

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG IBUPROFEN TRONG HUYẾT TƯƠNG CHÓ

Nguyễn Hữu Mỹ *
Nguyễn Văn Minh*
Nguyễn Văn Long**

TÓM TẮT

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao được nghiên cứu để định lượng ibuprofen trong huyết tương chó. Các điều kiện sắc ký: cột RP 18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), detector UV ở 223 nm, pha động là hỗn hợp acetonitril và đệm phosphat 0,02 M (pH 6,5) (30 : 70 v/v) với tốc độ dòng 1,2 ml/phút. Khoảng nồng độ tuyến tính của ibuprofen từ 1 - 20 μ g/ml, giới hạn định lượng là 1 μ g/ml. Phương pháp có độ lặp lại cao (RSD < 3%), độ chính xác (tỷ lệ thu hồi > 96%), quá trình chuẩn bị mẫu đơn giản, phù hợp cho nghiên cứu dược động học.

*Từ khóa: Ibuprofen; Sắc ký lỏng hiệu năng cao; Huyết tương chó.

STUDY OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF IBUPROFEN IN DOG PLASMA

Nguyen Huu My
Nguyen Van Minh
Nguyen Van Long

SUMMARY

A high performance liquid chromatography (HPLC) method was studied to quantitate ibuprofen in dog plasma. Chromatographic conditions: RP 18 column (150 x 4.6 mm, 5 μ m), an UV detector set at 223 nm, mobile phase consisted of a binary mixture of acetonitrile and 0.02 M phosphate buffer (pH 6.5) (30 : 70 v/v) delivered at a flow rate of 1.2 ml/min. The linear range of ibuprofen concentration was from 1.0 to 20.0 μ g/ml with a limit of quantitation of 1.0 μ g/ml. The repeatability and the trueness of the method was high (RSD < 3%, the mean recoveries was over 96%). The sample preparation was simplified and suitable for the pharmacokinetic studies.

*Key words: Ibuprofen; HPLC; Dog plasma.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ibuprofen là thuốc chống viêm không steroid, có tác dụng giảm đau, hạ sốt, chống viêm, dạng bào chế phổ biến nhất là viên nén. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị của viên nén đôi khi không đạt như mong muốn. Hiệu quả điều trị của thuốc phụ thuộc vào lượng dược chất tại nơi tác dụng (cơ quan đích) nên theo quan điểm dược động học, nên lấy nồng độ dược chất trong máu để đánh giá hiệu quả điều trị của thuốc trên cơ sở công nhận có sự tương quan

* Học viện Quân y

** Trường Đại học Dược Hà Nội

Phản biện khoa học: GS.TS. Nguyễn Văn Mùi

ĐỒNG BIẾN GIỮA NỒNG ĐỘ D-ỢC CHẤT TRONG MÁU VÀ NƠI TÁC DỤNG. DO VẬY, VIỆC XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ IBUPROFEN TRONG MÁU LÀ RẤT CẦN THIẾT, QUA ĐÓ ĐÁNH GIÁ Đ-ỢC T-ƠNG Đ-ƠNG SINH HỌC CỦA THUỐC.

Ph- ơng pháp xác định nồng độ thuốc trong máu phải có độ chọn lọc cao để phân biệt đ- ợc d- ợc chất với chất chuyển hoá và nhiều thành phần cản trở khác có sẵn trong dịch sinh học. Thiết bị đ- ợc sử dụng nhiều nhất để phân tích thuốc trong dịch sinh học là máy sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Chó đ- ợc xem là loài động vật thích hợp trong nghiên cứu d- ợc động học của thuốc do đặc điểm đ- ờng tiêu hoá gần giống với ng- ời, có thể lấy máu với thể tích đủ cho nghiên cứu, giá thành hợp lý.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đặt mục tiêu *Xây dựng ph- ơng pháp định l- ợng ibuprofen trong huyết t- ơng chó bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao.*

VẬT LIỆU VÀ PH- ƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

** Nguyên liệu, hoá chất nghiên cứu:*

- Ibuprofen chuẩn (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung - ơng SKS 0103130).
- Viên nén th- ơng mại ibuprofen 200 mg do Công ty D- ợc phẩm n- ớc ngoài X sản xuất, số lô: 1304, hạn dùng: 12-2006.
- Acetonitril, methanol, natri dihydro phosphat đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC, natri hydroxyd, acid phosphoric... đạt tiêu chuẩn PA.
- Huyết t- ơng chó (mẫu trắng và mẫu thử) đ- ợc lấy từ một nghiên cứu khác.

** Ph- ơng tiện, thiết bị nghiên cứu:*

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters (Mỹ), máy đo pH Eutech 510.
- Máy lắc siêu âm Soliclean (Australia), máy li tâm 7100 vòng/phút (Mỹ).
- Cân phân tích có độ chính xác 0,1 mg Shimadzu AY 220.

