

Nghiên cứu điều kiện phân tích thuốc kháng sinh họ β – Lactam trong các mẫu sinh học và dược phẩm

Trần Thị Dung

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Khoa Hóa học

L luận văn Thạc sĩ ngành: Hóa phân tích; Mã số: 60 44 29

Người hướng dẫn: PGS.TS. Nguyễn Văn Ri

Năm bảo vệ: 2011

Abstracts. Giới thiệu chung về chất kháng sinh; kháng sinh β – Lactam; các phương pháp định lượng β – Lactam. Tập trung nghiên cứu: Tối ưu hóa các điều kiện để điều chế dẫn xuất giữa các chất phân tích và thuốc thử 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F); Tối ưu hóa điều kiện tách bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo sử dụng detector huỳnh quang (RP-HPLC); Điều kiện định lượng; Phân tích mẫu thực, đánh giá khả năng áp dụng của phương pháp. Kết quả: Khảo sát các điều kiện tạo dẫn xuất giữa β - Lactam và thuốc thử NBD-F; Khảo sát các điều kiện chạy sắc ký; Chọn pha tĩnh; Chọn pha động; Đánh giá phương pháp phân tích; Phân tích mẫu thực; Kết quả một số phương pháp khác xác định kháng sinh cùng loại.

Keywords. Thuốc kháng sinh; Dược phẩm; Hóa phân tích

Content

I. Lí do chọn đề tài

Tách và xác định đồng thời kháng sinh β - Lactam bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng detector huỳnh quang trong mẫu sinh học và dược phẩm là một hướng nghiên cứu mới, với những ưu điểm của nó ngày càng được áp dụng nhiều trong các phòng thí nghiệm và phân tích mẫu dịch vụ. Trên cơ sở đó, chúng tôi chọn đề tài là: “**Nghiên cứu điều kiện phân tích thuốc kháng sinh họ β - Lactam trong các mẫu sinh học và dược phẩm**”.

II. Tổng quan

1.1. Kháng sinh β - Lactam

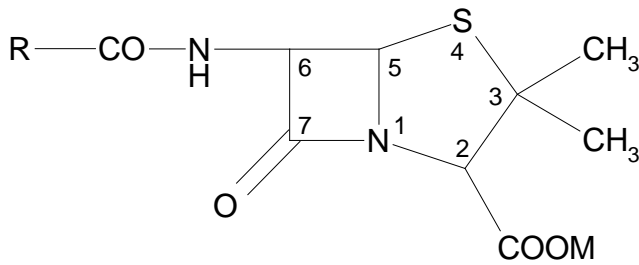
1.1.1. Định nghĩa

Là các kháng sinh mà phân tử chứa vòng β -Lactam. Gồm các nhóm: penicillin, cephalosporin, monobactam, cacbapenem trong đó hai nhóm sử dụng phổ biến và lớn nhất là penicillin và cephalosporin

1.1.2. Cấu trúc và phân loại

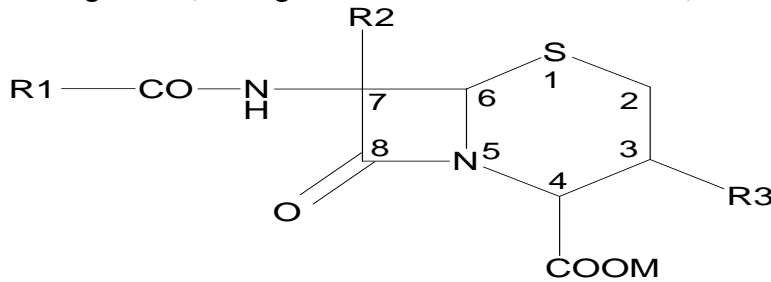
* Các penicillin

Các penicillin đều có cấu trúc cơ bản gồm 2 vòng: vòng thiazolidin, vòng β -Lactam



* Các cephalosporin

Các cephalosporin cấu trúc chung gồm 2 vòng: vòng β -Lactam 4 cạnh gắn với 1 dị vòng 6 cạnh, những carbon bất đối có cấu hình 6R, 7R. Khác nhau bởi các gốc R



1.1.3. Tính chất vật lý và hoá học

Các β -lactam thường ở dạng bột kết tinh màu trắng, dạng axit ít tan trong nước, dạng muối natri và kali dễ tan; tan được trong metanol và một số dung môi hữu cơ phân cực vừa phải. Tan trong dung dịch axit và kiềm loãng do đa phần chứa đồng thời nhóm COOH và -NH_2 .

Cực đại hấp phụ chủ yếu do nhân phenyl, tùy vào cấu trúc khác làm dạng phổ thay đổi (đỉnh phụ, vai, sự dịch chuyển sang bước sóng ngắn hoặc dài, giảm độ hấp thụ).

Các β -lactam là các axit với nhóm -COOH có $\text{pK}_a = 2,5-2,8$ tùy vào cấu trúc phân tử. Trong môi trường axit, kiềm, β -lactamase có tác dụng phân cắt khung phân tử, mở vòng β -lactam làm kháng sinh mất tác dụng.

