

Nghiên cứu định lượng Pantoprazol trong huyết tương chó bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

**Đào Văn Đôn^{*,*}; Quách Thị Hà Vân^{*}; Nguyễn Văn Thịnh^{*}
Vũ Bình Dương^{*}; Nguyễn Văn Long^{*}**

TÓM TẮT

Tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng pantoprazole trong huyết tương chó. Các bước tiến hành như sau: 1,0 ml mẫu huyết tương cho thêm 4 ml hỗn hợp methyl-tert butyl: diethyl ether (7:3), lắc xoáy trong 3 phút, ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút/5 phút.

Cột Gemini C18, 5 μ m, 250 x 4 mm; pha động ACN: K₂HPO₄ 0,01 M pH 6,0 (39/61 v/v). Khảo sát độ tuyến tính trong khoảng nồng độ 20 - 5,000 ng/ml. Phương pháp HPLC có độ chính xác trong ngày và khác ngày lần lượt là 1,4 - 5,2% và 1,5 - 4%. Độ đúng trong ngày và khác ngày tương ứng là 99,3 - 102,2% và 100,7 - 103,5%. Đã xây dựng được các nhu cầu của phương pháp phân tích dịch sinh học.

* Từ khoá: Pantoprazol; Sắc ký lỏng hiệu năng cao; Định lượng; Huyết tương chó.

Determinatin of pantoprazonle in dog lpassma by high performance liquid chromatography

SUMMARY

A sensitive and selective high performance liquid chromatography (HPLC) method with UV detection (290 nm) was developed and validated for quantitation of pantoprazole, proton-pump inhibitor, in dog plasma. Following a single-step liquidliquid extraction with methyl tert -butyl ether/diethyl ether (70/30, v/v), the analyte and internal standard (lansoprazole) were separated using an isocratic mobile phase of 10 mM phosphate buffer (pH 6.0)/acetonitrile (61/39, v/v) on reverse phase Phenomenex Gemini C18 column 5 μ m, 250 x 4 mm. The lower limit of quantitation was 20 ng/mL, with a relative standard deviation of less than 3%. A linear range of 20 - 5,000 ng/mL was established. This HPLC method was validated with between-batch and within-batch precision of 1.4 - 5.2% and 1.5 - 4.0%, respectively. The between-batch and within-batch accuracy was 99.3 to 102.2% and 100.7 to 103.5%, respectively. This validated method is sensitive and repeatable enough to be used in pharmacokinetic and bioequivalence studies

* Key words: Pantoprazole; HPLC; UV; Dog plasma.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Pantoprazol (PAN) thuộc nhóm thuốc chẹn bơm proton và được sử dụng trong điều trị bệnh viêm loét dạ dày - tá tràng, một

bệnh khá phổ biến ở Việt Nam. Pantoprazol kém bền, dễ bị phân hủy trong môi trường axit dịch vị nên rất khó khăn trong bào chế và tạo ra sinh khả dụng rất thất thường [1]. Do đó, thuốc cần được đánh giá về tính sinh

* Học viện Quân y

Phán biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

khả dụng và tương đương sinh học để đảm bảo chất lượng thuốc. Đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học trên động vật thực nghiệm ở giai đoạn nghiên cứu bào chế rất cần thiết, vì sẽ giúp cho nhà sản xuất tiết kiệm được chi phí nhiều so với việc đánh giá tương đương sinh học trên người [3, 4, 5]. Xây dựng quy trình định lượng pantoprazol trong dịch sinh học là nội dung quan trọng trong đánh giá tương đương sinh học. Vì vậy, để hỗ trợ nghiên cứu bào chế viên pantoprazol, chúng tôi tiến hành nghiên cứu định lượng pantoprazol trong huyết tương chó bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên vật liệu và thiết bị.

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

2. Phương pháp nghiên cứu.

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

* *Độ đặc hiệu-chọn lọc:*

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

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xây dựng quy trình định lượng pantoprazol trong huyết tương chó.

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

- Xử lý mẫu: lấy 1 ml huyết tương chó, thêm 50 μ l nội chuẩn lansoprazol có nồng độ 50 μ g/ml và 4 ml hỗn hợp methyl tert butyl: diethyl ether (7:3, v/v), lắc xoáy trong 3 phút. Ly tâm 3.000 vòng/phút trong 5 phút, lấy 3 ml lớp dung môi phía trên bốc hơi dung môi ở 35°C với dòng N₂ nhẹ tới cạn. Hòa tan cạn trong 500 μ l MeOH 50% và phân tích bằng HPLC.

