy cùng dung dịch điện ly nền chứa tác nhân hoạt quang carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM- β -CD) đáp ứng các yêu cầu của Dược điển Việt Nam, Anh, Mỹ.
- Phương pháp HPLC sử dụng cột sắc ký chứa pha tĩnh đối quang cellobiohydrolase có thời gian phân tích ngắn (dưới 8 phút), độ phân giải giữa các pic đồng phân lớn ($R_s > 5$), giới hạn định lượng nhỏ (0,273 ppm) không những phù hợp để phân tích các ĐPĐQ của ATN trong chế phẩm thuốc mà còn thích hợp để xác định hàm lượng tạp chất đối quang R-ATN trong các mẫu nguyên liệu và chế phẩm thuốc đơn đồng phân S-ATN với mức giới hạn rất thấp (dưới 0,1%).
- Phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN toàn phần trong HT người với cột C18 có kích thước hạt nhỏ và xác định nồng độ ATN bằng MS/MS với nguồn ion hóa ESI (+) có thời gian phân tích rất ngắn (2,5 phút), giới hạn định lượng dưới rất nhỏ (5 ppb).
- Phương pháp LC-MS/MS phân tích các ĐPĐQ của ATN trong HT người bằng LC-MS/MS với cột sắc ký chứa pha tĩnh đối quang và

xác định nồng độ ATN trong mẫu bằng MS/MS với nguồn ESI (+) có thời gian phân tích ngắn, độ phân giải giữa các pic đồng phân lớn, giới hạn định lượng dưới rất nhỏ (2,5 ppb).

Phương pháp LC-MS/MS định lượng các ĐPDQ của ATN trong HT người nghiên cứu trong luận án được công bố lần đầu.

✧ *Lần đầu tiên tại Việt Nam, đã kiểm tra chất lượng và nghiên cứu SKD in vivo một số thuốc ATN (dạng racemic và dạng S-ATN) đang lưu hành bằng các phương pháp phân tích đồng thời ĐPDQ.*

- Các mẫu thuốc S-ATN có hàm lượng tạp ĐPDQ liên quan R-ATN không giống nhau, 1 mẫu có hàm lượng tạp > 2,0%.
- SKD của R-ATN và S-ATN trên người tình nguyện (NTN) tương tự nhau, không có sự chuyển dạng giữa các đồng phân. S-ATN trong thuốc đơn đồng phân có SKD cao hơn so với S-ATN trong thuốc racemic. Các thuốc ATN racemic có C_{max} , AUC và T_{max} tương đương nhau. Các thuốc S-ATN có C_{max} và AUC khác nhau.

4. Ý nghĩa của luận án

Phân tích ĐPDQ trong chế phẩm và đặc biệt là phân tích các ĐPDQ trong dịch sinh học cho đến nay vẫn là một trong các chủ đề phân tích khá khó khăn không những ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước khác. Việc xây dựng thành công các phương pháp phân tích ĐPDQ của ATN trong chế phẩm thuốc và trong HT giúp nâng cao năng lực kiểm tra, giám sát chất lượng các thuốc đối quang của hệ thống kiểm nghiệm trong nước.

Kết quả kiểm tra chất lượng, nghiên cứu SKD và đánh giá TĐSH một số chế phẩm thuốc ATN đang lưu hành trên thị trường cho thấy sự cần thiết phải có các phương pháp phân tích ĐPDQ để đảm bảo chất lượng, hiệu quả điều trị và công bằng thương mại giữa các thuốc đối quang dạng racemic và dạng đơn đồng phân.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 4 chương, 58 bảng, 66 hình, 206 tài liệu tham khảo với 19 tài liệu tiếng Việt, 187 tài liệu tiếng Anh và 6 phụ lục.

Luận án dài 148 trang, gồm các phần chính: Đặt vấn đề (2 trang);

Chương 1: Tổng quan (46 trang); Chương 2: Nguyên liệu, trang thiết bị, nội dung và phương pháp nghiên cứu (13 trang); Chương 3: Kết quả nghiên cứu (68 trang); Chương 4: Bàn luận (16 trang); Kết luận và kiến nghị (3 trang).

B – NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

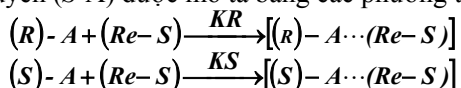
Đã trình bày và tập hợp có hệ thống 3 nội dung chính liên quan đến luận án bao gồm:

- Khái niệm thuốc chứa dược chất đối quang; tầm quan trọng của phân tích ĐPDQ; tình hình nghiên cứu phân tích ĐPDQ trong nước; nguyên lý phân tích ĐPDQ và các phương pháp phân tích ĐPDQ thường gặp.
- Kỹ thuật xử lý, chiết tách hoạt chất cần phân tích trong mẫu dịch sinh học; phân tích thuốc trong dịch sinh học bằng LC-MS/MS và các yêu cầu thẩm định PPPT thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA.
- Tổng quan về atenolol; các nghiên cứu phân tích ATN và ĐPDQ trong chế phẩm thuốc và trong dịch học từ trước đến nay ở Việt Nam và trên thế giới.

ĐPDQ là hai đồng phân không gian dạng ảnh và vật qua gương, chúng có công thức hóa học hoàn toàn giống nhau chỉ khác về cách bố trí không gian của các nhóm thế quanh trung tâm bất đối xứng của phân tử. Sự khác nhau về cấu trúc không gian của các nhóm thế làm cho mỗi dạng đồng phân có tương tác khác nhau với một thụ thể sinh học xác định (tương tự như phản ứng đặc hiệu “chất mang-thụ thể” của các enzym). Lịch sử y văn thế giới từng ghi nhận một thảm họa y học liên quan đến ĐPDQ tả tuyền trong thuốc thalidomid dạng racemic (*hội chứng phocomelia*) nhưng số lượng các thuốc chứa dược chất đối quang vẫn không ngừng gia tăng qua các năm vừa qua. Theo thống kê, khoảng 50% số hoạt chất đang lưu hành trên thị trường dược phẩm là các hợp chất có tính đối quang và gần 1/3 trong số này, các ĐPDQ của dược chất

có đặc tính sinh học trên cơ thể sống không giống nhau. Các thuốc có doanh số bán chạy nhất toàn cầu các năm 2006 – 2012 đều là các thuốc chứa dược chất đối quang. Xu hướng này đòi hỏi phải có các PPPT phù hợp trong nghiên cứu phát triển sản phẩm cũng như trong kiểm tra chất lượng, nghiên cứu SKD và đánh giá TĐSH các thuốc đối quang.

Các ĐPĐQ có công thức cấu tạo hóa học giống nhau và nhiều tính chất lý-hóa tương tự nhau nên trên thực tế không thể phân tích bằng các phương pháp HPLC, GC hoặc CE thông thường. Đặc điểm thường được sử dụng để phân tách hai ĐPĐQ của một hỗn hợp racemic bằng các PPPT hóa lý là khả năng tương tác khác nhau của các ĐPĐQ đối với một chất chọn lọc hoạt quang xác định. Trong dung dịch, sự tương tác giữa tác nhân chọn lọc hoạt quang (*Re-S*) và các đồng phân hữu tuyến (*R-A*) hoặc tả tuyến (*S-A*) được mô tả bằng các phương trình phản ứng:



Hỗn hợp các phức hợp phi đối quang tạo thành có năng lượng và độ bền liên kết khác nhau phụ thuộc vào cấu tạo của đồng phân và tác nhân hoạt quang. Sự khác biệt giữa các hằng số tạo phức K_R , K_S và sự khác biệt về độ bền của các phức hợp tạo thành là cơ sở hóa lý của việc phân tích đồng phân đối quang bằng phương pháp sắc ký hoặc điện di. Tùy theo cơ chế tạo phức và đặc điểm của PPPT, các tác nhân chọn lọc hoạt quang có thể được thêm vào hệ thống phân tích theo một trong hai cách là trực tiếp hoặc gián tiếp.

