

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
.....o0o.....**

Vũ Thị Huệ

**NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ HOẠT CHẤT
THUỐC KHÁNG SINH THUỘC NHÓM SULFAMID
BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHỔ KẾ HỒNG NGOẠI
GẦN VÀ TRUNG BÌNH**

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội - 2015

Công trình được hoàn thành tại Đại học Khoa học tự nhiên.

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS Tạ Thị Thảo

Phản biện 1: PGS. TS Nguyễn Xuân Trung

Phản biện 2: TS. Đào Duy Tiên

Luận văn đã được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận văn
thạc sĩ họp tại: Phòng số 1 bộ môn Hóa phân tích, khoa
Hóa học, đại học Khoa học Tự nhiên.

Vào hồi 9 giờ 00 ngày 26 tháng 08 năm 2015

MỞ ĐẦU

Từ xưa đến nay, việc sử dụng thuốc trong phòng, chữa bệnh và tăng cường sức khỏe đã trở thành nhu cầu tất yếu quan trọng đối với đời sống con người. Việc kiểm soát chất lượng của các loại mặt hàng này thường đòi hỏi thời gian dài với nhiều công đoạn phức tạp và chi phí kiểm định khá cao. Ngày nay thế giới đang có xu hướng tìm kiếm những phương pháp và thiết bị cho phép kiểm định nhanh thuốc đang lưu thông trên thị trường.

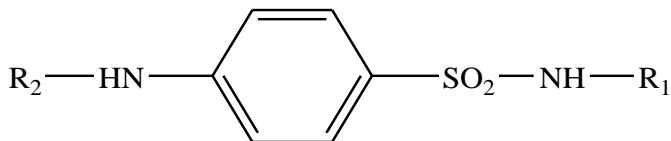
So với phương pháp phân tích truyền thống để định lượng hoạt chất thuốc là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thì định lượng chất bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại gần và trung bình có ưu điểm đơn giản trong quá trình tiền xử lý mẫu, phân tích trực tiếp mẫu rắn nhanh, giá thành rẻ do không tốn dung môi và nếu kết hợp với thuật toán hồi qui đa biến thì không phải tách riêng các chất trước khi phân tích nên có thể phân tích đồng thời các thuốc trong cùng nhóm thuốc. Đây chính là lí do chúng tôi lựa chọn đề tài: “*Nghiên cứu định lượng một số hoạt chất thuốc kháng sinh thuộc nhóm Sulfamid bằng phương pháp phổ kế hồng ngoại gần và trung bình*”. Nghiên cứu này sẽ góp phần khẳng định xu hướng đưa các phép phân tích ra khỏi nghiên cứu đơn thuần và áp dụng nhanh trong thực tế, đồng thời cho phép tiết kiệm thời gian, hóa chất và đặc biệt là tăng tính thời sự của công tác giám định chất lượng.

CHƯƠNG I: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về thuốc kháng sinh nhóm Sulfamid

1.1.1. Cấu tạo chung của nhóm Sulfamid

Các sulfamid kháng khuẩn là dẫn chất của p-aminobenzensulfonamid, có công thức cấu tạo chung là:

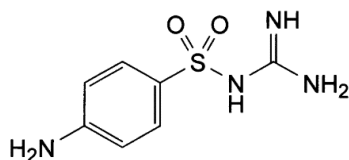


Trong đó thường gặp R_2 là H, và cũng chỉ khi R_2 là H thì sulfamid mới có hoạt tính kháng khuẩn, khi $R_2 \neq H$, thì chất đó là tiền thuốc. R_1 có thể là mạch thẳng, dị vòng. Tuy nhiên, nếu R_1 là dị vòng thì hiệu lực kháng khuẩn mạnh hơn, thông thường là các dị vòng 2 – 3 dị tố. Khi R_1 và R_2 đều là gốc hydro thì thu được sulfamid là có cấu tạo đơn giản nhất (sulfanilamid) [6].

1.1.2. Giới thiệu về Sulfaguanidin, Sulfamethoxazol và Trimethoprim

- Giới thiệu về Sulfaguanidin

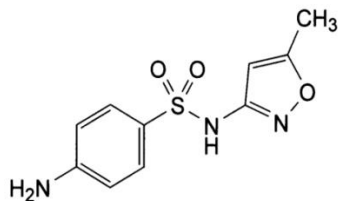
Công thức: $C_7H_{10}N_4O_2S$



Sulfaguanidin là (4-aminophenylsulfonyl)guanidin, tồn tại ở dạng bột kết tinh mịn màu trắng hoặc gần như trắng. Rất khó tan trong nước và ethanol 96 %, khó tan trong aceton, thực tế không tan trong methylen clorid, tan trong dung dịch acid vô cơ loãng. [6]

- Giới thiệu về Sulfamethoxazol

Công thức: $C_{10}H_{11}N_3O_3S$

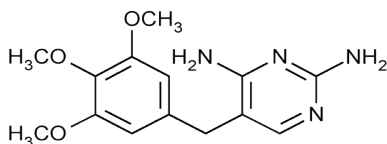


KLPT: 253,3

Sulfamethoxazol là 4-amino-N-(5-methylisoxazol-3-yl) benzensulfonamid, tồn tại ở dạng bột kết tinh màu trắng hoặc gần như trắng. Thực tế không tan trong nước, dễ tan trong acetone, hơi tan trong ethanol 96 %, tan trong dung dịch natri hydroxyd loãng và dung dịch acid loãng. [6]