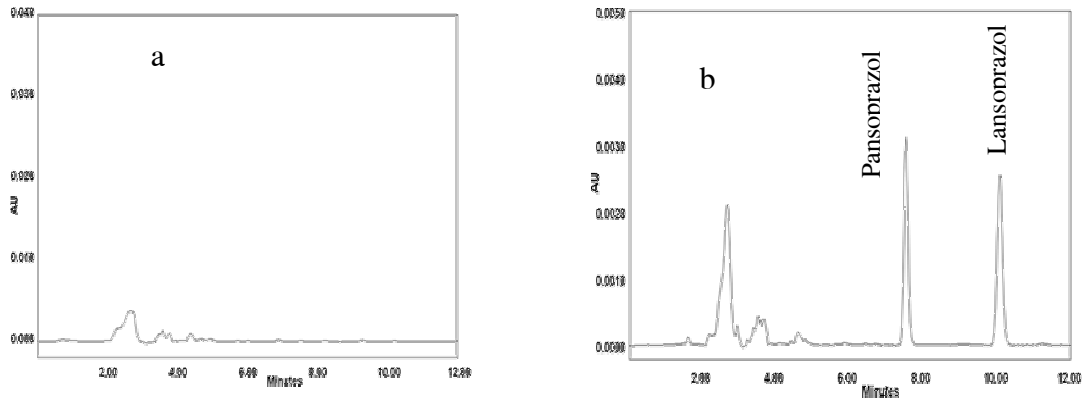
- Điều kiện sắc ký: cột Gemini C18, 5 μ m, 250 x 4 mm; 40°C; pha động ACN: K₂HPO₄ 0,01M pH 6,0 (39/61, v/v), 1,0 ml/phút; detector UV 296 nm; thể tích tiêm mẫu 100 μ l.

2. Kết quả thẩm định quy trình định lượng pantoprazol trong huyết tương chó.

* *Chuẩn bị mẫu phân tích:*

- Dung dịch gốc pantoprazol pha trong MeOH 50% có nồng độ 1 mg/ml và từ đó pha loãng thành các dung dịch thứ cấp để khi thêm 50 μ l dung dịch này vào 950 μ l huyết tương trắng tạo ra nồng độ pantoprazol trong huyết tương là 20; 50; 100; 500; 1000; 2500; 5000 ng/ml.

- Mẫu QC có nồng độ 60 ng/ml (LQC), 2000 ng/ml (MQC) và 4000 ng/ml (HQC).



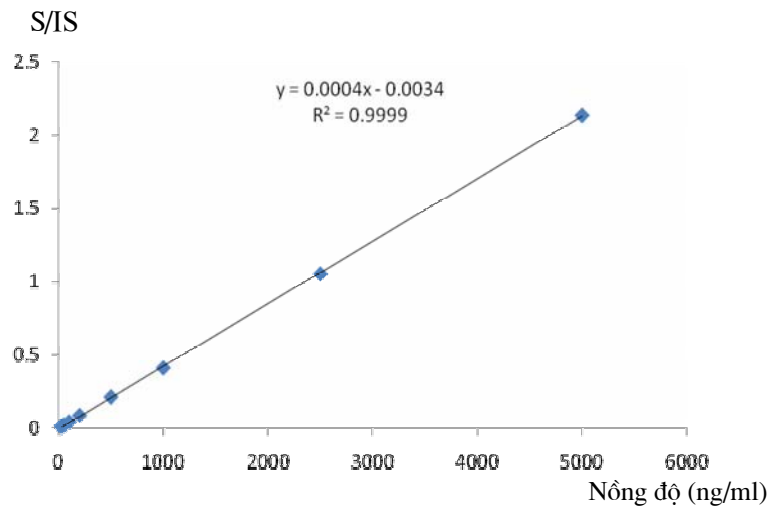
Hình 1: Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng (a), mẫu huyết tương có thêm PAN và nội chuẩn (b).