Atenolol là một dẫn chất của benzenacetamid (CTPT: $C_{14}H_{22}N_2O_3$, KLPT: 266,3 g/mol) và có tên khoa học là 4-[2-hydroxy-3-[(1-metyletyl)amino]propoxy] benzeneacetamid. Do phân tử có cấu tạo bất đối xứng, trong công thức cấu tạo phân tử, nguyên tử carbon bất đối ở mạnh nhánh liên kết các nhóm thế khác nhau nên ATN có các ĐPĐQ tả tuyến và hữu tuyến. Trong hai ĐPĐQ, *S*-ATN có tác dụng ức chế chọn lọc β -adrenergic cao hơn và các tác dụng phụ như loạn nhịp, đánh trống ngực ít hơn so với *R*-ATN. ATN là một trong số ít các dược chất đối

quang, đã được Cơ quan quản lý thuốc của một số nước đồng ý cấp phép cho lưu hành song song ở cả hai dạng ATN racemic và *S*-ATN. Các thuốc đơn đồng phân *S*-ATN có hàm lượng bằng 1/2 hàm lượng thuốc ATN racemic. Tuy vậy, ATN là một dược chất có SKD không cao, nồng độ dược chất trong máu thấp và dao động mạnh giữa các cá thể đồng thời SKD của *S*-ATN so với ATN racemic chưa được nghiên cứu, thiết lập đầy đủ. Do đó, cần thiết phải xây dựng PPPT các ĐPĐQ của ATN trong chế phẩm thuốc và trong dịch sinh học nhằm đánh giá chất lượng và so sánh SKD các thuốc đối quang ATN.

Việc nghiên cứu phân tích và quản lý chất lượng thuốc đối quang ATN nói riêng và một số thuốc đối quang khác nói chung tại Việt Nam còn nhiều hạn chế và mới được quan tâm trong một số năm gần đây. Dược điển Việt Nam lần xuất bản thứ IV năm 2009, mới chỉ có 03 chuyên luận quy định mức giới hạn tạp chất đối quang cho các dược chất dexclopheniramin, lamivudin và timolol. Trong những năm gần đây mới có khoảng 10 nghiên cứu phân tích tạp chất đối quang trong các chế phẩm thuốc được tiến hành. Chưa có nghiên cứu nào, phân tích ĐPĐQ của ATN trong chế phẩm và trong dịch sinh học được công bố.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, trang thiết bị

2.1.1. Dung môi, hóa chất và chất chuẩn

- Chất chuẩn: Atenolol – VKNTTW, hàm lượng 100,17%, độ ẩm 0,11%; SKS: 0102093. *S*-ATN – Sigma, hàm lượng 99,3%, lô: 021M4620V. *R*-ATN – Sigma, hàm lượng 99,9%, lô: STBD2674V.
- Các dung môi, hóa chất thuốc thử dùng trong nghiên cứu: Đạt tiêu chuẩn LC-MS, HPLC và tinh khiết hóa học tùy theo từng loại.
- Các mẫu HT do Viện huyết học và truyền máu TW cung cấp dùng trong xây dựng và thẩm định PPPT trong dịch sinh học.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ phân tích

- Tất cả các thiết bị được kiểm tra, hiệu chuẩn định kỳ đáp ứng yêu cầu

GLP và ISO-IEC 17025, bao gồm các thiết bị phân tích: Máy HPLC: (Shimadzu–Nhật Bản); máy UPLC-MS/MS (Thermo Scientific–Mỹ); máy CE (Agilent–Mỹ). Ngoài các thiết bị phân tích chính nêu trên còn có cân phân tích ($d = 0,01$ và $0,1$ mg), máy đo pH, máy thử độ hòa tan, các thiết bị xử lý, chiết tách và bảo quản mẫu như: Máy lắc siêu âm, lắc cơ học, ly tâm, tủ lạnh sâu bảo quản mẫu...

- Các dụng cụ phân tích bao gồm: Cột điện di mao quản silica nung chảy; các cột HPLC có thành phần pha tĩnh hoạt quang khác nhau; micropipet và các loại dụng cụ thủy tinh chính xác, dụng cụ thủy tinh pha và xử lý mẫu...

2.2. Đối tượng nghiên cứu

2.2.1. Mẫu thuốc nghiên cứu

- Thuốc viên nén ATN dạng racemic: 03 thuốc Việt Nam sản xuất và 01 thuốc biệt dược gốc (Ternomin 50mg – AstraZeneca, Anh).

- Thuốc viên nén S-ATN: 01 thuốc do AhGook Pharm. Ltd., Hàn Quốc sản xuất và 03 thuốc của Emcure Pharmaceutical Ltd., Ấn Độ.

2.2.2. Mẫu huyết tương người chứa atenolol

- Các mẫu HT tự tạo chứa ATN: Hòa tan chuẩn ATN hoặc chuẩn R-ATN hay chuẩn S-ATN trong HT trắng với các nồng độ khác nhau.

- Mẫu thử: Các mẫu HT của NTN tham gia nghiên cứu khảo sát SKD/TĐSH các thuốc ATN (racemic hay S-ATN) hoặc các mẫu HT của bệnh nhân sử dụng các chế phẩm thuốc ATN.

2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nghiên cứu định lượng atenolol và ĐPĐQ trong chế phẩm

2.3.1.1. Khảo sát xây dựng phương pháp

- Phương pháp CE: Nghiên cứu phân tách các ĐPĐQ bằng phương pháp điện di mao quản vùng trên cột mao quản silica nung chảy với các dung dịch điện ly nền chứa tác nhân chọn lọc hoạt quang khác nhau. Nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố như thành phần, pH, nồng độ dung dịch đệm; bản chất, nồng độ tác nhân chọn lọc hoạt quang... đến khả năng tách đồng phân ATN để lựa chọn điều kiện điện di phù hợp.

- Phương pháp HPLC: nghiên cứu phân tích các ĐPDQ của ATN với các cột sắc ký chứa pha tĩnh đối quang có thành phần và bản chất khác nhau. Đối với mỗi loại cột, tiến hành khảo sát: thành phần, tỷ lệ các thành phần trong pha động; ảnh hưởng của pH dung dịch đệm... đến khả năng phân tách các ĐPDQ.

2.3.1.2. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định các PPPT theo hướng dẫn thẩm định của dược điển với các chỉ tiêu: Độ thích hợp của hệ thống; độ đặc hiệu-chọn lọc; khoảng nồng độ tuyến tính; giới hạn LOD, LOQ; độ đúng; độ chụm.

2.3.1.3. Ứng dụng PPPT kiểm tra chất lượng các thuốc atenolol

- Xác định hàm lượng các ĐPDQ của ATN trong một số chế phẩm thuốc đang lưu hành bằng các phương pháp HPLC, CE đã được nghiên cứu xây dựng và thẩm định ở trên. Phân tích thống kê, so sánh kết quả định lượng ATN của các phương pháp. So sánh kết quả định lượng ATN toàn phần bằng các phương pháp nghiên cứu trong luận án với phương pháp của Dược điển Mỹ.

- Phân tích xác định hàm lượng tạp chất R-ATN trong các chế phẩm S-ATN bằng các phương pháp nghiên cứu trong luận án. Từ kết quả phân tích, so sánh chất lượng các sản phẩm.

- Đánh giá tương đương độ hòa tan *in vitro* của các thuốc theo hướng dẫn của WHO, US-FDA trong đó sử dụng các PPPT nghiên cứu trong luận án để xác định hàm lượng ATN và ĐPDQ của các thuốc hòa tan trong môi trường thử.

2.3.2. Nghiên cứu định lượng atenolol và ĐPDQ trong huyết tương

2.3.2.1. Khảo sát xây dựng phương pháp LC-MS/MS

- Quy trình xử lý mẫu HT: Nghiên cứu kỹ thuật xử lý mẫu khác nhau như tủa protein hoặc chiết lỏng-lỏng với các dung môi hữu cơ. Từ kết quả thực nghiệm, lựa chọn quy trình xử lý mẫu đơn giản, thu hồi ATN và chất chuẩn nội với hiệu suất cao và ổn định đồng thời không gây ảnh hưởng nền mẫu khi phân tích bằng MS.

- Nghiên cứu điều kiện sắc ký: Khảo sát với điều kiện sắc ký khác nhau.