- **Giới thiệu về Trimethoprim**

Công thức: $C_{14}H_{18}N_4O_3$



KLPT: 290,3

Trimethoprim là 2,4 diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl) pyrimidin, tồn tại ở dạng bột trắng hoặc trắng hơi vàng. Rất khó tan trong nước, khó tan trong ethanol 96 %, hơi tan trong cloroform, thực tế không tan trong ether. [6]

1.2. Tổng quan về phương pháp phân tích các hoạt chất nhóm sulfamid

1.2.1. Phương pháp định tính sulfamid

- Phương pháp sắc ký lớp mỏng
- Phương pháp phổ hồng ngoại

1.2.2. Một số phương pháp định lượng phổ biến

- Phương pháp chuẩn độ thể tích
- Phương pháp trắc quang
- Phương pháp trắc quang kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến
- Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

1.2.3. Phương pháp quang phổ kế hồng ngoại gần và trung bình kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến

Trong vòng hai thập kỷ trở lại đây NIR đã trở thành một trong những công cụ hữu ích ứng dụng trong phân tích công nghiệp. Đây là một kỹ thuật phân tích rất nhanh: chỉ với cần một máy quang phổ hồng ngoại ta có thể đo phổ hồng ngoại chỉ trong vòng một vài giây [22]. So với phương pháp phân tích truyền thống để định lượng hoạt chất thuốc là sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thì định lượng chất hữu cơ trong phổ hồng ngoại gần và trung bình có ưu điểm nổi trội về đơn giản trong quá trình tiền xử lý mẫu, lượng mẫu phân tích ít, quá trình chuẩn bị mẫu đơn giản, chi phí thấp do đó có thể hạn chế được các sai số trong quá trình chuẩn bị mẫu [25]. Tuy nhiên, NIR cũng có một số nhược điểm như: giới hạn phát hiện cao do đó không phù hợp với các phép phân tích lượng vết. Phổ hồng ngoại không đưa ra được các thông tin đặc trưng nếu chỉ đo tại một bước sóng. Hơn nữa, phổ hồng ngoại chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của các thông số như điều kiện vật lý của mẫu, môi trường đo mẫu, độ dày của viên mẫu, tỷ lệ ép viên. Vì thế NIR thường không được sử dụng như một kỹ thuật phân tích trực tiếp.

Việc sử dụng phổ hồng ngoại kết hợp với các thuật toán hồi quy đa biến đã góp phần đưa phương pháp phổ hồng ngoại tham gia vào các quá trình định lượng mẫu. Phương pháp phổ hồng ngoại kết hợp với chemometric đã mở ra một kỷ nguyên mới cho phép phân tích nhanh, hiệu quả, thân thiện với môi trường- công nghệ hóa học xanh. Tuy nhiên, đây vẫn là một hướng nghiên cứu khả mới mẽ trên thế giới. Hiện tại chưa có một nghiên cứu nào về định lượng nhanh nhóm Sulfamid bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại gần và trung bình được công bố. Đây chính là cơ sở để chúng tôi lựa chọn tiến hành nghiên cứu định lượng một số hoạt chất thuốc kháng sinh thuộc nhóm Sulfamid bằng phương pháp quang phổ kế hồng ngoại gần và trung bình. Kết quả thu được từ nghiên cứu này mở ra hướng nghiên cứu mới sử dụng các thiết bị đơn giản để xác định nhanh các chất trong mẫu đo phức tạp mà không cần phá mẫu hoặc xử lý nhanh tại chỗ, tạo điều kiện đưa phép phân tích ra khỏi phòng thí nghiệm.

CHƯƠNG II: THỰC NGHIỆM

2.1. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu lựa chọn các điều kiện tối ưu để đo phổ IR trong vùng hồng ngoại gần và trung bình của các hoạt chất sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim.

- Nghiên cứu xây dựng thuật toán hồi quy đa biến tuyến tính, lựa chọn các thông số tối ưu của các mô hình trên cơ sở của mẫu chuẩn.

- Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến tín hiệu đo độ hấp thụ của chất phân tích trong vùng hồng ngoại gần và trung bình.

- Nghiên cứu xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp hồi quy đa biến xác định đồng thời các hoạt chất trên.

- Ứng dụng phương pháp nghiên cứu được để định lượng nhanh thành phần hoạt chất trong các mẫu thuốc đang lưu thông trên thị trường. So sánh kết quả tìm được với phương pháp tiêu chuẩn qui định trong dược điển

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

Cơ sở của phương pháp nghiên cứu là dựa vào phổ hấp thụ của ba hoạt chất là sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim trong vùng phổ hồng ngoại từ 3600- 3000 cm^{-1} để định lượng nhanh các hoạt chất trên trong dược phẩm bằng phương pháp hồi quy đa biến.