Phân tích các huyết tương trắng và mẫu thử có chuẩn và nội chuẩn. Kết quả phân tích cho thấy: tại thời điểm xuất hiện pic chuẩn PAN (tR = 7,9 phút) và nội chuẩn LAN (tR = 10,5 phút) trong mẫu thử không thấy xuất hiện trong mẫu trắng. Phương pháp phân tích đã đảm bảo nhận diện, phân biệt được pantoprazol, lansoprazol và không bị ảnh hưởng bởi các tạp chất có trong huyết tương chó.

* Giới hạn định lượng dưới:

Phân tích 6 mẫu trắng và 6 mẫu chuẩn LLOQ (20 ng/ml). Kết quả cho thấy: tỷ lệ đáp ứng của mẫu chuẩn gấp từ 6 - 8 lần (> 5 lần) đáp ứng của mẫu trắng; đáp ứng mẫu chuẩn có độ lặp lại cao với RSD = 2,4% (< 20%); độ đúng so với nồng độ thực có trong mẫu 96 - 104% (trong khoảng 80 - 120%). Như vậy, mẫu chuẩn chứa PAN có nồng độ 20 ng/ml, đáp ứng yêu cầu LLOQ của phương pháp phân tích dịch sinh học.

* Đường chuẩn và khoảng tuyến tính:



Hình 2: Tương quan giữa nồng độ pantoprazol với tỷ lệ diện tích pic S/IS.

Tiến hành khảo sát độ tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 20 - 5.000 ng/ml. Kết quả cho thấy: trong khoảng nồng độ khảo sát, có sự tương quan tuyến tính (hệ số tương quan $R^2 \approx 1$) giữa nồng độ PAN trong mẫu huyết tương (X - ng/ml) với tỷ lệ diện tích pic chuẩn/nội chuẩn thu được (Y) và thể hiện qua phương trình hồi quy $Y = 0,0004 \cdot X - 0,0034$.

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

Bảng 1: Tương quan giữa nồng độ pantoprazol với tỷ lệ diện tích pic S/IS.

Nồng độ (ng/ml)	S	IS	S/IS
20	3200	357213	0,009
50	15057	685626	0,022
100	29640	704453	0,0421
200	59249	686423	0,0863
500	145533	685894	0,2122
1000	290515	711339	0,4084
2500	748269	710376	1,0533
5000	1520283	711263	2,1374
a = 0,0004; b = 0,0034; R = 0,9999			

Tiến hành khảo sát độ đúng - độ chính xác ở 3 mức nồng độ LQC (60 ng/ml), MQC (2.000 ng/ml) và HQC (4.000 ng/ml). Ở mỗi nồng độ, xử lý 5 mẫu độc lập và phân tích lặp lại vào 3 ngày khác nhau. Kết quả bảng 1 cho thấy: độ đúng trong ngày và khác ngày lần lượt là 99,3 - 102,2% và 100,7 - 103,5% (trong khoảng 85 - 115%); độ chính xác trong ngày và khác ngày lần lượt là 1,4 - 5,2% và 1,5 - 4% (< 15%).

* Hiệu suất chiết:

Xác định hiệu suất chiết của chất chuẩn và nội chuẩn bằng cách so sánh diện tích pic của PAN và LAN từ mẫu huyết tương định lượng theo phương pháp trên với diện tích pic của chúng trong mẫu pha động có chứa cùng nồng độ chất chuẩn hoặc nội chuẩn. Kết quả nghiên cứu cho thấy: hiệu suất chiết của nội chuẩn tại nồng độ 2,5 $\mu\text{g/ml}$ là $72,6 \pm 1,4\%$; hiệu suất chiết chuẩn PAN ở 3 mức nồng độ LQC, MQC và HQC lần lượt là $70,2 \pm 2,9\%$; $72,2 \pm 0,6\%$ và $73,5 \pm 0,5\%$. Hiệu suất chiết của chuẩn vào nội chuẩn có độ lặp lại tốt với $\text{RSD} < 5\%$.

* Độ ổn định:

- Độ ổn định của dung dịch gốc và nội chuẩn gốc: khi được bảo quản ở -20°C và phân tích nồng độ sau 20, 40, 60 ngày bảo quản. Kết quả cho thấy: sự khác biệt về nồng độ giữa các ngày không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, dung dịch gốc ổn định trong 60 ngày khi bảo quản ở -20°C .