1.1.4. Tình hình lạm dụng kháng sinh ở Việt Nam và trên thế giới hiện nay

Ta biết rằng, có nhiều loại kháng sinh khác nhau, tác động bằng các cơ chế khác nhau đối với các vi trùng khác nhau. Kháng sinh chỉ có tác dụng với các bệnh do vi trùng (bacteria), không có tác dụng với các bệnh do siêu vi (virus). Để điều trị bệnh nhiễm trùng cần biết loại vi trùng gây bệnh để chọn kháng sinh thích hợp. Vì thiếu hiểu biết và vì tin tưởng sai lầm, nên ở khắp nơi trên thế giới, nhất là ở các nước đang phát triển, người ta đã dùng kháng sinh quá nhiều, cả khi không cần thiết, không đúng chỉ định và không đúng cách. Từ đó, làm cho các vi khuẩn dần dần kháng thuốc, việc chữa trị bệnh ngày càng khó khăn và sự ô nhiễm môi trường do kháng sinh gây ra càng trầm trọng hơn [42].

Năm 2000, các bác sĩ Hoa kỳ viết 160 triệu toa thuốc kháng sinh cho 275 triệu người dân, một nửa đến 2/3 số toa đó được coi là không cần thiết. Theo R. Gonzales [4,46], 3/4 số kháng sinh dùng ở ngoại châu là cho viêm đường hô hấp trên trong khi 60% các trường hợp viêm đường hô hấp trên là do siêu vi, không cần và không điều trị được bằng kháng sinh. Dùng cephalosporins bừa bãi khiến enterococcus trở nên đề kháng và cũng đã xuất hiện các vi trùng enterococcus kháng vancomycin. Theo báo cáo của

A.W. McCormick [15] năm 2003, tỉ lệ pneumococcus kháng penicillin tăng nhanh ở Hoa Kỳ, tác giả dự tính đến năm 2004, 41% pneumococcus sẽ đề kháng penicillin. Tỉ lệ vi trùng lao kháng thuốc tăng cao khiến phải dùng 4 thứ thuốc kết hợp để điều trị bệnh lao.

1.2. Các phương pháp phân tích định lượng β -lactam

1.2.1. Phương pháp quang học

Phương pháp đo quang là phương pháp phân tích dựa trên tính chất quang học của chất cần phân tích như tính hấp thụ quang, tính phát quang... Các phương pháp này đơn giản, dễ tiến hành, thông dụng, được ứng dụng nhiều khi xác định β -lactam, đặc biệt trong dược phẩm.

1.2.2. Phương pháp điện hóa

Một số phương pháp điện hóa đã được ứng dụng để phân tích các β -lactam nhưng không phổ biến nhiều. Theo [26], Daniela P. Santos và cộng sự sử dụng sensor điện thế phân tích AMO, đạt giới hạn phát hiện 0,92 μ M (0,39 mg/l) trong môi trường đệm axetat 0,1M, pH= 5,2.

1.2.3. Phương pháp điện di mao quản (Capillary electrophoresis - CE)

Gần đây, phương pháp CE được sử dụng rộng rãi do tính chất ưu việt về hiệu quả tách cao, thời gian tách ngắn, lượng mẫu tiêu tốn ít. Phương pháp đã được ứng dụng để tách và xác định các kháng sinh β -lactam trong nhiều đối tượng mẫu khác nhau.

1.2.4. Sắc ký bản mỏng (TLC)

Phương pháp này đơn giản và không yêu cầu thiết bị đặc biệt dùng để kiểm tra đánh giá sơ bộ các chất phân tích có tính ưu việt, tiến hành nhiều mẫu cùng một lúc song song rất tiện lợi. Khi TLC được trang bị phần phát hiện là một máy đo quang có thể phân tích định tính và định lượng. Tuy nhiên phương pháp này chỉ dùng để định tính.

1.2.5. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Trong những năm gần đây, phương pháp HPLC đã đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong việc tách và phân tích các chất trong mọi lĩnh vực khác nhau, nhất là lĩnh vực hoá dược, sinh hoá, hoá thực phẩm, nông hoá, hoá dầu, hoá học hợp chất thiên nhiên, phân tích môi trường,... đặc biệt là tách và phân tích lượng vết các chất.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, mục tiêu và nội dung nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng và mục tiêu nghiên cứu

Hiện nay, các chỉ tiêu về chất lượng, dư lượng các chất độc hại là một vấn đề cấp thiết đang được quan tâm. Trong đó, chỉ tiêu về dư lượng kháng sinh trong mẫu thuốc và mẫu sinh học là một mảng đề tài rất thực tế và quan trọng. Như chúng tôi đã đề cập trong bản luận văn này, vấn đề lạm dụng không đúng hàm lượng kháng sinh đem lại rất nhiều tác hại và ảnh hưởng đến sức khoẻ con người.