Tiến hành xây dựng mô hình hồi quy đa biến xác định một hoạt chất và các tá dược gồm 25 mẫu chuẩn và 10 mẫu kiểm tra, mô hình hồi quy đa biến xác định cả ba hoạt chất và các tá dược gồm 30 mẫu chuẩn và 15 mẫu kiểm tra bằng cách chuẩn bị các mẫu chuẩn, mẫu kiểm tra theo như quy trình như dưới đây:

- Bước 1: chuẩn bị các mẫu chuẩn, mẫu kiểm tra chứa đồng thời các hoạt chất là sulfaguanidin, sulfamethoxazol, và trimethoprim

cùng với ba tá dược là tinh bột sắn, maltodextrin, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ với tỷ lệ thay đổi trong khoảng nồng độ khảo sát sao cho tín hiệu độ hấp thụ thay đổi trong vùng tuyến tính.

- Bước 2: Nghiền, trộn từng mẫu trong 15 phút để hỗn hợp được đồng nhất.

- Bước 3: Lấy 2 mg chất vừa trộn được trộn với 98 mg KBr rồi tiến hành nghiền mịn đồng nhất mẫu trong cối mã não trong 10 phút.

- Bước 4: Lấy khoảng 15 mg lượng bột vừa nghiền được cho vào bộ ép viên để thu được viên mẫu đem đo phổ hồng ngoại trong vùng phổ nghiên cứu từ $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, ghi lại độ hấp thụ quang của từng mẫu, xuất số liệu thu được dưới dạng ASCII và chuyển toàn bộ dữ liệu vào phần mềm matlab để tính toán kết quả.

- Bước 5: Đường chuẩn đa biến và các bộ dữ liệu dự đoán được xây dựng trên ma trận độ hấp thụ quang của các mẫu chuẩn và mẫu kiểm tra đã chuẩn bị ở phần trên. Nhập số liệu ma trận nồng độ các mẫu chuẩn, ma trận các mẫu kiểm tra và các ma trận tín hiệu đo tương ứng vào phần mềm Matlab, chạy chương trình tính toán ma trận hệ số hồi quy theo 4 phương pháp CLS, ILS, PLS và PCR trên phần mềm và sử dụng ma trận này để tìm nồng độ mỗi hoạt chất trong từng mẫu. So sánh sai số tương đối của mỗi phương pháp, lựa chọn ra phương pháp tối ưu nhất để tiến hành định lượng các mẫu thực tế.

- Bước 6: Tiến hành định lượng các mẫu thực tế bằng cách trộn một lượng bột viên với tá dược để pha loãng nồng độ hoạt chất về nồng độ nằm trong ma trận chuẩn đã xây dựng, đo phổ của các mẫu này, ghi lại phổ và chuyển dữ liệu thu được vào phần mềm Matlab để tính toán kết quả. Từ đó tiến hành tính toán hàm lượng hoạt chất trong các mẫu thuốc viên theo công thức dưới đây:

$$HL(\text{mg} / \text{viên}) = \frac{X \times m_{tb}}{m_t}$$

Trong đó:

X: Lượng (mg) hoạt chất tìm được từ mô hình hồi qui đa biến
 m_t : khối lượng cân của mẫu thử (mg)

m_{tb} : khối lượng trung bình của 1 viên của thuốc (mg)

2.2. Hóa chất và thiết bị

2.2.1. Hóa chất

- Sulfaguanidin (viện kiểm nghiệm thuốc trung ương). Hàm lượng nguyên trạng: 92,11%

- Sulfamethoxazol (viện kiểm nghiệm thuốc trung ương). Hàm lượng nguyên trạng: 100,05%

- Trimethoprim (viện kiểm nghiệm thuốc trung ương). Hàm lượng nguyên trạng: 99,79%

- KBr (Merck)

- Tinh bột sắn: Nhà máy sản xuất tinh bột mì Quảng Ngãi

- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: Công ty cổ phần hóa dược Việt Nam

- Maltodextrin: Yisui dadi Corn developing Co., LTD

- Magie stearate: Peter Greven Asia SDN. BHD

- Bột Talc: Công ty cổ phần hóa dược Việt Nam

- Hóa chất tinh khiết phân tích: Acid Acetic, NaOH, Acetonitrin, triethylamin, Methanol (Merck)

2.2.2. Thiết bị và phần mềm máy tính

- Cân phân tích Sartorius độ chính xác $\pm 0,0001\text{g}$.

- Máy quang phổ hồng ngoại Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR spectrometer, dải số sóng đo $7500\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.
 Detectornhiệt DTGS

- Bộ dụng cụ ép viên: Agilent Technologies standard sampling kit (part no: Pike - 162- 1000).

- Thư viện phổ chuẩn: ST- Japan spectral libraries (part no: K8159-1000)

- Phần mềm Matlab 7.6: Chương trình hồi qui đa biến tuyến tính PLS, CLS, ILS và PCR để phân tích đồng thời các cấu tử trong cùng hỗn hợp.