Lựa chọn điều kiện sắc ký phân tách được các ĐPĐQ và có thể ghép nối được với đầu dò MS.

- Nghiên cứu các điều kiện MS/MS: Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố như điện thế, nhiệt độ đầu phun; lưu lượng khí nitrogen cung cấp cho nguồn ion... tới quá trình ion hóa ATN tại nguồn ESI. Nghiên cứu quá trình phân mảnh ion $[ATN+H]^+$, xác định cơ chế phân mảnh; số khối của ion con dùng để định tính, định lượng ATN trong PPPT và mức năng lượng tối ưu cho quá trình phân mảnh.

2.3.2.2. *Thẩm định phương pháp LC-MS/MS*

Tiến hành theo hướng dẫn thẩm định PPPT thuốc trong dịch sinh học của Mỹ và châu Âu các chỉ tiêu: Độ đặc hiệu-chọn lọc; khoảng nồng độ tuyến tính; giới hạn định lượng dưới; ảnh hưởng của nền mẫu; độ đúng; độ độ chụm; độ thu hồi hoạt chất, chuẩn nội và độ ổn định.

2.3.2.3. *Phân tích ATN và ĐPĐQ trong HT người bằng LC-MS/MS*

- Phân tích xác định nồng độ ATN và ĐPĐQ trong các mẫu HT một số bệnh nhân bằng phương pháp LC-MS/MS đã nghiên cứu.

- Phân tích xác định nồng độ ATN và ĐPĐQ trong các mẫu HT của 18 NTN tham gia nghiên cứu khảo sát SKD hai thuốc ATN racemic; hai thuốc S-ATN và so sánh SKD của một thuốc S-ATN so với thuốc ATN racemic biệt dược gốc. Từ các kết quả phân tích, xác định các thông số ĐĐH (C_{max} , T_{max} , AUC_{0-t} ; $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$) của các ĐPĐQ và so sánh SKD, TĐSH của các thuốc ATN racemic và S-ATN.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân tích atenolol và các ĐPĐQ trong chế phẩm thuốc

3.1.1. Nghiên cứu phương pháp CE phân tích ĐPĐQ atenolol

3.1.1.1. Khảo sát, lựa chọn các điều kiện điện di

Đã nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố như: thành phần dung dịch đệm, tác nhân đối quang trong dung dịch điện ly nền, ảnh hưởng của pH dung dịch đệm, hiệu điện thế ở hai đầu mao quản... đến khả năng phân tách các ĐPĐQ của ATN trên hệ thống CE.

Từ các kết quả thực nghiệm và nhận xét ảnh hưởng của các yếu tố đã

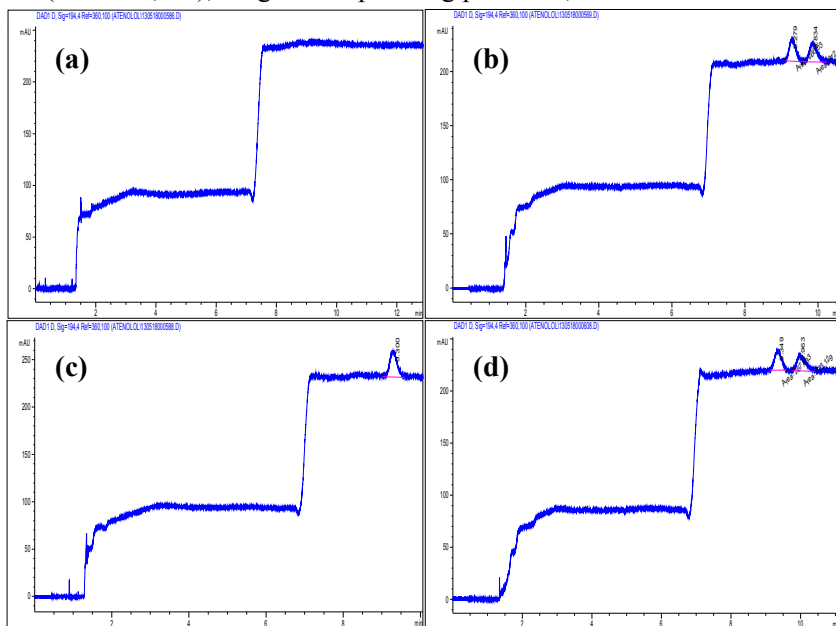
xây dựng được phương pháp điện di mao quản vùng (CZE) phân tích các ĐPDQ của ATN trong chế phẩm thuốc như sau:

- Cột mao quản silica nung chảy kích thước 48,5 cm × 50 μm (chiều dài hiệu dụng 40 cm). Nhiệt độ: 25 °C, điện thế hai đầu mao quản 25 kV.
- Dung dịch điện ly nền: Đệm Tris(hydroxymethyl)-amino methan 50 mM, pH 4,0 (TRIS pH 4) chứa 8 mM Carboxymetyl-β-CD (CM-β-CD).

3.1.1.2. Thẩm định phương pháp CE

Tiến hành theo hướng dẫn thẩm định phương pháp của các dược điển và cho kết quả như sau:

- PPPT đặc hiệu-chọn lọc đối với các ĐPDQ của ATN. Điện di đồ các mẫu chuẩn *R,S*-ATN, *S*-ATN, mẫu thử ATN racemic và mẫu giả dược được trình bày ở Hình 3.5. Điện di 6 mẫu chuẩn *R,S*-ATN, giá trị t_M của các đồng phân *S*-, *R*-ATN lần lượt là 9,321 và 9,924 min (RSD < 2,0%); R_s giữa các pic đồng phân là 2,74.



Hình 3.5. Điện di đồ các mẫu placebo (a), chuẩn *R,S*-atenolol (b), chuẩn *S*-atenolol (c) và mẫu thử Atenolol STADA (d)

- Khoảng nồng độ tuyến tính từ 20–70 $\mu\text{g/ml}$ đối với các ĐPDQ và từ 40–140 $\mu\text{g/ml}$ đối với *R,S*-ATN, hệ số tương quan $r > 0,99$.
- Độ đúng của phương pháp đối với *S*-ATN là $98,9 \pm 0,51\%$ ($n = 9$) đối với *R*-ATN là $99,5 \pm 0,89\%$ ($n = 9$).
- Giá trị RSD% độ lặp lại của *S*-ATN, *R*-ATN lần lượt là 1,35 và 1,59% ($n = 6$). Giá trị RSD% độ chính xác trung gian của *S*-ATN, *R*-ATN lần lượt là 1,18 và 1,32% ($n = 9$).

3.1.2. Định lượng các ĐPDQ của ATN trong chế phẩm bằng HPLC

3.1.2.1. Nghiên cứu xây dựng phương pháp HPLC

Tiến hành nghiên cứu khả năng phân tách các ĐPDQ của ATN bằng 5 cột HPLC chứa pha tĩnh đối quang khác nhau: Cột Ultron ES – OVM (ovomucoid protein), Chiralcel AGP (α 1-acid glycoprotein), Chirex 3022 (tác nhân hoạt quang kiểu Pirkle), Astec Cyclobond I (dẫn chất β -CD tự nhiên) và Chiralpak CBH (cellobiohydrolase).

Từ các kết quả thực nghiệm và phân tích khả năng phân tách của hệ sắc ký đã xây dựng được 2 phương pháp HPLC sử dụng đầu dò mảng diode và cột sắc ký đối quang phân tích các ĐPDQ của ATN trong chế phẩm:

❖ Phương pháp 1:

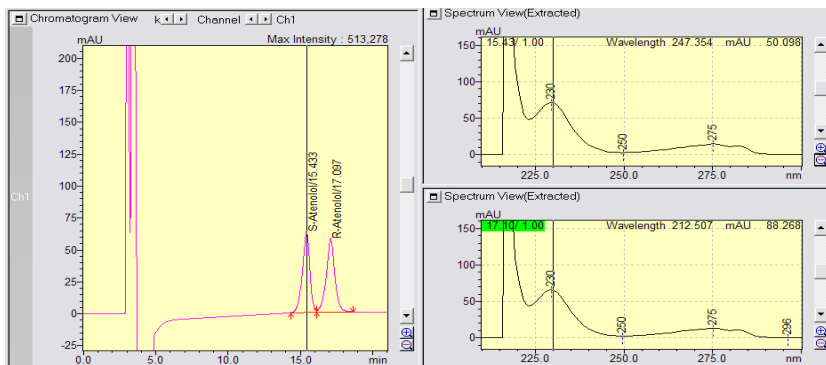
- Cột Chirex 3022 (4,0 x 250 mm; 5 μm).
- Pha động: n-hexan – 1,2 diclorometan – MeOH – acid TFA, tỷ lệ 57,5 : 35 : 7,5 : 0,2 (v/v/v/v). Tốc độ dòng 1 ml/phút.