Trong đề tài này, chất phân tích mà chúng tôi chọn để nghiên cứu là ampicillin (AMP), cephalixin (CEP), cefaclor (CEF) là các kháng sinh β - Lactam được sử dụng phổ biến hiện nay.

2.1.2. Nội dung nghiên cứu

Tập trung vào nghiên cứu các vấn đề sau:

1. Tối ưu hóa các điều kiện để điều chế dẫn xuất giữa các chất phân tích và thuốc thử 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F).

- Chọn nhiệt độ của phản ứng dẫn xuất hóa.
- Chọn thời gian của phản ứng dẫn xuất hóa.

2. Tối ưu hóa điều kiện tách bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo sử dụng detector huỳnh quang (RP-HPLC).

- Chọn bước sóng của detector
- Chọn pha tĩnh
- Tối ưu hoá pha động: pH, thành phần, tốc độ và các điều kiện khác,...

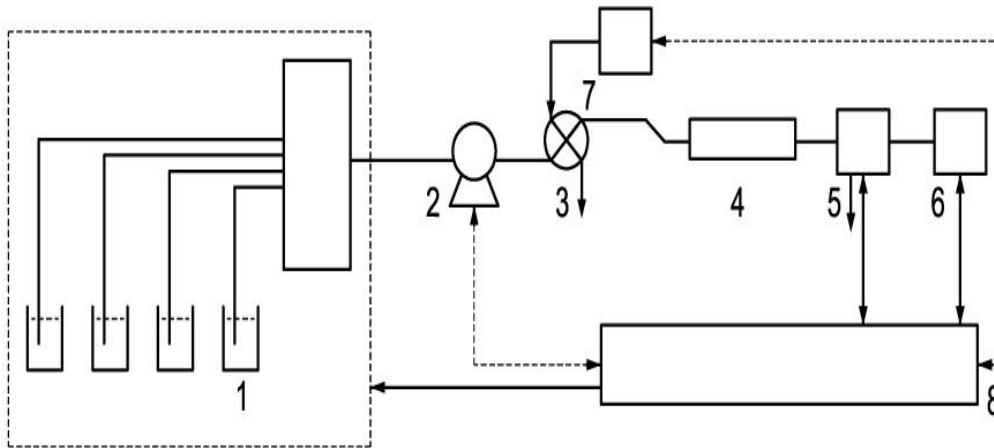
3. Điều kiện định lượng.

- Khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)
- Độ đúng và độ lặp lại của phép đo

4. Phân tích mẫu thực, đánh giá khả năng áp dụng của phương pháp.

- Phân tích mẫu dược phẩm (mẫu thuốc)
- Phân tích mẫu sinh học (mẫu nước tiểu và mẫu máu)
- So sánh với một số phương pháp khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu – Phương pháp RP-HPLC



Hình 2.1. Sơ đồ chức năng của thiết bị HPLC

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Bộ phận cấp dung môi (pha động) | 2. Bơm cao áp |
| 3. Van bơm mẫu | 4. Cột tách (pha tĩnh) |
| 5. Detector | 6. Máy ghi tín hiệu |
| 7. Bơm mẫu tự động | 8. Phần điều khiển, xử lý kết quả |

2.3. Kỹ thuật dẫn xuất hóa các β -Lactam với thuốc thử NBD-F

Như trên đã trình bày, detector huỳnh quang là một detector rất nhạy và có độ chọn lọc cao. Chính vì lý do này, kỹ thuật HPLC với detector huỳnh quang đang ngày càng được sử dụng rộng rãi trong phân tích lượng vết, nhất là trong phân tích các mẫu sinh học. Nhưng để sử dụng được kỹ thuật này, đòi hỏi chất phân tích hay sản phẩm của chất phân tích với một chất khác phải có khả năng phát huỳnh quang. Trong thực tế, không có nhiều chất mà bản thân nó tự phát ra huỳnh quang. Các thuốc kháng sinh β -Lactam cũng là những chất không tự phát huỳnh quang. Để sử dụng được kỹ thuật này, chúng ta phải dẫn xuất hóa nó với một chất khác.

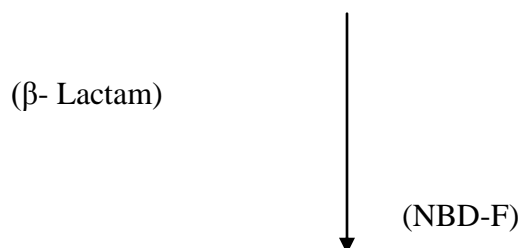
Theo [44], các tác nhân dẫn xuất hóa thường dùng là:

Các tác nhân	Phản ứng vào nhóm
4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin	Carboxylic acids
7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F)	Amines (bậc 1 và bậc 2) and thiols
1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride	Amines (bậc 1) and phenols
1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl hydrazine	Carbonyls

Trong bản luận văn này, chúng tôi chọn tác nhân dẫn xuất hóa (thuốc thử) là: 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F).