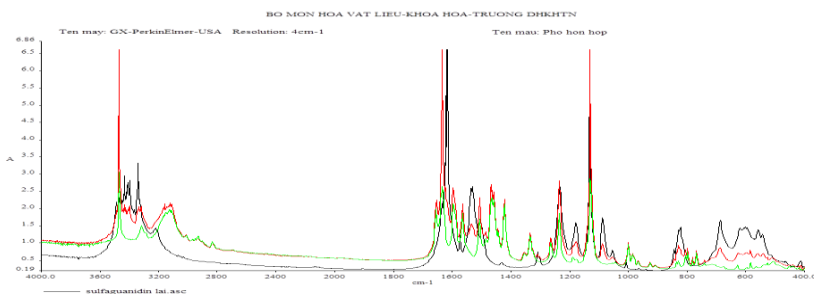
- Hệ thống sắc ký lỏng Shimadzu LC-20A.; Cột sử dụng: C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim trong cùng hỗn hợp

3.1.1. Khảo sát phổ hấp thụ của các hoạt chất

Tiến hành khảo sát phổ hồng ngoại của 3 hoạt chất này trong vùng từ 4000- 400 cm^{-1} chúng tôi thu được dữ liệu phổ như hình dưới đây.



Hình 3.1: Phổ hồng ngoại của ba hoạt chất Sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim

————— : Sulfaguanidin
————— : Sulfamethoxazol
————— : Trimethoprim

Nhận thấy vùng phổ 3600- 3000 cm^{-1} là vùng hấp thụ của nhóm sulfoamid bậc 2 ($\text{-SO}_2\text{-NH-}$) đặc trưng cho các sulfamid. Do đó chúng tôi đã lựa chọn vùng phổ này để tiến hành các thực nghiệm tiếp theo. Mặt khác do có sự xen phủ giữa các phổ của các hoạt chất với nhau nên phải kết hợp với chemometrics để định lượng được từng hoạt chất này.

3.1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả phân tích

Tiến hành khảo sát tỷ lệ khối lượng mẫu/KBr, độ lặp lại của quá trình ép viên, khảo sát ảnh hưởng của các tá dược. Chúng tôi đã

lựa chọn được tỷ lệ khối lượng mẫu/ KBr là 2:98. Các quá trình ép viên, và các tá dược đều ảnh hưởng đến tín hiệu đo mẫu do đó phải sử dụng phương pháp phổ hồng ngoại kết hợp với chemometrics để định lượng các hoạt chất phân tích.

3.2. Phương pháp hồi quy đa biến tuyến tính xác định SFG và các tá dược

3.2.1. Xây dựng mô hình hồi quy đa biến gồm hoạt chất SFG và các tá dược

Tiến hành chuẩn bị 25 mẫu chuẩn chứa SFG cùng với ba tá dược. Ghi lại kết quả phổ hấp thụ hồng ngoại của các mẫu trong vùng phổ từ 3600-3000 cm^{-1}

Bảng 3.1: Ma trận hàm lượng bốn cấu tử SFT, Tbot, Malt, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trong hỗn hợp

Mẫu	SFG (mg)	Tá dược (mg)			
		Tbot	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Malt	Σ tá dược
1	8,1	57,1	10,8	11,5	79,4
2	10,9	56,7	11,2	10,2	78,1
3	18,1	53,2	18,7	16,1	88,0
4	17,5	57,3	14,0	10,0	81,3
5	22,2	52,5	17,8	21,6	91,9
6	23,7	53,2	10,0	12,2	75,4
7	25,1	50,7	14,4	10,0	75,1
8	25,8	45,9	14,3	14,5	74,7
9	23,5	40,2	15,5	19,2	74,9
10	19,8	59,9	5,2	10,0	75,1
11	37,5	40,6	10,3	17,2	68,1
12	47,5	41,1	13,2	16,4	70,7
13	46,8	39,9	11,4	15,1	66,4
14	19,2	55,0	10,1	10,9	76,0

15	14,8	45,6	15,6	15,0	76,2
16	16,2	46,6	11,3	18,9	76,8
17	27,2	41,3	10,0	13,3	64,6
18	50,5	25,1	10,1	13,4	48,6
19	44,6	30,0	7,9	21,5	59,4
20	43,9	29,0	11,0	15,5	55,5
21	45,8	34,5	11,8	11,7	58,0
22	46,3	32,6	12,5	11,0	56,1
23	16,4	54,9	14,1	16,8	85,8
24	16,9	53,6	13,8	13,7	81,1
25	20,1	50,6	15,1	15,4	81,1

3.2.2. Đánh giá phương pháp phân tích sulfaguanidin

Xây dựng ma trận mẫu kiểm tra với hàm lượng các cấu tử biết trước nằm trong khoảng đường chuẩn đã xây dựng để kiểm chứng tính phù hợp của các mô hình hồi quy.