❖ Phương pháp 2:

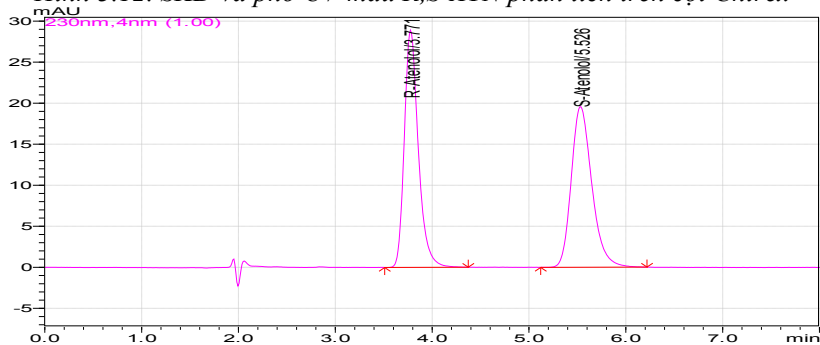
- Cột Chiralpak CBH (4,0 x 150 mm; 5 μm).
- Pha động: 2-propanol – dung dịch đệm amoni acetat 10 mM, pH 5,9 tỷ lệ 10 : 90 (v/v). Tốc độ dòng 0,7 ml/phút.

Sắc ký đồ phân tích mẫu chuẩn *R,S*-ATN bằng hai phương pháp HPLC được trình bày ở Hình 3.12 và Hình 3.13.

Phân tích trên cột Chiralpak CBH, độ phân giải giữa các pic ĐPDQ lớn ($R_s > 5$), thời gian phân tích ngắn (dưới 8 min). Do vậy, trong luận án chỉ trình bày kết quả thẩm định PPPT các ĐPDQ của ATN trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC với cột Chiralpak CBH.



Hình 3.12. SKĐ và phổ UV mẫu R,S-ATN phân tích trên cột Chirex



Hình 3.13. SKĐ mẫu R,S-ATN phân tích trên cột Chiralpak CBH

3.1.2.2. Thẩm định phương pháp HPLC

Tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của các dược điển cho kết quả:

- Phương pháp đặc hiệu-chọn lọc với ATN. SKĐ mẫu giả dược không có pic. Phân tích 06 mẫu chuẩn R,S-ATN, trên SKĐ các pic ĐPĐQ tách nhau với $R_s = 5,298$; t_R của R- và S-ATN lần lượt là 3,772 và 5,524 min ($RSD < 0,5\%$). Các pic cân đối, RSD diện tích, chiều cao các pic đều $< 1,0\%$. SKĐ mẫu thử các pic có t_R và phổ UV tương ứng với các pic trên SKĐ mẫu chuẩn.
- Khoảng nồng độ tuyến tính đối với các ĐPĐQ đều từ 2,5 đến 50 $\mu\text{g/ml}$, hệ số tương quan $r > 0,999$.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp đối với các ĐPĐQ là khoảng

0,08 µg/ml; giới hạn định lượng đối với R-ATN là 0,272 µg/ml (tương đương với mức giới hạn 0,02% so với hàm lượng S-ATN).

- Phương pháp có độ đúng $\approx 99,0\%$ (min: 98,1%; max: 99,6%). Độ chính xác với RSD $< 2,0\%$.

3.1.3. Phân tích ATN và các ĐPĐQ trong chế phẩm

3.1.3.1. Định lượng ATN và các ĐPĐQ trong chế phẩm

- Tiến hành phân tích xác định hàm lượng ATN và các ĐPĐQ trong 8 mẫu thuốc (4 mẫu racemic, 4 mẫu S-ATN) bằng các phương pháp HPLC, CE đã nghiên cứu. Các mẫu thuốc đều đạt yêu cầu về % hàm lượng hoạt chất so nhãn (nằm trong giới hạn 90 – 110%).

- Hàm lượng ATN và các ĐPĐQ trong mẫu thử xác định bằng HPLC và CE khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,05$). Hai phương pháp có độ chính xác tương đương nhau.

- Phân tích ANOVA (Bảng 3.13), hàm lượng ATN toàn phần trong mẫu thử xác định bằng các phương pháp nghiên cứu trong luận án và hàm lượng ATN toàn phần xác định bằng phương pháp HPLC của Dược điển Mỹ (điều kiện sắc ký không tách ĐPĐQ) không khác biệt.

Bảng 3.13. So sánh kết quả định lượng ATN bằng các phương pháp

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	F_{TN} value	P value
Giữa các PP	0,421333	2	0,210667	0,34	0,72
Trong mỗi PP	7,516000	12	0,626333		
Tổng	7,937333	14			

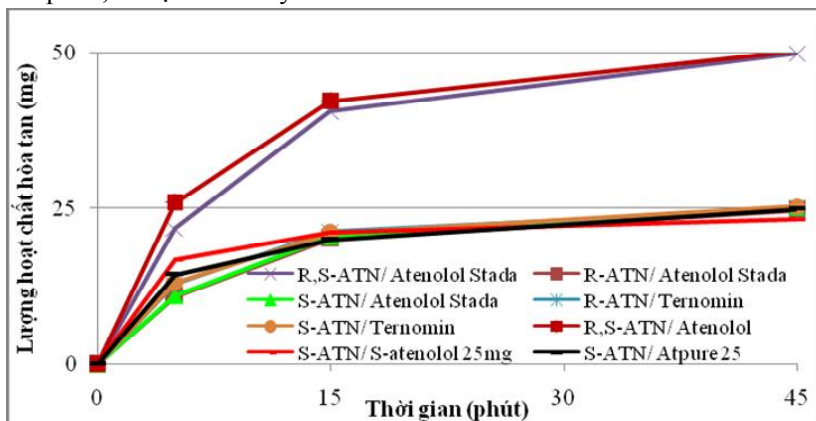
3.1.3.2. Xác định hàm lượng tạp R-ATN trong các mẫu thuốc S-ATN

Phân tích xác định hàm lượng tạp ĐPĐQ liên quan R-ATN trong 04 mẫu thuốc S-ATN bằng phương pháp HPLC nghiên cứu trong luận án. Kết quả có 3 mẫu thuốc giới hạn tạp chất đạt yêu cầu, 1 mẫu thuốc có giới hạn tạp chất $> 2,0\%$.

3.1.3.3. Định lượng ATN và ĐPĐQ trong so sánh độ hòa tan in vitro

Kết quả thực nghiệm cho thấy, phương pháp HPLC đã xây dựng phù hợp để xác định ATN và các ĐPĐQ hòa tan trong các môi trường thử độ

hòa tan. Các đồng phân *S*- và *R*-ATN của thuốc racemic có tỷ lệ hòa tan tại các thời điểm tương tự nhau. Độ hòa tan *in vitro* của các thuốc tương đương nhau. Biểu đồ hòa tan của các thuốc trong môi trường thử độ hòa tan pH 1,2 được trình bày ở Hình 3.19.