2. Ph- ơng pháp nghiên cứu.

** Ph- ơng pháp xử lý mẫu, tính hiệu suất chiết:*

- Xử lý mẫu: 2 ml huyết t- ơng, acid hoá bằng 5 giọt acid HCl 10%, thêm 5 ml chloroform, lắc trên máy lắc trong 25 phút, gạn lấy dịch chloroform, lọc qua natri sulfat khan. Bốc hơi 2 ml dịch chloroform ở điều kiện th- ờng, hoà tan lắng cặn bằng 2 ml methanol, lọc rồi bơm vào máy HPLC.

- Tính hiệu suất chiết: tiến hành chiết 1 lần dung dịch ibuprofen chuẩn pha trong huyết t-ong có nồng độ 2 µg/ml và 20 µg/ml bằng chloroform, tính hiệu suất dựa vào diện tích pic của dung dịch ibuprofen trong methanol có cùng nồng độ.

* *Ph-ong pháp định l-ong:*

- Điều kiện sắc ký: dựa trên kết quả các công trình nghiên cứu của n-ớc ngoài đã đ-ợc công bố, tiến hành sắc ký thăm dò trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters (Mỹ) tìm đ-ợc điều kiện sắc ký phù hợp:

- Cột pha đảo C18 kích th-ớc 150 x 4,6 mm, hạt 5 µm.

- Detector UV 223 nm, tốc độ dòng 1,2 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 µl.

- Pha động: acetonitril, đệm phosphat 0,02 M (pH 6,5) (30:70 v/v).

Pha dung dịch đệm: pha dung dịch kali dihydrophosphat 0,02 M, điều chỉnh pH tới 6,5 bằng dung dịch natri hydroxyd 10%.

- Thẩm định ph-ong pháp định l-ong:

+ Đ-ờng chuẩn và khoảng tuyến tính: sử dụng các dung dịch chuẩn ibuprofen tự tạo pha trong huyết t-ong trắng. Dự đoán khoảng nồng độ ibuprofen trong huyết t-ong chó để pha dãy dung dịch chuẩn có nồng độ 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20 µg/ml. Tiến hành xử lý theo qui trình rồi chạy sắc ký.

+ Độ lặp lại: tiến hành sắc ký 5 lần các dung dịch chuẩn ibuprofen có nồng độ 1; 10; 20 µg/ml.

+ Độ chính xác: tiến hành bằng phương pháp “thêm chuẩn” vào dung dịch có nồng độ 2; 10 µg/ml, xử lý mẫu theo qui trình rồi chạy sắc ký. Tính l-ong ibuprofen tìm lại.

+ Giới hạn định l-ong: xác định tại nồng độ thấp nhất trong khoảng tuyến tính có độ lặp lại phù hợp (RSD < 10%).

- Độ ổn định mẫu: theo dõi độ ổn định của mẫu thử bảo quản trong ngăn đá tủ lạnh 8 và 45 ngày.

* Ph-ong pháp xử lý số liệu: sử dụng phần mềm Excel 2003.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Hiệu suất chiết ibuprofen từ huyết t-ong chó.

Bảng 1: Hiệu suất chiết ibuprofen từ huyết t-ong chó bằng chloroform.

MẪU	HIỆU SUẤT CHIẾT (%)	
	Nồng độ 2 µg/ml	Nồng độ 20 µg/ml
1	84,09	78,88
2	76,17	78,52
3	76,04	79,27
4	88,95	78,94
5	82,70	79,84
Trung bình	82,59	79,09
SD	5,52	0,50
RSD (%)	6,77	0,63

* Hiệu suất chiết ibuprofen từ huyết t-ong chó (chiết 1 lần) ở nồng độ 2 µg/ml và 20 µg/ml đạt cao (khoảng 80%), độ lặp lại tốt với RSD < 6,8%.

2. Phương pháp định lượng ibuprofen trong huyết t-ong chó.

- Tính thích hợp của hệ thống sắc ký:

* Pic ibuprofen đ-ợc tách hoàn toàn khỏi các chất ảnh h-ởng có trong huyết t-ong, nhon, cân đối, có thời gian l- u ổn định khoảng 5,5 phút (n= 5, RSD<1%), diện tích pic có độ lặp lại cao (n= 5, RSD < 3%). Kết quả này cho thấy hệ thống sắc ký t-ong thích với chất phân tích.

- Đ-ờng chuẩn và khoảng tuyến tính:

Bảng 2: Sự phụ thuộc giữa nồng độ ibuprofen chuẩn pha trong huyết t-ong và diện tích pic (n=5).