Bảng 3.2: Ma trận nồng độ các mẫu tự tạo chứa SFG, Tbot, Ca₃(PO₄)₂ và Malt để đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy

Mẫu	SFG (mg)	Tá dược (mg)			
		Tbot	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Malt	Σ tá dược
1	37,7	42,0	11,5	14,1	67,6
2	39,0	32,9	10,9	12,4	56,2
3	33,2	29,9	9,5	11,8	51,2
4	49,5	23,2	9,0	12,3	44,5
5	21,1	35,8	9,5	9,8	54,3
6	59,5	35,3	13,8	17,2	66,3
7	35,1	34,2	10,7	14,2	59,1
8	43,9	33,2	11,0	15,5	59,7
9	45,8	34,5	13,5	15,3	63,3
10	8,1	57,1	12,4	12,8	82,3

Kết quả kiểm chứng tính phù hợp của các mô hình CLS, ILS, PLS đều cho sai số của các phương pháp (tính theo giá trị tuyệt đối) dao động trong khoảng lần lượt là:

- Phương pháp bình phương tối thiểu thông thường (CLS): từ 5,9 - 146,0%
- Phương pháp bình phương tối thiểu nghịch đảo (ILS): từ 74,8- 279,8%
- Phương pháp bình phương tối thiểu từng phần (PLS): từ $(2,6 - 20,4) \times 10^5$.

Do đó không thể sử dụng được các thuật toán này để phân tích đồng thời sulfaguanidin và ba tá dược.

• **Kết quả kiểm chứng tính phù hợp của các mô hình PCR**

Kết quả kiểm chứng tính phù hợp của mô hình PCR với 3 cấu tử chính cho kết quả tương đối tốt và được trình bày trong bảng 3.3 dưới đây.

Bảng 3.3: Hàm lượng SFG và ba tá dược tìm được trong hỗn hợp mẫu kiểm tra

Mẫu	Hàm lượng tìm thấy (mg)				Sai số tương đối (%)			
	SFG	Tbot	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Malt	SFG	Tbot	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Malt
1	41,2	40,3	12,4	15,2	-9,3	4,0	-7,7	-8,0
2	40,8	31,7	10,5	13,1	-4,7	3,7	3,4	-5,7
3	32,9	29,2	9,2	11,7	0,9	2,3	3,0	1,2
4	50,6	23,5	9,6	13,0	-2,1	-1,3	-6,8	-5,5
5	20,4	35,0	9,5	9,8	3,4	2,2	-0,5	0,2
6	61,3	38,0	13,5	18,9	-3,0	-7,6	2,1	-10,1
7	34,8	31,6	9,6	14,0	1,0	7,5	9,8	1,5
8	46,8	35,7	11,7	16,1	-6,5	-7,5	-6,5	-3,9
9	48,5	38,0	12,4	16,9	-5,9	-10,2	8,4	-10,5
10	9,1	57,8	13,3	13,8	-11,9	-1,2	-7,0	-7,9

Từ kết quả ở trên chúng tôi nhận thấy mô hình PCR thu được cho kết quả tốt hơn rất nhiều so với các phương pháp hồi quy đa biến đã sử dụng. Tất cả các kết quả đều nằm trong giới hạn cho phép của phương pháp.

3.3. Phương pháp hồi quy đa biến tuyến tính PCR xác định đồng thời sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim

3.3.1. Xây dựng phương trình đường chuẩn đa biến xác định sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim bằng phương pháp PCR

Xây dựng phương trình đường chuẩn xác định đồng thời ba hoạt chất sulfaguanidin, sulfamethoxazol, trimethoprim và tổng hàm lượng tá dược dựa trên thuật toán bình phương tối thiểu sử dụng phổ toàn phần PCR.

Bảng 3.4: Ma trận chuẩn hàm lượng bốn cấu tử SFG, SFM, TMP và tá dược trong hỗn hợp

STT	SFG (mg)	SFM (mg)	TMP (mg)	Tá dược (mg)			
				Tbot	Malt	Ca ₃ (PO ₄) ₂	∑Tá dược
1	13,0	40,0	7,8	10,1	9,3	20,1	39,5
2	15,2	37,0	10,7	9,2	5,0	25,5	39,7
3	15,9	35,1	10,4	12,4	11,6	10,8	34,8
4	17,6	32,9	11,0	10,4	6,0	22,5	38,9
5	18,4	30,7	5,0	4,3	4,6	34,9	43,8
6	18,8	31,8	4,9	4,7	5,2	34,5	44,4
7	20,4	31,4	11,9	4,7	5,7	26,9	37,3
8	20,1	32,2	10,0	4,4	7,2	29,8	41,4
9	22,2	36,0	5,5	5,3	10,1	24,0	39,4

10	23,9	35,6	5,8	5,4	12,3	20,8	38,5
11	24,7	28,6	10,5	4,2	10,7	24,1	39,0
12	26,1	25,3	9,4	9,0	13,3	15,5	37,8
13	25,0	25,9	9,8	10,1	14,3	14,6	39,0
14	28,5	24,3	10,0	9,6	11,5	20,5	41,6
15	27,5	21,7	10,1	14,4	15,7	10,3	40,4
16	29,4	20,6	10,7	14,8	10,1	15,9	40,8
17	29,7	16,2	15,6	9,0	8,3	11,0	28,3
18	30,1	13,5	14,4	10,6	12,4	21,6	44,6
19	30,2	13,4	19,0	8,5	11,0	20,3	39,8
20	31,0	10,2	18,6	9,6	11,1	19,8	40,5
21	30,2	10,8	204,0	9,3	8,8	25,0	43,1
22	0,0	39,7	8,7	12,8	12,5	23,5	48,8
23	0,0	40,4	8,4	5,2	11,2	37,8	54,2
24	0,0	39,6	8,8	9,2	11,6	30,3	51,1
25	28,6	0,0	12,0	12,4	10,6	41,8	64,8
26	41,6	0,0	9,5	10,6	15,1	26,6	52,3
27	13,9	40,2	0,0	11,6	11,0	30,8	53,4
28	22,5	28,5	7,4	10,0	12,9	22,1	45,0
29	45,8	0,0	0,0	34,5	11,8	11,7	58,0
30	46,3	0,0	0,0	32,6	12,5	11,0	56,1