Hình 3.19. Biểu đồ hòa tan của các thuốc trong môi trường pH 1,2

3.2. Phân tích atenolol và các ĐPĐQ trong huyết tương

3.2.1. Định lượng các ĐPĐQ của ATN trong HT bằng LC-MS/MS

3.2.1.1. Nghiên cứu xây dựng phương pháp

Tiến hành các nghiên cứu khảo sát quy trình xử lý mẫu HT, điều kiện sắc ký và điều kiện MS/MS như Mục 2.3.2.1. Từ các kết quả thực nghiệm, xây dựng được phương pháp LC-MS/MS định lượng các ĐPĐQ của ATN trong HT như sau:

- ❖ *Quy trình xử lý mẫu HT*: 1,0 ml HT, thêm 50 µl dung dịch IS và 500 µl NH₄OH 0,1M. Chiết với 5 ml cloroform. Lắc cơ học, ly tâm 3000 vòng/phút x 5 phút. Lấy lớp cloroform, cô bay hơi dung môi đến cạn. Hòa cần trong 1,0 ml pha động và sắc ký.

- ❖ *Điều kiện sắc ký*: Cột Chiralpak CBH (4,0 x 150 mm; 5 µm). Pha động: 2-PrOH – amoni acetat 10 mM (pH 5,9) tỷ lệ 10:90. Tốc độ 0,7 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu 5 µl

- ❖ *Điều kiện khối phổ*: Phổ khối Triple Quadrupole MS/MS, nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ như Bảng 3.17.

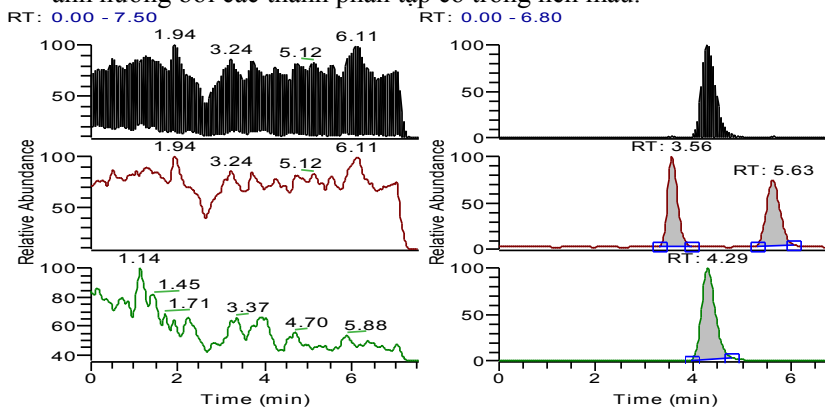
Bảng 3.17. Điều kiện khối phổ định lượng atenolol và chuẩn nội

Hoạt chất Thông số	R-ATN	S-ATN	Esomeprazol (IS)
Điện thế nguồn phun	3200 V	3200 V	3200V
Nhiệt độ nguồn phun	200°C	200°C	50°C
Áp suất khí mang	40 psi	40 psi	40 psi
Nhiệt độ mao quản	360°C	360°C	360°C
Ion ban đầu, m/z	267,0	267,0	346,1
Thế phân mảnh ion	17 V	17 V	11V
Ion tạo thành, m/z	190,0	190,0	198,0

3.2.1.2. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA và EMA. Kết quả:

- Phương pháp đặc hiệu-chọn lọc với S-, R-ATN. SKĐ mẫu HT trắng, mẫu HT chứa chuẩn S-, R-ATN nồng độ 2,5 ng/ml trình bày ở Hình 3.29. Trên SKĐ, các pic ĐPĐQ tách hoàn toàn $R_s > 5$ và không bị ảnh hưởng bởi các thành phần tạp có trong nền mẫu.



Hình 3.29. SKĐ tính chọn lọc–đặc hiệu định lượng các ĐPĐQ của ATN trong HT bằng LC-MS/MS: mẫu HT trắng (phải); mẫu HT chứa chuẩn R,S-ATN (trái)

Chú giải hình: SKĐ tổng các ion (TIC): cửa sổ trên cùng; SKĐ chọn lọc ion atenolol (SRM, m/z: 267 → 190): cửa sổ giữa; SKĐ chọn lọc ion chuẩn nội (SRM, m/z: 346 → 198): cửa sổ dưới.

- Phương pháp có khoảng tuyến tính rộng từ 2,5 – 500 ng/ml. Giới hạn định lượng dưới 2,5 ng/ml. Độ đúng, độ chính xác đạt yêu cầu.
- Hiệu suất chiết ATN và chuẩn nội của quy trình xử lý mẫu $\approx 90\%$. ATN ổn định trong quá trình xử lý mẫu, phân tích và bảo quản đông lạnh mẫu HT ở $-35 \pm 5^\circ\text{C}$ sau 60 ngày.

3.2.2. Nghiên cứu định lượng ATN trong HT bằng LC-MS/MS

3.2.2.1. Nghiên cứu xây dựng phương pháp

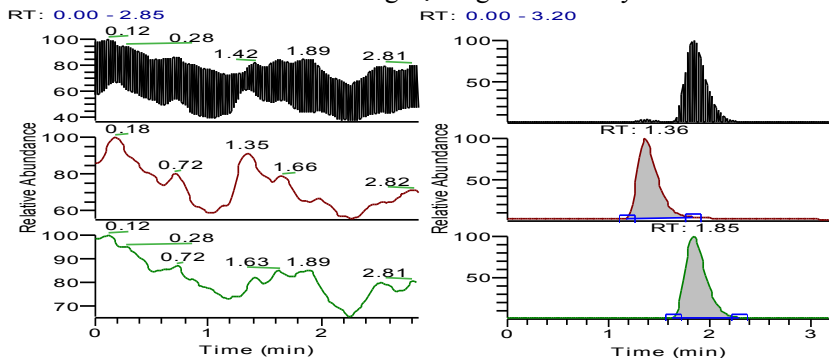
Tiến hành nghiên cứu như Mục 2.3.2.1. Từ kết quả thực nghiệm xây dựng phương pháp LC-MS/MS phân tích ATN trong HT như sau:

- ❖ Quy trình xử lý mẫu HT: Tương tự quy trình xử lý mẫu HT - phương pháp LC-MS/MS định lượng các ĐPĐQ của ATN.
- ❖ Điều kiện khối phổ: Tương tự như phương pháp LC-MS/MS phân tích các ĐPĐQ nhưng nhiệt độ nguồn phun giảm còn 50°C , áp suất khí mang giảm còn 20 psi và chuẩn nội là diltiazem.
- ❖ Điều kiện sắc ký: Phân tích trên cột pha đảo C18 (2,0 x 50 mm; 1,8 μm) ổn định ở 40°C . Pha động chứa MeCN – dung dịch amoni acetat 2 mM tỷ lệ 70 : 30. Tốc độ 0,2 ml/phút.

3.2.2.2. Thẩm định phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN

Tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA và EMA. Kết quả:

- Phương pháp đặc hiệu-chọn lọc với ATN. SKĐ các mẫu HT trắng, mẫu HT chứa chuẩn ATN nồng độ 5 ng/ml trình bày ở Hình 3.31.



Hình 3.31. Độ đặc hiệu-chọn lọc của phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN toàn phần: mẫu HT trắng (trái); mẫu HT chuẩn (phải)

Chú giải hình: SKĐ chọn lọc ion của ATN (SRM, m/z: 267 \rightarrow 190) - ở giữa. SKĐ chọn lọc ion của diltiazem (SRM, m/z: 415 \rightarrow 178) - ở dưới.

- Kết quả phân tích mẫu ATN có nồng độ thấp nhất đường chuẩn không bị ảnh hưởng bởi nền mẫu.
- Phương pháp có khoảng tuyến tính rộng từ 5 – 1000 ng/ml. Giới hạn định lượng dưới 5 ng/ml. Độ đúng, độ chính xác đạt yêu cầu. Tỷ lệ thu hồi chuẩn nội của quy trình xử lý mẫu đạt 75,5%.

3.2.3. Phân tích ATN và ĐPĐQ trong HT bệnh nhân và NTN

3.2.3.1. Định lượng ATN toàn phần trong HT

Phân tích 20 mẫu HT tự tạo chứa ATN ở hai khoảng nồng độ thấp theo hai phương pháp LC-MS/MS đã xây dựng và thẩm định ở trên. Kết quả phân tích thống kê t-test, nồng độ trung bình ATN toàn phần trong các mẫu HT xác định bằng hai phương pháp LC-MS/MS khác nhau không có ý nghĩa thống kê với mức độ tin cậy trên 95%.