Cơ chế phản ứng [43]:

Các β -Lactam có nhóm amin bậc một có dạng công thức chung là R_1-NH_2



Như vậy, tác nhân dẫn xuất hóa NBD-F sẽ tấn công và thế vào những β -Lactam có nhóm amin bậc một ($-NH_2$). Cơ chế phản ứng rất đơn giản, tuy nhiên cần phải khảo sát các điều kiện về nhiệt độ và thời gian để phản ứng đạt hiệu suất cao nhất.

2.5. Cách tiến hành phản ứng:

Điều chế dẫn xuất giữa chất chuẩn β -lactam và thuốc thử NBD-F.

Hút 20 μ l dung dịch mỗi chất chuẩn nồng độ 100ppm và 60 μ l NBD-F 100ppm. Thực hiện phản ứng trong bình điều nhiệt ở một nhiệt độ và thời gian thích hợp. Dung dịch thu được đem pha loãng bằng dung môi là thành phần pha động đến một nồng độ xác định, sau đó đem phân tích trên HPLC với detector huỳnh quang.

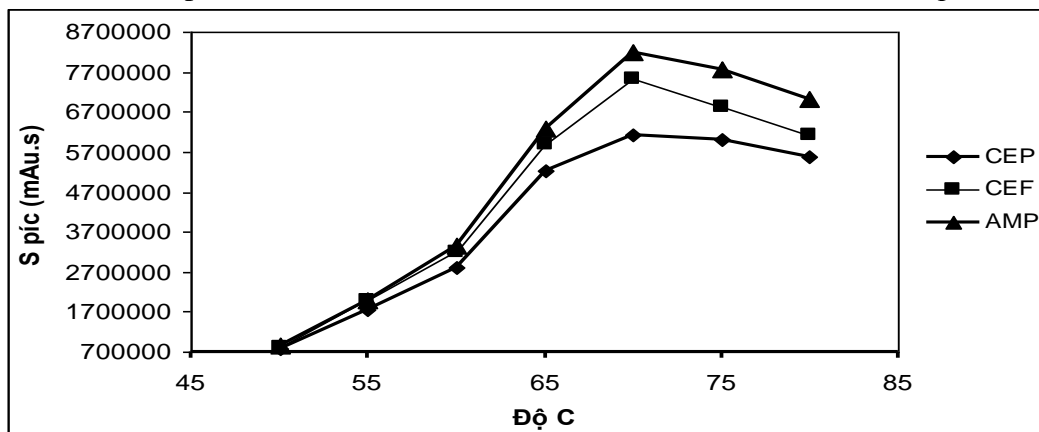
Đối với mẫu Blank, làm tương tự như mẫu phân tích, nhưng không cho chất phân tích.

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện tạo dẫn xuất giữa β -Lactam và thuốc thử NBD-F

3.1.1. Khảo sát nhiệt độ phản ứng dẫn xuất hóa

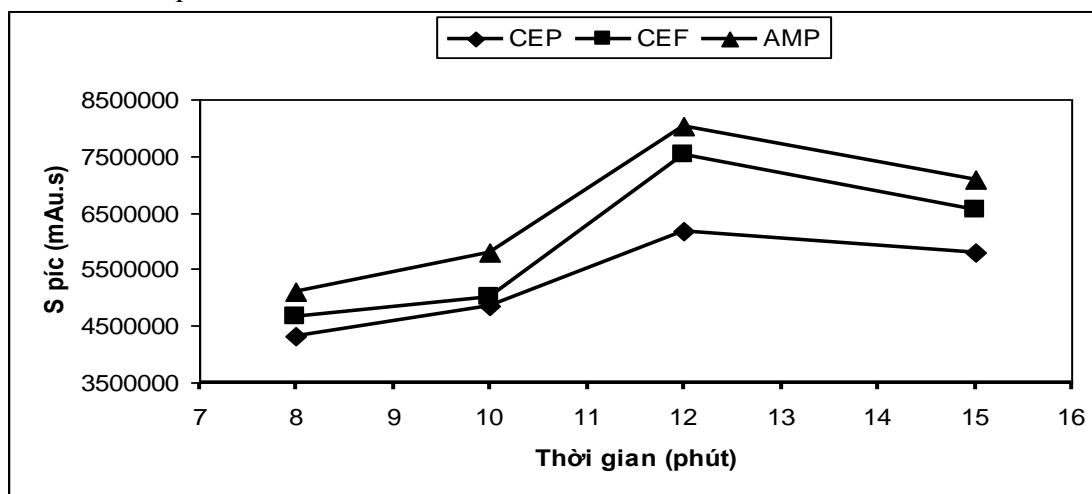
Nhiệt độ dẫn xuất hóa là một yếu tố rất quan trọng. Nhiệt độ thích hợp, chất phân tích phản ứng hoàn toàn với thuốc thử, làm cho kết quả của phép phân tích chính xác hơn. Trong phản ứng của chất phân tích với thuốc thử NBD-F, tham khảo các tài liệu trong nước và trên thế giới, chúng tôi tiến hành khảo sát nhiệt độ từ 50°C đến 80°C. Điều kiện chạy sắc ký là: bước sóng kích thích $E_x = 470\text{nm}$, bước sóng phát xạ $E_m = 530\text{nm}$, thể tích vòng mẫu $V = 20 \mu\text{l}$, vận tốc pha động $v = 1\text{ml/phút}$. Cột Supelcosil RP-C18, đệm acetat 10mM (pH=4,5), ACN/MeOH/đệm = 25/25/50, thu được các kết quả như sau:



Hình 3.2. Đồ thị sự phụ thuộc S_{pic} vào nhiệt độ phản ứng
($E_x=470\text{nm}$, $E_m=530\text{nm}$, $V=20 \mu\text{l}$, $v= 1\text{ml/phút}$. Cột RP-C18, đệm acetat 10mM (pH=4,5), ACN/MeOH/đệm = 25/25/50)

3.1.2. Khảo sát thời gian phản ứng dẫn xuất hóa

Thời gian của phản ứng dẫn xuất hóa cũng là một yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng tới hiệu suất phản ứng. Thời gian thích hợp, phản ứng xảy ra hoàn toàn, kết quả của phân tích chính xác hơn. Trong phản ứng này, chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian phản ứng từ 8 phút đến 15 phút. Điều kiện chạy sắc ký như trên, nhiệt độ dẫn xuất hóa là 70°C và thu được kết quả như sau:



Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc S_{pic} vào thời gian phản ứng

(ACN/MeOH/dệm Acetat = 25/25/50. Tốc độ 1ml/phút. Nồng độ đệm 10mM, pH=4,5; $E_x=470\text{nm}$; $E_m=530\text{nm}$)

3.2. Khảo sát các điều kiện chạy sắc ký

3.2.1. Chọn bước sóng của detector

$E_x=470\text{nm}$, $E_m=530\text{nm}$

3.2.2. Chọn thể tích vòng mẫu (sample loop)

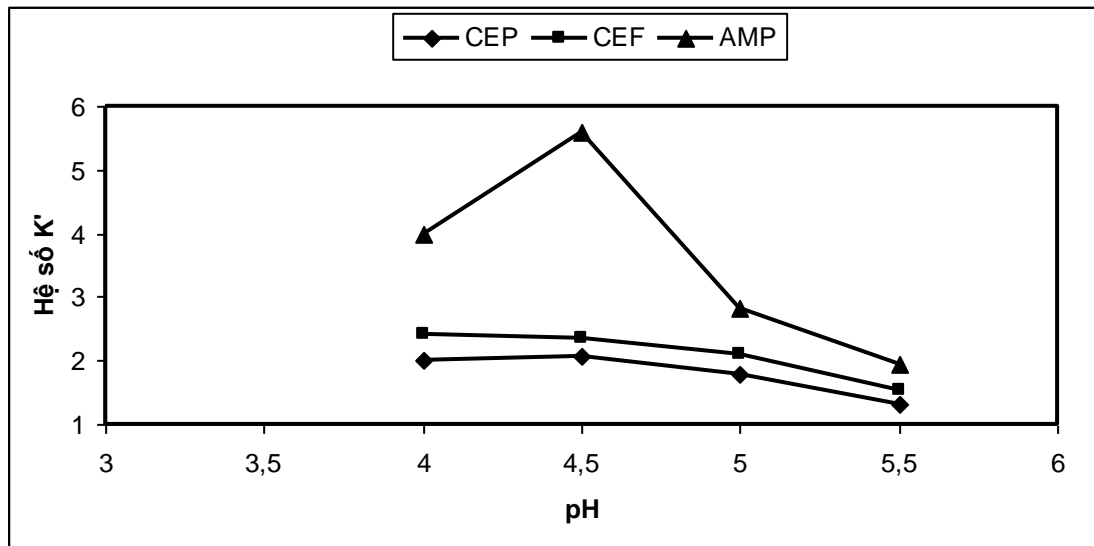
$V=20\text{ml}$

3.2.3. Chọn pha tĩnh

Cột c18

3.4.1. pH dung dịch đệm

Ảnh hưởng của pH có ý nghĩa rất lớn đối với trao đổi ion và trao đổi cặp . Với các kháng sinh họ β - Lactam có pKa nằm trong khoảng 2,6-2,8 là các chất có tính axit yếu, phức của nó với NBD -F cũng mang tính axit, do đó việc sử dụng dung dịch đệm có tính axit thường thu được các pic sắc ký rõ nét. Vì thế, chúng tôi chọn chọn và khảo sát thành phần dung dịch đệm $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ có nồng độ 10mM với khoảng pH thay đổi từ 4,0 – 5,5. Kết quả thu được như sau:



3.4.2. Tỷ lệ thành phần pha động

Tỷ lệ thành phần dung môi tạo ra pha động có ảnh hưởng đến quá trình rửa giải các chất mẫu ra khỏi cột tách. Khi tỷ lệ thành phần pha động thay đổi thì lực rửa giải của pha động thay đổi, tức là làm thay đổi thời gian lưu của chất phân tích ra khỏi cột và do đó làm thay đổi hệ số dung tích của chất phân tích.