- Độ ổn định sau ba chu kỳ đông - rã đông:

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

GIAI ĐOẠN	NỒNG ĐỘ (ng/ml)	
	LQC	HQC
Ban đầu	57,7 ± 0,8	8160,4 ± 210,6
Sau 3 chu kỳ đông - rã	57,9 ± 1,1	8068,3 ± 192,7
p	> 0,05	> 0,05

Tiến hành chuẩn bị 3 mẫu LQC và 3 mẫu HQC, bảo quản 24 giờ ở -50°C, sau đó để rã hoàn toàn ở nhiệt độ phòng, rồi để lại tủ lạnh. Phân tích mẫu sau 3 chu kỳ đông rã, so sánh với mẫu fresh, kết quả cho thấy mẫu ổn định sau 3 chu kỳ đông rã.

- Độ ổn định ngắn hạn:

Bảng 3: Xác định độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu.

GIAI ĐOẠN	NỒNG ĐỘ (ng/ml)	
	LQC	HQC
Tại 0h	60,5 ± 0,18	7929,5 ± 0,223,2
4h sau đông rã	60,3 ± 0,15	7931,7 ± 0,224,8
p ₀₋₄	> 0,05	> 0,05

Đánh giá độ ổn định trên 3 mẫu LQC và 3 mẫu HQC phân tích ngay sau khi đông rã và sau đông rã 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Kết quả cho thấy mẫu ổn định sau đông rã 4 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Độ ổn định dài ngày: đánh giá độ ổn định của mẫu huyết tương trên các mẫu LQC và HQC. Xác định nồng độ PAN có trong mẫu tại các thời điểm ngay sau khi pha và sau 7, 14, 28 ngày bảo quản mẫu ở -50°C, theo phương pháp phân tích đã được xây dựng. Kết quả cho thấy mẫu ổn định trong thời gian 28 ngày (p > 0,05).

Kết quả thẩm định độ đặc hiệu chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, hiệu suất chiết và độ ổn định cho thấy, phương pháp đáp ứng các yêu cầu phân tích dùng trong sinh học, có thể áp dụng để định lượng PAN trong huyết tương chó ở các nghiên cứu sinh khả dụng và đánh giá tương đương sinh học các chế phẩm chứa PAN.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng pantoprazol trong huyết tương chó: 1,0 ml mẫu huyết tương được thêm 4 ml hỗn hợp methyl tert butyl: diethyl ether (7:3), lắc xoáy trong 3 phút, ly tâm ở tốc độ 3.000 vòng/phút/5 phút, lấy 3 ml lớp dung môi chiết ở trên, bay hơi dung môi dưới dòng N₂ ở nhiệt độ phòng. Cận thu được thêm 500 µl MeOH 50%, lắc xoáy 1 phút, ly tâm 10.000 vòng/phút/10 phút. Dung dịch thu được dùng để tiêm sắc ký HPLC với điều kiện sau: cột Gemini C18, 5 µm, 250 x 4 mm; 40°C; pha động ACN - đệm K₂HPO₄ 0,01M pH 6,0 tỷ lệ 39:61 (v/v); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; detector UV 296 nm; thể tích tiêm mẫu 100 µl; nội chuẩn là lansoprazol.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Quách Thị Hà Vân*. Nghiên cứu sinh khả dụng và đánh giá tương đương sinh học viên nang Omeprazol 20 mg theo mô hình đơn liều kết hợp với đa liều. Luận văn tốt nghiệp Thạc sỹ Dược học. Học viện Quân y. 2006.
2. *Center for drug Evaluation and Research*. Guidance for industry. Bioanalytical method validation. FDA, US, Department of health and human service. 2001.
3. *N.V.S. Ramakrishna, K.N. Vishwottam, S. Wishu, M. Koteshwara*. High-performance liquid chromatography method for the quantification of pantoprazole in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005, 822, pp.326-329.
4. *M. A. Pue, J. Laroche, I. Meineke, and C. de Mey*. Pharmacokinetics of pantoprazole following single intravenous and oral administration to healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1993, 44. pp.575-578.
5. *Sivakumar Thanikachalam, Manavalan Rajappan, Valliappan Kannappan*. Stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of pantoprazole and domperidone from their combination drug product. *Chromatographia*. 2008, 67, pp.41-47.