3.2.3.2. Phân tích ATN trong HT bệnh nhân

Phân tích xác định nồng độ các ĐPĐQ của ATN trong 23 mẫu HT của 8 bệnh nhân điều trị bệnh tim mạch nội trú, phác đồ điều trị có chỉ định dùng thuốc ATN đồng ý tham gia nghiên cứu bằng phương pháp LC-MS/MS đã xây dựng. Kết quả trình bày ở Bảng 3.38.

Bảng 3.38. Nồng độ các ĐPĐQ của ATN trong HT bệnh nhân

Stt	Bệnh nhân	Mẫu 0h		Mẫu 2h		Mẫu 24h	
		R-ATN	S-ATN	R-ATN	S-ATN	R-ATN	S-ATN
1	T.V.H	0	0	178,6	175,6	9,1	9,3
2	H.T.T	15,5	14,7	124,6	122,4	*	*
3	T.V.C	21,2	22,6	88,6	90,4	24,8	23,5
4	H.V.S	12,7	12,1	102,4	100,1	11,8	12,5
5	N.V.S	0	0	138,3	134,2	7,8	8,3
6	L.T.V.A	18,4	19,5	91,8	94,3	21,2	20,4
7	N.T.T.H	0	0	73,2	70,1	9,0	10,2
8	L.T.T.H	8,2	9,1	56,7	58,2	7,7	7,6

Kết quả thực nghiệm cho thấy, phương pháp có độ đặc hiệu-chọn lọc và độ đúng cao. Kết quả phân tích không bị ảnh hưởng bởi các thuốc sử dụng đồng thời trong phác đồ điều trị của các bệnh nhân. Một số mẫu

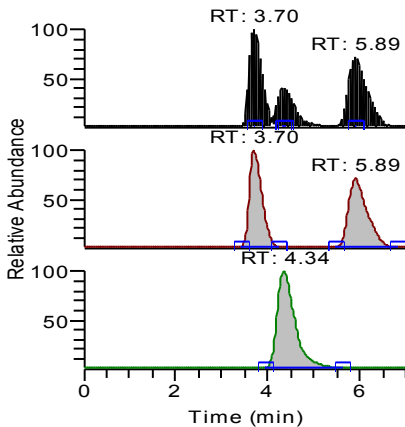
HT thời điểm 0 giờ nồng độ ATN > 0 do bệnh nhân đã sử dụng thuốc ATN trước khi tham gia vào nghiên cứu của chúng tôi.

3.2.3.3. Phân tích ATN trong huyết tương NTN tham gia nghiên cứu so sánh SKD thuốc ATN

Mười tám thanh niên khỏe mạnh, tình nguyện tham gia nghiên cứu được chia làm 3 nhóm, mỗi nhóm 6 người: Nhóm 1, so sánh SKD của Atenolol Stada 50mg và Ternomin 50mg (thuốc ATN racemic); nhóm 2, so sánh SKD hai thuốc S-ATN (Atpure[®] 25 và S-atenolol 25mg); nhóm 3, so sánh SKD của S-ATN giữa một thuốc ATN racemic (Ternomin 50mg) với một thuốc S-ATN (Atpure[®] 25). Thiết kế nghiên cứu đơn liều, chéo 2 x 2. Trong mỗi nhóm, mỗi giai đoạn, NTN uống 1 viên thuốc thử hoặc 1 viên thuốc đối chứng theo trình tự sử dụng thuốc ngẫu nhiên hóa và ngược nhau ở hai giai đoạn. Tiến hành cho NTN uống thuốc và lấy các mẫu máu. Lấy 14 mẫu máu/giai đoạn x 5 ml máu/mẫu trên mỗi NTN. Nghiên cứu được HỖĐĐ trong nghiên cứu Y sinh học phê duyệt đề cương trước khi tiến hành.

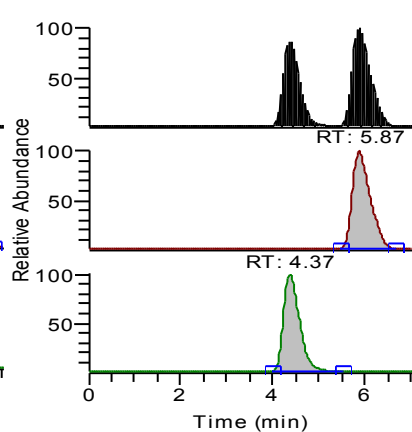
SKD phân tích LC-MS/MS xác định nồng độ các ĐPĐQ của ATN trong một số mẫu HT của NTN được trình bày ở Hình 3.36; 3.38.

RT: 0.00 - 7.00



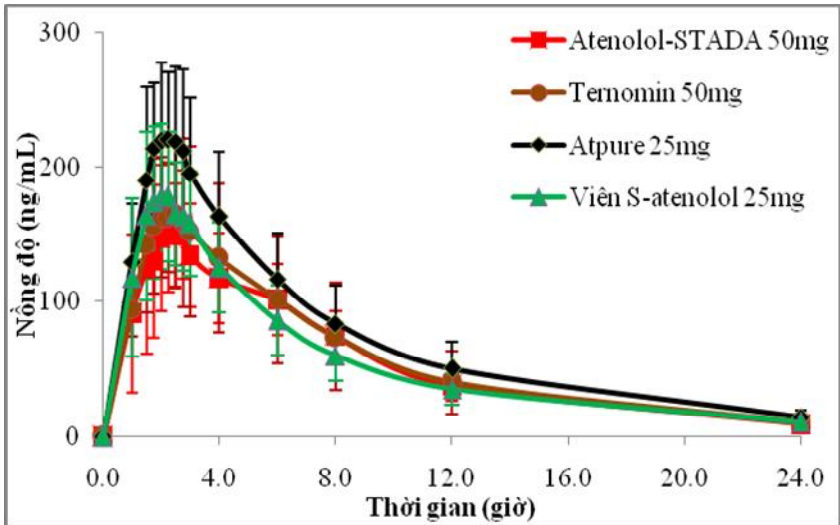
Hình 3.36. SKD mẫu HT của NTN02 – 2,5h (ATN racemic)

RT: 0.00 - 7.00

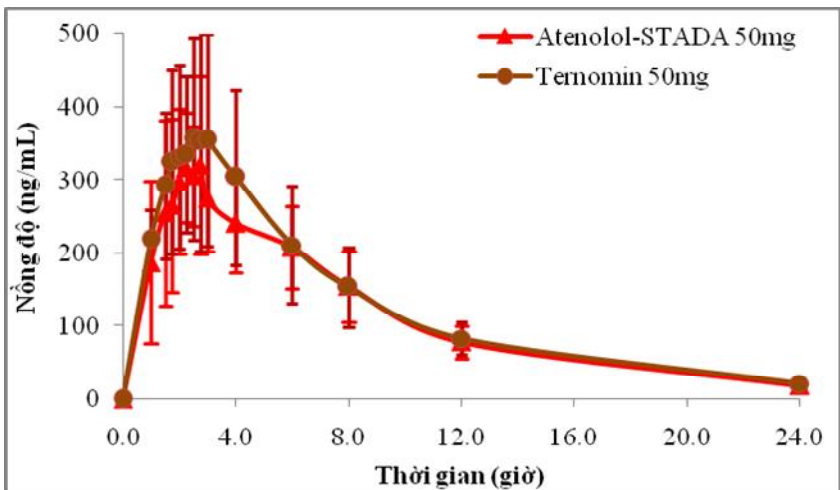


Hình 3.38. SKD mẫu HT của NTN08 – 2,0 h (S-ATN)

Từ kết quả phân tích, xác định các thông số DDH và SKD của các thuốc (Bảng 3.43) và đường cong nồng độ dược chất - thời gian của các thuốc (Hình 3.40 và Hình 3.41).