3.3.2. Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy đa biến

Xây dựng ma trận mẫu kiểm tra với hàm lượng các cấu tử biết trước nằm trong khoảng đường chuẩn đã xây dựng để kiểm chứng tính phù hợp của mô hình hồi quy. Đo phổ hồng ngoại của các

mẫu này trong vùng phổ từ 3600-3000 cm^{-1} , ghi lại độ hấp thụ quang của từng mẫu.

Bảng 3.5: Ma trận nồng độ các mẫu tự tạo chứa SFG, SFM, TMP và tá dược để đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy

STT	SFG (mg)	SFM (mg)	TMP (mg)	Tá dược (mg)			
				Tbot	Malt	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Σ Tá dược
1	22,5	28,5	15,3	10,6	12,9	25,3	48,8
2	11,3	30,1	10,6	7,0	9,2	21,3	37,5
3	10,0	35,2	11,5	6,5	9,4	22,1	38,0
4	10,8	32,6	10,0	5,5	7,5	20,5	33,5
5	15,3	45,3	15,2	8,2	12,3	27,1	47,6
6	7,1	38,0	13,8	7,1	10,0	30,3	47,4
7	6,5	34,1	12,9	6,0	9,5	25,4	40,9
8	11,6	30,1	11,8	7,9	9,9	24,8	42,6
9	8,2	37,5	13,2	6,8	11,2	28,1	46,1
10	31,8	12,0	16,5	14,2	12,0	21,0	47,2
11	12,6	25,1	12,4	8,3	7,8	21,1	37,2
12	22,6	13,8	12,5	10,0	10,0	19,6	39,6
13	41,8	4,0	13,5	16,9	12,4	15,2	44,5
14	12,6	31,5	12,9	6,8	10,5	26,3	43,6
15	22,5	28,8	16,9	10,5	12,9	25,2	48,6

Tiến hành thực hiện tính toán trên phần mềm Malab phương pháp hồi quy cấu tử chính (PCR) với số cấu tử chính lựa chọn là 3. Các kết quả nồng độ SFG, SFM, TMP và tổng các tá dược trong 15 mẫu tự tạo và sai số tương đối của mỗi mẫu được trình bày trong bảng 3.6

Bảng 3.6: Hàm lượng SFG, SFM, TMP và tổng tá được tìm được trong các hỗn hợp mẫu kiểm tra theo phương pháp PCR

Mẫu	Hàm lượng tìm thấy (mg)				Sai số tương đối (%)			
	SFG	SFM	TMP	ΣTá được	SFG	SFM	TMP	ΣTá được
1	23,3	27,6	16,1	49,4	-3,5	3,3	-5,2	-1,3
2	12,2	29,3	11,0	35,5	-8,0	2,8	-3,8	5,4
3	10,0	34,7	11,9	38,6	-0,5	1,3	-3,3	-1,6
4	10,3	33,4	9,5	32,1	4,9	-2,5	5,4	4,2
5	16,5	46,2	14,3	47,9	-7,9	-2,0	5,7	-0,6
6	6,9	40,6	14,3	45,6	2,4	-6,8	-3,4	3,7
7	5,7	33,0	12,0	38,1	11,7	3,4	7,1	6,9
8	12,2	28,7	12,8	39,9	-4,8	4,7	-8,2	6,3
9	8,9	36,8	14,0	44,5	-8,8	1,8	-6,3	3,5
10	33,9	11,1	15,9	46,9	-6,7	7,4	3,5	0,7
11	13,7	24,3	11,8	36,8	-8,7	3,4	4,7	1,2
12	22,0	14,7	12,7	37,9	2,8	-6,7	-1,3	4,3
13	40,4	3,4	14,8	43,2	3,4	14,7	-9,9	3,0
14	11,9	30,7	13,4	42,0	5,8	2,4	-4,0	3,7
15	23,3	27,6	16,1	49,4	-3,5	4,3	4,8	-1,7

Từ kết quả thu được ở trên chúng tôi nhận thấy phương pháp hồi quy đa biến sử dụng mô hình hồi quy cấu tử chính cho kết quả tương đối tốt. Nồng độ SFG, SFM, TMP tính được sai khác không đáng kể so với nồng độ đã pha (sai số tương đối tính theo phương pháp này đều thuộc khoảng sai số cho phép, trừ một số thí nghiệm có chứa chất phân tích ở hàm lượng rất nhỏ). Do đó hoàn toàn có thể áp dụng phương pháp này để xác định đồng thời các hoạt chất trên trong cùng một hỗn hợp mà không cần tách loại.