Để có được một tỷ lệ thành phần pha động phù hợp cần tiến hành khảo sát với các tỷ lệ khác nhau. Với thành phần pha động đã lựa chọn gồm dung dịch đệm acetat 10mM, pH = 5,0; dung môi ACN và MeOH.

3.4.3. Nồng độ đệm acetat của pha động

Với các điều kiện đã lựa chọn, chúng tôi tiến hành khảo sát nồng độ dung dịch đệm acetat để có một thành phần pha động ổn định và cho hiệu quả sắc ký cao. Nồng độ dung dịch đệm được lựa chọn khảo sát trong khoảng 8-15mM. Nồng độ chất phân tích là 10ppm. Sau khi chạy sắc ký thu được kết quả sau:

Bảng 3.9. Diện tích pic chất phân tích tại nồng độ đậm khác nhau

C (mM)	S _{pic} (mAu.s)		
	CEP	CEF	AMP
8	5002346	5287564	5812064
10	6210682	7012650	8313428
12	6012578	6816423	7813468
15	5841326	6011986	7280256

(ACN/MeOH/đậm = 25/25/50. Tốc độ 1ml/phút, pH=5,0)

3.5. Hướng phát triển của đề tài

Trong bản luận văn này, do điều kiện còn hạn chế nên chúng tôi chỉ xác định được hàm lượng của β - Lactam bằng phương pháp HPLC sử dụng detector huỳnh quang. Chúng tôi chỉ dẫn xuất hóa được các β - Lactam có nhóm amin bậc một và so sánh với phương pháp điện di mao quản, phương pháp điện hoá, phương pháp HPLC sử dụng detector uv-vis trong mẫu dược phẩm, mẫu nước tiểu. Phương pháp còn có thể được mở rộng phân tích trong những dạng nền mẫu khác nhau ví dụ như: mẫu thực phẩm, mẫu sữa,... và các mẫu môi trường như: nước thải bệnh viện, nước thải trại chăn nuôi gia súc... Hay tìm ra kỹ thuật dẫn xuất hóa các β - Lactam không có nhóm amin bậc một với thuốc thử NBD-F. Vì vậy rất cần có những nghiên cứu tiếp theo để phát triển phương pháp áp dụng vào thực tiễn hơn.

V. KẾT LUẬN

Qua cơ sở nghiên cứu các điều kiện thực nghiệm, với mục đích ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector huỳnh quang để tách và xác định các kháng sinh CEP, CEF, AMP trong mẫu sinh học (mẫu nước tiểu, mẫu máu) và dược phẩm, chúng tôi thu được kết quả như sau:

Khảo sát và chọn được thông số tối ưu cho phản ứng dẫn xuất hóa và quá trình chạy sắc ký:

1. Các điều kiện tối ưu của phản ứng dẫn xuất hóa là:
 - Nhiệt độ phản ứng là : 70⁰C.
 - Thời gian dẫn xuất hóa là : 12 phút.
2. Điều kiện tối ưu để tách sắc ký các dẫn xuất β - Lactam như sau:
 - Pha tĩnh: Cột Supelcosil RP-C₁₈ với kích thước hạt nhỏ 5 μ m của hãng Sulpenco-Australia
 - Pha động:
 - + pH = 5,0
 - + Tỷ lệ ACN/MeOH/đậm là 25/25/50
 - + Nồng độ đậm 10mM
 - + Tốc độ 1ml/phút

+ Chạy đẳng dòng
+ Thể tích mẫu 20 μ l
+ Detector huỳnh quang. Bước sóng kích thích là $E_x=470\text{nm}$, bước sóng phát xạ $E_m=530\text{nm}$.

Đánh giá phương pháp phân tích:

- Xây dựng đường chuẩn các kháng sinh trong khoảng 0,05ppm đến 2,00ppm, hệ số tương quan các đường chuẩn $R^2 > 0,99$
- Giới hạn phát hiện LOD của các kháng sinh từ 0,009ppm đến 0,013ppm. Giới hạn định lượng LOQ từ 0,029ppm đến 0,044ppm.
- Độ chính xác ở các nồng độ 0,15ppm; 0,40ppm; 0,80ppm nằm trong khoảng 0,10% – 6,83 %.
- Hệ số biến động ở các nồng độ 0,15ppm; 0,40ppm; 0,80ppm nằm trong khoảng 0,65% - 4,75%.