Hình 3.40. Đường cong trung bình nồng độ S-ATN – thời gian của các chế phẩm thuốc trên người tình nguyện Việt Nam



Hình 3.41. Đường cong trung bình nồng độ R,S-ATN – thời gian

Bảng 3.43. Thông số DDH trung bình của một số thuốc ATN trên NTN

T.số Thuốc	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (h)	AUC_{0-t} (ng.ml⁻¹.h)	AUC_{0-∞} (ng.ml⁻¹.h)	T_{1/2} (h)
<i>Ternomin 50mg (n = 12)</i>					
R-ATN	196,4	2,17	1478,0	1559,8	5,34
S-ATN	192,0	2,15	1428,0	1541,1	5,39
<i>R,S-ATN</i>	<i>388,4</i>	<i>2,16</i>	<i>2905,3</i>	<i>3137,0</i>	<i>5,37</i>
<i>Atenolol – STADA 50mg (n = 6)</i>					
R-ATN	182,7	2,25	1422,8	1495,1	5,25
S-ATN	177,8	2,25	1342,5	1414,8	5,31
<i>R,S-ATN</i>	<i>360,5</i>	<i>2,25</i>	<i>2765,3</i>	<i>2909,9</i>	<i>5,28</i>
<i>Atpure[®] 25mg (n = 12)</i>					
S-ATN	259,3	2,31	1779,9	1906,1	5,24
<i>Viên nén S-atenolol 25mg (n = 6)</i>					
S-ATN	196,5	1,92	1348,7	1429,2	5,19

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Phân tích ĐPĐQ của ATN trong chế phẩm bằng HPLC và CE

Các ĐPĐQ có công thức hóa học và tính chất hóa lý giống nhau nên không thể phân tách với các điều kiện phân tích thông thường. Dựa trên nguyên tắc các ĐPĐQ phản ứng với một tác nhân đối quang thích hợp sẽ tạo các phức hợp phi đối quang có năng lượng liên kết và độ bền khác nhau tùy thuộc vào sự tương tác giữa các đồng phân và tác nhân, chúng tôi đã xây dựng được các phương pháp HPLC, CE phân tích các ĐPĐQ của ATN. Phương pháp HPLC sử dụng cột sắc ký chứa pha tĩnh đối quang cellobiohydrolyse có bản chất là một protein, chất hoạt quang tự nhiên, phân tử lượng lớn và có nhiều trung tâm bất đối xứng để tạo phức hợp với các ĐPĐQ. Phương pháp CE sử dụng tác nhân chọn lọc hoạt quang dẫn chất β-CD mang điện tích trong dung dịch điện ly nền để tương tác tạo phức “lồng” với các đồng phân R- và S-ATN.

So với phương pháp HPLC, phương pháp CE tốn ít hóa chất, thuốc thử cho xử lý mẫu và chạy máy. Dung dịch điện ly nền ít độc hại với

môi trường và an toàn cho kiểm nghiệm viên. Tác nhân hoạt quang được thêm vào dung dịch điện ly nên nên việc thay đổi loại và nồng độ tác nhân khi nghiên cứu khảo sát phân tách các ĐPDQ tương đối dễ thực hiện. Trong khi đó phương pháp HPLC sử dụng các cột sắc ký chứa pha tĩnh hoạt quang, mỗi loại pha tĩnh hoạt quang chỉ thích hợp cho phân tách một số ĐPDQ nhất định, nên việc khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký bị bó hẹp và khó khăn hơn. Tuy vậy, kết quả thẩm định cho thấy HPLC có độ nhạy tốt hơn so với CE. Giá trị LOD và LOQ của phương pháp HPLC nhỏ hơn khoảng 50 – 70 lần so với phương pháp CE. Sở dĩ phương pháp CE có độ nhạy thấp hơn là do đầu dò có thể tích nhỏ, quang lộ ngắn (bằng với đường kính trong của cột mao quản) và thể tích tiêm mẫu ít hơn. Do vậy để xác định tạp *R*-ATN trong nguyên liệu hay chế phẩm *S*-ATN thì phương pháp HPLC nên là sự lựa chọn hàng đầu.

Phương pháp CE nghiên cứu trong luận án có thời gian phân tích được rút ngắn từ 2 – 4 lần so với các phương pháp CE phân tích ATN và các ĐPDQ của một số tác giả đã công bố. Mặc dù, thời gian phân tích rút ngắn, nhưng độ phân giải giữa các đồng phân *S*- và *R*-ATN vẫn tương đương với các phương pháp đã công bố và đạt yêu cầu của phép thử định lượng quy định trong dược điển. Thời gian một lần phân tích ngắn tạo nhiều thuận lợi và kinh tế cho công tác kiểm tra giám sát chất lượng thuốc trên thực tế.

Phương pháp HPLC định lượng các ĐPDQ của ATN nghiên cứu trong luận án, có thời gian phân tích ngắn (7,5 phút), độ phân giải độ phân giải giữa các đồng phân lớn ($R_s > 5$) và LOQ nhỏ (0,273 $\mu\text{g/ml}$). So với một số phương pháp HPLC định lượng các ĐPDQ của ATN trong chế phẩm thuốc đã được công bố, phương pháp HPLC nghiên cứu trong luận án có thời gian phân tích ngắn hơn khoảng 1,5 – 4 lần; R_s lớn hơn 1,5 – 2,5 lần và LOD, LOQ nhỏ hơn khoảng 4 – 50 lần. Với giá trị LOQ nhỏ, phương pháp HPLC đã nghiên cứu phù hợp để xác định hàm lượng tạp chất *R*-ATN có trong các mẫu nguyên liệu và thuốc *S*-ATN.

4.2. Phân tích ATN và ĐPDQ trong huyết tương bằng LC-MS/MS

❖ *Phương pháp xử lý mẫu huyết tương*: Có vai trò quan trọng trong phương pháp LC-MS/MS. Xử lý mẫu HT giúp loại bỏ tạp chất, loại bỏ các tác nhân ảnh hưởng đến quá trình ion hóa hoạt chất cần phân tích ở

nguồn ESI. Kỹ thuật xử lý mẫu HT bằng kết tủa protein đơn giản, hiệu suất thu hồi ATN khá cao (60–70%) song không loại bỏ được các tác nhân gây ảnh hưởng nền mẫu. ATN là một base yếu ($pK_a = 9,6$), độ tan trong các dung môi hữu cơ không phân cực tăng khi pH dung dịch mẫu tăng nên có thể chiết ATN trong HT bằng dung môi hữu cơ không phân cực sau khi kiềm hóa mẫu. So với SPE, chiết lỏng–lỏng vẫn có tỷ lệ thu hồi ATN cao ($> 80\%$) và cũng không gây ảnh hưởng nền mẫu khi phân tích MS/MS nhưng lại đơn giản hơn; không đòi hỏi trang thiết bị đặc biệt; dễ dàng triển khai tại nhiều phòng thí nghiệm, mang lại hiệu quả kinh tế cao khi áp dụng trong các nghiên cứu phải phân tích một số lượng lớn các mẫu như các nghiên cứu SKD và đánh giá TĐSH.

❖ *Về phương pháp LC-MS/MS phân tích ATN trong HT:*

So với các phương pháp HPLC định lượng thuốc trong dịch sinh học sử dụng các đầu dò thông thường như DAD, huỳnh quang, ECD hoặc đo độ dẫn... phương pháp LC-MS/MS định lượng thuốc trong dịch sinh học có độ đặc hiệu-chọn lọc và đặc biệt là độ nhạy, giới hạn định lượng tốt hơn nhiều lần. Sở dĩ phương pháp LC-MS/MS có độ đặc hiệu-chọn lọc và độ nhạy tốt là do phương pháp kết hợp các ưu thế của phương pháp HPLC và phương pháp MS/MS.

Các phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN và các ĐPĐQ trong HT nghiên cứu trong luận án đã được thẩm định đầy đủ và đáp ứng các yêu cầu đối với PPPT thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA. So với các phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN toàn phần trong HT đã công bố của một số tác giả, phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN toàn phần nghiên cứu trong luận án có giá trị LOQ và LLOQ thấp hơn từ 5 – 10 lần. Đồng thời do sử dụng cột sắc ký có kích thước hạt nhỏ (1,8 μm) và hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) nên phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN toàn phần nghiên cứu trong luận án có thời gian phân tích một mẫu rất ngắn (chỉ 2,5 phút), ngắn hơn nhiều so với các phương pháp đã được công bố. Thời gian phân tích ngắn phù hợp cho ứng dụng cần phân tích một số lượng lớn mẫu như các nghiên cứu SKD và TĐSH.