3.3.3. Xác định giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp hồi quy cấu tử chính xác định đồng thời SFG, SFM, TMP và tá được

- Giới hạn phát hiện (LOD): là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa với tín hiệu mẫu trắng hay tín hiệu nền [9]. Theo đó nếu tính giới hạn phát hiện dựa trên tỷ số tín hiệu/nhiều (S/N) thì LOD được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 2-3 lần nhiều đường nền, thông thường lấy $S/N=3$

- Giới hạn định lượng của phương pháp (LOQ) được định nghĩa là nồng độ chất phân tích nhỏ nhất mà phép phân tích vẫn định lượng được chính xác với độ tin cậy 95%. Theo lý thuyết thống kê thì giới hạn định lượng là nồng độ chất phân tích có tín hiệu phân tích gấp 10 lần tín hiệu nhiễu của đường nền. [9]

Từ nền tảng lý thuyết ở trên, chúng tôi đã đưa tiến hành đo lặp lại 5 lần phổ đường nền của mẫu phân tích, từ đó thu được ma trận tín hiệu độ hấp thụ của 5 mẫu đường nền, tính độ lệch chuẩn của các tín hiệu này ta thu được ma trận Z có kích thước (1x312). Khi đó giá trị LOD, LOQ sẽ được tính toán theo công thức như dưới đây:

$$LOD = (3 \times Z) \times Fj \qquad LOQ = (10 \times Z) \times Fj$$

Trong đó:

Z: Là ma trận độ lệch chuẩn tín hiệu của các mẫu trắng

Fj: là ma trận hệ số hồi quy của phương trình hồi quy đa biến theo phương pháp PCR.

Bảng 3.7: Giá trị LOD, LOQ của phương pháp hồi quy cấu tử chính xác định đồng thời SFG, SFM, TMP và tá dược

Tên	LOD ($\mu\text{g}/\text{viên}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{viên}$)
SFG	5,9	19,7
SFM	10,4	34,5
TMP	14,2	47,5
Tá dược	39,5	13,2

3.4. Ứng dụng phân tích mẫu thực tế

Chúng tôi đã tiến hành lấy một số mẫu thuốc thực tế trên thị trường như bảng dưới đây để áp dụng quy trình phân tích đã nghiên cứu

Bảng 3.8: Mẫu thực tế

Mã hóa	Tên mẫu	Nhà sản xuất	Lô sản xuất	Hạn sử dụng
S1	Sulfaganin 500	CTCP Hóa- Dược phẩm Mekophar	12008AN	10/07/16
S2	Sulfaguanidin 500 mg	CTCP Dược phẩm TW1- Pharbaco	14004	03/06/17
S3	Sulfaguanidin 500 mg	CTCP Dược phẩm Hà Tây	711012	18/10/15
S4	Sulfaguanidin 500 mg	CTCP Dược phẩm TW2- Dopharma	00113	22/07/16
ST1	Trimesepton	CTCP Dược phẩm Hà Tây	281014	13/10/17
ST2	Vamidol 480	Công ty cổ phần SPM	1402003	21/02/17
ST3	Biseptol	SX nhượng quyền của: Pharmaceutical Works Polfa-Pabanice, Poland tại công ty cổ phần SPM	1401003	17/01/17
ST4	Trimezola	CTCP Dược phẩm TW2- Dopharma	00113	11/11/16

3.4.1. Phương pháp xác định một số hoạt chất thuốc kháng sinh thuộc nhóm Sulfamid bằng phương pháp phổ kế hồng ngoại gần và trung bình

3.4.1.1. Định tính mẫu thực tế

Tiến hành định tính các mẫu thực tế bằng cách so sánh dữ liệu phổ đo được với các dữ liệu trong thư viện phổ tự tạo nhóm Sulfamid và thư viện phổ tham chiếu ST- Japan spectral libraries. Kết quả thu được cho thấy tất cả các mẫu thực tế phân tích đều có chứa hoạt chất theo công bố của nhà sản xuất.

3.4.1.2. Định lượng mẫu thực tế

Tiến hành cân 20 viên thuốc, tính khối lượng trung bình viên và nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột mẫu (m_1) và thêm một lượng tá dược là tinh bột như trong bảng 3.9 để pha loãng hàm lượng hoạt chất trong các mẫu thực tế về khoảng hàm lượng đã khảo sát trong đường chuẩn, tiếp đó tiến hành như quy trình phân tích trong mục 2.2.

Bảng 3.9: Khối lượng bột viên và tá dược tinh bột trộn thêm vào các mẫu

Mẫu	KLTB của một viên (mg)	STT	$m_{\text{bột viên}}$ (mg) lấy phân tích	$m_{\text{tinh bột}}$ (mg) thêm vào
S1	586,0	Lần 1	63,6	45,9
		Lần 2	58,1	58,6
		Lần 3	57,6	43,9
S2	661,4	Lần 1	57,9	53,4
		Lần 2	70,3	40,5
		Lần 3	60,1	46,2
S3	566,5	Lần 1	61,9	40,3
		Lần 2	57,1	48,3
		Lần 3	58,5	48,4
S4	597,3	Lần 1	57,8	50,1
		Lần 2	61,7	43,5
		Lần 3	65,0	37,3
ST1	611,0	Lần 1	63,6	32,5
		Lần 2	58,1	26,9
		Lần 3	57,6	23,1
ST2	636,1	Lần 1	57,9	22,0
		Lần 2	70,3	26,1