Phân tích hàm lượng kháng sinh trong mẫu thuốc, nước tiểu và mẫu máu

Cách xử lý mẫu tiến hành đơn giản, không phải làm giàu, hiệu suất thu hồi là khá cao:

- Với mẫu thuốc: hiệu suất thu hồi đạt được từ 99,00% đến 106,00%.
- Với mẫu nước tiểu: hiệu suất thu hồi từ 96,00% tới 99,50%.
- Với mẫu máu: hiệu suất thu hồi là 93,50%.

References

TIẾNG VIỆT

1. Bộ Y Tế (2007), *Hóa dược*, tập 2, NXB Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y Tế (2002), *Dược điển Việt Nam*, xuất bản lần thứ 3, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Lê Thị Huyền Dương (2000), *Tách và phân tích đồng thời một số chất quan trọng trong nhóm vitamin A bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và điện di mao quản*, Luận án tiến sĩ, ĐH Quốc Gia Hà Nội.
4. Nguyễn Văn Đích (2005), "Không nên lạm dụng kháng sinh", *Báo y học và đời sống*, số 27, pp 55-57.
5. Trần Thị Thu Hằng (2009), *Tách và xác định β -Lactam trong đối tượng sinh học bằng phương pháp điện di mao quản*, luận văn thạc sĩ, ĐH Quốc gia Hà Nội.
6. Trần Tứ Hiếu, Từ Vọng Nghi, Nguyễn Văn Ri, Nguyễn Xuân Trung (2003), *Hoá học phân tích - Các phương pháp phân tích công cụ*.
7. Phạm Luận (1998), *Cơ sở lý thuyết phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao*, ĐH Quốc gia Hà Nội.
8. Phạm Luận (2004), *Giáo trình về những vấn đề cơ sở của kỹ thuật xử lý mẫu*, trường ĐH KHTN – ĐHQG Hà Nội.
9. Ngọc Phương (2006), "Thảm họa lạm dụng kháng sinh cho trẻ", *Báo laodong.com.vn*, 10-10-2006.
10. Nguyễn Văn Ri (2007), *Các phương pháp tách sắc ký*, chuyên đề cao học trường ĐH KHTN - ĐHQG Hà Nội.
11. Tạ Thị Thảo (2005), *Bài giảng chuyên đề thống kê trong hóa phân tích*, ĐH Quốc gia Hà Nội.
12. Lại Thị Thu Trang (2010), *Nghiên cứu các phương pháp sắc kí xác định thuốc kháng sinh họ β – Lactam*, luận văn thạc sĩ, ĐH Quốc gia Hà Nội

13. Trường ĐH Dược Hà Nội (1999), *Hóa Dược*, Tài liệu lưu hành nội bộ cho sinh viên trường ĐH Dược Hà Nội, NXB ĐH Dược Hà Nội.

TIẾNG ANH

14. Alison L. Spongberg, Jason D. Witter (2008), "Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio", *science of the total environment* 397 (2008), 148-157.
15. Althea W. McCormick (2003), "Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States", *Journal Nature medicine*, 9, 424 – 430.
16. Attila Gaspar, Melinda Andrasi, Szilvia Kardos (2002), "Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of cephalosporins", *Journal of Chromatography B*, 775(2), pp 239-246.
17. A. Fernandez-Gonzalez, R. Badia and M.E.Diaz-Gar (2003), "Micelle-mediated spectrofluorimetric determination of ampicillin based on metal ion-catalysed hydrolysis", *Analytica Chimica Acta*, 484(2), pp 239-246.
18. Bilal Awadallah, Peter C. Schmidt, Martin A. Wahl (2002), "Quantitation of the enantiomers in the parts per billion concentration range for in vitro drug absorption studies", *Journal of Chromatography A*, 988 (2003)135 – 143.
19. Biyang Deng, Aihong Shia, Linqiu Lia and Yanhui Kang (2008), "Pharmacokinetics of amoxicillin in human urine using online coupled capillary electrophoresis with electrogenerated chemiluminescence detection", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(4), 1249-1253.
20. C. Y. W Yang, W.H. Luo, E.B. Hansen, j.p. Freeman, H,C. Thompson (1996), "Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid-chromatography with precolumn formaldehyde", *Journal of AOAC International*, 79(2), 389-396.
21. C. Y. W Yang, W.H. Luo, E.B. Hansen, j.p. Freeman, H,C. Thompson (1996), "Rapid determination of ampicillin in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of AOAC International*, 80(1),. 107-190.
22. Dieter Adam (2002), "Global Antibiotic Resistance in *S.pneumoniae*" *Journal of antimicrobial Chemotherap*, 50 (Topic T1), 1-5.
23. David Felmingham (2002), "Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *S. pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in-vitro activity of the ketolide, telithromycin", *Journal of Antimicrobial Chemotherap*, 50, suppl 1, 25-37.
24. D. Hurtaud, Deleeine B; Sanders P. (1994), "Particle beam liquid chromatography-mass spectrometry method with negative ion chemical ionization for the confirmation of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin residues in bovine muscle", *Analyst*, 199(12), 2731-2736.
25. Daniela P. Santos, Marcio F. Bergamini and Maria Valnice B. Zanoni (2008), "Voltammetric sensor for amoxicillin determination in human urine using polyglutamic acid/glutaraldehyde film", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(2), pp 398-403.
26. D.P. Raymond (2001), "Impact of a rotating empiric antibiotic schedule on infectious mortality in an intensive care unit", *Journal of Critical Care Medicin*, 29(6):1101-1108.