Để phân tích các ĐPĐQ của ATN trong dịch sinh học, các tác giả thường sử dụng phương pháp HPLC với đầu dò UV hoặc huỳnh quang.

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu phân tích các ĐPDQ của ATN trong HT bằng phương pháp LC-MS/MS nào được công bố. Phương pháp LC-MS/MS phân tích các ĐPDQ của ATN nghiên cứu trong luận án được có thời gian phân tích ngắn hơn, độ phân giải giữa các pic đồng phân lớn ($R_s > 5$) và giá trị LOQ nhỏ hơn nhiều so với các phương pháp HPLC định lượng ĐPDQ của ATN trong dịch sinh học đã công bố.

❖ *Kết quả kiểm tra chất lượng và nghiên cứu SKD các thuốc ATN:*

Kết quả xác định hàm lượng tạp ĐPDQ liên quan *R*-ATN trong 4 mẫu thuốc viên nén *S*-ATN cho thấy chỉ tiêu giới hạn tạp chất của các thuốc *S*-ATN đang lưu hành không giống nhau. Do vậy, cần thiết phải đánh giá hàm lượng tạp ĐPDQ liên quan *R*-ATN bằng PPPT thích hợp.

Cho đến nay, mới chỉ có các nghiên cứu SKD, TĐSH của ATN toàn phần được công bố. Các số liệu SKD và ĐĐH của *S*- và *R*-ATN trên NTN chưa từng được công bố. Kết quả nghiên cứu SKD, TĐSH một số thuốc ATN đang lưu hành cho thấy SKD của *S*- và *R*-ATN ở NTN Việt Nam là tương tự nhau, không có sự dịch giữa các dạng ĐPDQ trên lâm sàng. SKD của *S*-ATN ở các thuốc chỉ chứa một thành phần đối quang có xu hướng cao hơn so với thuốc racemic. Thuốc ATN racemic do Việt Nam sản xuất nhiều khả năng TĐSH với thuốc biệt dược gốc và các thuốc *S*-ATN đang lưu hành trên thị trường nhiều khả năng không TĐSH. Do vậy, để đảm bảo chất lượng, hiệu quả điều trị cần thiết phải triển khai các nghiên cứu SKD, đánh giá TĐSH các thuốc bằng các phương pháp phân tích ĐPDQ trong dịch sinh học phù hợp.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Luận án đã hoàn thành các mục tiêu đề ra và thu được kết quả:

1. Đã xây dựng được các phương pháp HPLC, CE định lượng các ĐPDQ của ATN trong một số chế phẩm thuốc:

❖ *Phương pháp HPLC:* Phân tách các ĐPDQ bằng cột sắc ký chứa pha tĩnh đối quang cellobiohydrolyse.

❖ *Phương pháp CE:* Phân tách các ĐPDQ trên cột mao quản silica nung chảy với dung dịch điện ly nền chứa CM- β -CD 8mM.

Phương pháp HPLC có giới hạn định lượng nhỏ (0,27 ng/ml) phù hợp để xác định hàm lượng tạp chất đối quang *R*-ATN có trong các mẫu thuốc và nguyên liệu *S*-ATN ở mức giới hạn nhỏ hơn 0,1%.

2. Đã xây dựng được hai phương pháp LC-MS/MS định lượng ATN và các ĐPĐQ trong HT người:

Các phương pháp có chung quy trình xử lý mẫu HT, chiết ATN bằng cloroform sau khi đã kiềm hóa mẫu. Phân tích ATN toàn phần trong dịch chiết bằng HPLC với cột pha đảo còn phân tích các ĐPĐQ trong dịch chiết bằng phương pháp HPLC với cột sắc ký chứa pha tĩnh đối quang cellobiohydrolyse. Xác định nồng độ ATN hoặc các ĐPĐQ trong dịch rửa giải sắc ký bằng phương pháp MS/MS với nguồn ESI (+). Các phương pháp LC-MS/MS đã được thẩm định đầy đủ và đáp ứng các yêu cầu của Mỹ, châu Âu đối với một PPPT thuốc trong dịch sinh học.

3. Đã ứng dụng các PPPT kiểm tra chất lượng và nghiên cứu SKD, TĐSH một số chế phẩm thuốc ATN:

- Phân tích xác định hàm lượng ATN và các ĐPĐQ trong 08 mẫu thuốc bằng HPLC và CE. Các phương pháp có độ đúng, độ chính xác tương đương nhau. Các mẫu thuốc đạt yêu cầu hàm lượng.

- Phân tích xác định hàm lượng tạp R-ATN trong 04 mẫu chế phẩm thuốc S-ATN bằng phương pháp HPLC. Một mẫu thuốc S-ATN có giới hạn tạp chất R-ATN vượt quá mức giới hạn chung 2,0%.

- Áp dụng phương pháp HPLC định lượng ATN và các ĐPĐQ hòa tan trong nghiên cứu so sánh độ hòa tan *in vitro* các thuốc ATN. Bốn mẫu thuốc có độ hòa tan *in vitro* tương đương nhau.

- Phân tích LC-MS/MS xác định nồng độ các ĐPĐQ của ATN trong 23 mẫu HT bệnh nhân và 504 mẫu HT của 18 NTN. S- và R-ATN có SKD tương tự nhau và không có sự chuyển dạng giữa các đồng phân. SKD thuốc S-ATN trên NTN có khác biệt về C_{max} , AUC so với thuốc ATN racemic. Hai thuốc ATN racemic có C_{max} , T_{max} , AUC tương tự nhau còn hai thuốc S-ATN có C_{max} , AUC không giống nhau.

KIẾN NGHỊ

Để đảm bảo và nâng cao chất lượng các thuốc chứa dược chất ĐPĐQ nói chung và ATN nói riêng đang lưu hành trên thị trường, chúng tôi có một số kiến nghị sau:

- 1) Kiểm tra giới hạn tạp R-ATN đối với các thuốc S-ATN.
- 2) Nghiên cứu đánh giá TĐSH các thuốc S-ATN; ATN racemic và so sánh SKD các thuốc S-ATN với thuốc biệt dược gốc ATN racemic.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. Tạ Mạnh Hùng, Trịnh Văn Lầu, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Kiều Anh (2013), “Nghiên cứu tách các đồng phân quang học của atenolol bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với một số pha tĩnh đối quang”, *Tạp chí nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, số 6/2013, tr. 218 - 224.
2. Tạ Mạnh Hùng, Trịnh Văn Lầu, Đinh Thị Thanh, Vũ Ngân Bình, Nguyễn Thị Kiều Anh (2013), “Bước đầu nghiên cứu định lượng đồng phân đối quang của atenolol bằng phương pháp điện di mao quản”, *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, tập 11, số 42, tr. 14 - 19.
3. Tạ Mạnh Hùng, Phan Thị Nghĩa, Trịnh Văn Lầu (2014), “Nghiên cứu định lượng atenolol trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ”, *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, tập 12, số 44, tr. 2 - 7.
4. Tạ Mạnh Hùng, Ngô Minh Thúy, Vũ Ngân Bình, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thị Kiều Anh (2014), “Nghiên cứu định lượng đồng phân đối quang của atenolol bằng điện di mao quản”, *Tạp chí nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, số 6/2014, tr. 212 - 217.
5. Tạ Mạnh Hùng, Trịnh Văn Lầu, Nguyễn Thị Kiều Anh (2015), “Nghiên cứu định lượng đồng thời các đồng phân quang học của atenolol trong một số chế phẩm thuốc bằng phương pháp HPLC-DAD”, *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, tập 13, số 49, tr. 16 - 23.
6. Tạ Mạnh Hùng, Trịnh Văn Lầu, Nguyễn Thị Kiều Anh (2016), “Nghiên cứu định lượng đồng thời các đồng phân quang học của atenolol trong huyết tương người bằng phương pháp LC-MS/MS”. *Tạp chí Dược học*, số 482, tr. 56 - 60.