		Lần 3	60,1	24,6
ST3	667,1	Lần 1	61,9	36,7
		Lần 2	57,1	35,3
		Lần 3	58,5	33,7
ST4	609,6	Lần 1	57,8	43,5
		Lần 2	61,7	33,6
		Lần 3	65,0	27,3

Bảng 3.10: Hàm lượng (mg/viên) của SFG trong các mẫu thực tế

Mẫu	Phương pháp hồng ngoại (mg/viên) với n=3	Phương pháp đối chứng (mg/viên) với n=3	Hàm lượng trên bao bì (mg/viên)
S1	465,9±2,2	483,5±0,4	500
S2	464,1±0,8	486,1±0,3	500
S3	454,0±1,2	494,4±0,3	500
S4	460,6±0,5	490,8±0,2	500

Bảng 3.11: Hàm lượng (mg/viên) của SFM và TMP trong các mẫu thực tế

Mẫu	Hàm lượng SFM (mg/viên) với n=3			Hàm lượng TMP (mg/viên) với n=3		
	PP hồng ngoại	PP đối chứng	HLtrên bao bì	PP hồng ngoại	PP đối chứng	HLtrên bao bì
ST1	364,6±1,8	391,2±0,2	400	76,9±1,8	77,5±0,3	80
ST2	371,2±1,2	395,2±0,9	400	78,1±1,2	81,6±0,4	80
ST3	365,9±1,0	394,4±0,2	400	77,0±1,0	77,5±0,2	80
ST4	368,6±0,7	389,2±0,6	400	77,6±0,70	80,6±0,4	80

Từ các kết quả thu được chúng tôi nhận thấy hàm lượng các hoạt chất thu được theo phương hồng ngoại với phương pháp phân tích tiêu chuẩn trong dược điển sai khác không đáng kể. Độ chệch

tương đối hàm lượng SFG giữa phương pháp hồng ngoại và phương pháp đối chứng lần lượt là: 3,6%; 4,5%; 8,2% và 6,2 %, SFM lần lượt là: 6,8%; 6,1%; 7,2% và 5,3%, TMP lần lượt là: 0,8%; 4,3%; 0,6% và 3,7%. Do đó, phương pháp phổ hồng ngoại gần và trung bình kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến tỏ ra khá ưu việt khi áp dụng vào phân tích một số hoạt chất nhóm sulfamid. Vì vậy, hoàn toàn có thể áp dụng phổ biến phương pháp này để phân tích nhanh hàm lượng các mẫu thuốc ngoài thị trường.

CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN

Với mục tiêu ban đầu đặt ra cho bài nghiên cứu này là định lượng một số hoạt chất thuốc kháng sinh thuộc nhóm Sulfamid bằng phương pháp quang phổ kế hồng ngoại gần và trung bình chúng tôi đã thu được một số kết quả sau:

- Đã tiến hành khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời 3 hoạt chất sulfaguanidin, sulfamethoxazol và trimethoprim bằng phương pháp phổ kế hồng ngoại gần và trung bình: lựa chọn vùng phổ nghiên cứu trong khoảng từ $3600-3000\text{ cm}^{-1}$, tỷ lệ trộn mẫu/KBr là (2:98).

- Đã tiến hành khảo sát các yếu tố như quá trình ép viên và các tá dược đi kèm. Nhận thấy các yếu tố này đều ảnh hưởng đến kết quả đo.

- Đã nghiên cứu khả năng xác định đồng thời 3 hoạt chất SFG, SFM, TMP sử dụng các mô hình hồi quy đa biến tuyến tính. Kết quả thu được cho thấy cả 3 phương pháp CLS, ILS và PLS đều mắc sai số rất lớn (đặc biệt là PLS). Phương pháp PCR với 3 cấu tử chính được lựa chọn để phân tích các mẫu kiểm chứng cho kết quả khá tốt: từ 0,2 - 10,5% (đều nằm trong ngưỡng cho phép).

- Nghiên cứu xác định giá trị LOD của SFG, SFM, và TMP lần lượt là: 5,9; 10,4 và 14,2 $\mu\text{g}/\text{viên}$. Giá trị LOQ lần lượt là: 19,7; 34,5 và 47,5 $\mu\text{g}/\text{viên}$.

- Ứng dụng phương pháp quang phổ hồng ngoại gần kết hợp với PCR để định lượng nhanh các mẫu thuốc trên thị trường. So sánh với phương pháp tiêu chuẩn qui định trong dược điển. Nhận thấy sai khác giữa hai phương pháp là không đáng kể. Độ chệch tương đối hàm lượng giữa hai phương pháp của SFG không quá 8,2%, SFM không quá 7,2%, TMP không quá 4,3%.

Kết quả thu được từ nghiên cứu này mở ra hướng nghiên cứu mới sử dụng các thiết bị đơn giản để xác định nhanh các chất trong mẫu đo phức tạp mà không cần phá mẫu hoặc xử lý nhanh tại chỗ, tạo điều kiện đưa phép phân tích ra khỏi phòng thí nghiệm.