27. Duoglas A Skoog., Donald M. West, James F. Holler (1996), *Fundamentals of Analytical chemistry*, 7th edition, Saunders College.
28. E. Benito-pena, A.I. Partal-Rodera, M.E. Leon-Gonzalez, M.C. Moreno-Bondi (2005), "Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection", *Analytical Chimica Acta*, 556(2), 415-422.
29. Elena Katz, Roy E. Steen, Peter Schoenmarker, Neil Miller (1998), *Hand book of HPLC*, Marcel Dekker, New York.
30. F. Belal, M. M. El-Kerdawy, S. M. El-Ashry and D. R. El-Wasseef (2000), "Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms", *Il Farmaco*, 55(11-12), pp 680-686.
31. Jae-Hoon Song and ANSORP members (2004), "Macrolide resistance and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP)", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 53, 457-463.
32. J.M. Cha, S. Yang, K.H. Carlson (2006), "Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1115(1-2), 46-57.
33. J.O. Boison, and Keng, L.J.Y. (1998), "Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues", *Journal of AOAC International*, 81(6), 1113-1120.
34. J.O. Boison, and Keng, L.J.Y. (1998), "Improvement in the Multiresidue liquid chromatographic analysis of residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues", *Journal of AOAC International*, 81(6), 1267-1272.
35. Kazuo iwaki, Norio Okumuru and Mitsuru Yamazaki and noriyuki Nimura and Toshio Kinoshita (1990), "Precolumn derivatization technique for high-performance liquid chromatographic determination of penicillins with fluorescence detection", *Journal of Chromatography*, 504(1), 359-367.
36. Kimai and Y. Watanabe (1981), "Fluorimetric determination of secondary amino acids by 7-Chloro-4-nitrobenzyl-2-oxa-1,3-diazole", *Analytica chimica Acta*, 130, 377-383.
37. L.Nozal, L.Arce1, A.R'ios2, M.Valcárcel (2004), "Development of a screening method for analytical control of antibiotic residues by micellar electrokinetic capillary chromatography", *Journal of Analytica Chimica Acta*, 523(2004), 21-28.
38. M.I Bailon-Perez, A.M. Garcia-Campana, C. Cruces-Blanco, M. del Olmo Iruela (2008), "Trace determination of β -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, 185(2), pp 273-280.
39. Michael R Jacobs. (2003), "The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents", *Journal of antimicrobial Chemotherap*, 52, 229-246.
40. Masaaki Kai, Hiromi Kinoshita, Mikio Morizono (2003), "Chromatographic determinations of a β -lactam antibiotic, cefaclor by means of fluorescence,

- chemiluminescence and massspectrometry”, *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 329 – 340.
41. Merk (1996), *The Merck Index*, 12th edition.
 42. Nigel J.K Simpson (2000), *Solid-phase extraction*, Marcel Dekker, New York.

 43. Osama Al-Dirbasi, Naotaka Kuroda, Kenichiro Nakashimab (1998), “Characterzation of the Fluorescence properties of 4 - fluoro-7-nitro benzo-2-oxa-1,3-diazole”, *Analytica Chimica Acta*, 365, 169-176.
 44. Pradyot Patnaik (1989), *Dean’s Analytical Chemistry Handbook*, McGraw-Hill Companies, New york.
 45. R. Gonzales (2001), "linical infectious diseases", University of Chicago. Press, 23, 757-762.
 46. Richard P. Wenzel, M.D Michael B. Edmond, M.D, M.P.H (2000), " Managing Antibiotic Resistance", *New England Journal of Medicine*, 343, 1961-1963.
 47. Rolando Gonzalez-Henandez, Nuevas-Pez Lauro, Soto-Mulet Laritza, Lopez-Lopez Miguel, Hoogmartens Joseph (2001), “ Reversed phase high performance liquid chromatographic determination of cefixime in bulk drugs”, *Journal of liquid Chromatography and related technologies*, 24(15), 2315-2324.

 48. Toshimasa Toyoka, Yoshihico Watanabe and Kzuhiro Imai (1983), “Reaction of biological important with 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole”, *Analytica Chimica Acta*, 149, 305-312.
 49. Wei Liu, Zhujun Zhang, Zuoqin Liu(2007), "Determination of -lactam antibiotics in milk using micro-flow chemiluminescence system with on-line solid phase extraction", *Analytica Chimica Acta*, 592(2), 187–192.
 50. WJ Blanchflower, Hewitt SA, Kennedy DG (1994), "Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography - electrospray mass spectrometry", *Analyst*, 119(12), 2595-2601.