NỒNG ĐỘ (µg/ml)	1	2	4	6	8	10	20
Diện tích pic	15.139	28.206	54.880	79.761	105.803	142.956	274.126

SD	963	1.909	2.996	4.303	5.631	4.514	1.724
RSD (%)	6,36	6,77	5,46	5,39	5,32	3,16	0,63

* Trong khoảng nồng độ ibuprofen từ 1 – 20 µg/ml, có sự t-ong quan chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic.

- Độ đúng của ph-ong pháp:

Bảng 3: Độ đúng của ph-ong pháp.

LƯỢNG THÊM VÀO (µg)	LƯỢNG TÌM THẤY (µg)	% TÌM LẠI	LƯỢNG THÊM VÀO (µg)	LƯỢNG TÌM THẤY (µg)	% TÌM LẠI
4,2	3,96	94,30	21	20,71	98,63
4,2	4,27	101,65	21	20,51	97,67
4,2	3,81	90,72	21	20,05	95,49
4,2	4,41	105,10	21	19,76	94,09
4,2	4,01	95,50	21	19,78	94,20
Trung bình		97,45			96,01
SD		5,81			2,05
RSD (%)		5,96			2,14

* Tỷ lệ tìm lại l-ong ibuprofen chuẩn thêm vào các mẫu huyết t-ong > 96% và độ lệch chuẩn t-ong đối nhỏ (RSD<6%), chứng tỏ ph-ong pháp có độ đúng tốt.

- Độ lặp lại của ph-ong pháp:

Bảng 4: Độ lặp lại của ph-ong pháp.

TT	NỒNG ĐỘ		
	1 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
	Diện tích pic		
1	14.127	140.180	272.161
2	14.212	136.293	268.483
3	14.649	144.372	274.080

4	14.723	144.510	273.703
5	14.999	143.417	267.131
Trung bình	14.542	141.754	271.112
SD	365	3.518	3.138
RSD (%)	2,51	2,48	1,16

* Độ lệch chuẩn t-ong đối tại 3 nồng độ <3% chứng tỏ ph-ong pháp có độ lặp lại cao.

- Giới hạn định l-ong: tại nồng độ 1 µg/ml, thấp nhất trong khoảng tuyến tính đã khảo sát, độ lệch chuẩn t-ong đối của 5 mẫu đo đ-ợc là 6,36%. Do vậy chúng tôi coi giới hạn của ph-ong pháp định l-ong là 1 µg/ml.

- Độ ổn định của ibuprofen trong huyết t-ong:

Bảng 5: Độ ổn định của ibuprofen trong huyết t-ong.

MẪU	NỒNG ĐỘ (µg/ml)			% TÌM LẠI SO VỚI MẪU BAN ĐẦU
	Ban đầu	Sau 8 ngày	Sau 45 ngày	
1	9,37		9,33	99,52
2	28,07		27,95	99,55
3	4,72	4,68		99,11
4	16,00	16,15		100,93
5	23,31	22,98		98,59

* Các mẫu huyết t-ong đ-ợc bảo quản trong ngăn đá tủ lạnh không thay đổi nồng độ ibuprofen sau 8 và 45 ngày. Kết quả này có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu đ-ợc động học của ibuprofen vì l-ong mẫu không thể xử lý và phân tích trong cùng 1 ngày.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu ph- ơng pháp định l- ợng ibuprofen trong huyết t- ơng chó bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao, chúng tôi rút ra kết luận sau:

- Điều kiện sắc ký: cột RP 18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), detector UV ở 223 nm, pha động là hỗn hợp acetonitril và đệm phosphat 0,02M (pH 6,5) (30 : 70 v/v), tốc độ dòng 1,2 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l.

- Ph- ơng pháp có độ lặp lại cao (RSD < 3%), độ đúng tốt (tỷ lệ thu hồi > 96%), khoảng tuyến tính của nồng độ ibuprofen rộng (từ 1 – 20 μ g/ml), giới hạn định l- ợng thấp (1 μ g/ml), qui trình xử lý mẫu đơn giản, hiệu suất chiết cao (khoảng 80%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đăng Hoà. Nghiên cứu hệ phân tán rắn của artemisinin và ứng dụng vào một số dạng thuốc. Luận văn tiến sĩ d- ợc học. 1999.

2. Phùng Thị Vinh. Nghiên cứu ph- ơng pháp chiết xuất và định l- ợng norfloxacin trong dịch sinh học. Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp Bộ. 2005.

3. Baoling chai *et al.* Determination of ibuprofen and its major metabolites in human urine by High-Performance liquid chromatography. J. Chromatography, 1988, 430, pp. 93-101.

4. G. Geisslinger *et al.* High-Performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, its metabolites and enantiomers in biological fluids. J. Chromatography, 1989, 491, pp. 139-149.

5. D.A. Nicoll-Griffith *et al.* Method to determine the enantiomers of ibuprofen from human urine by High-Performance liquid chromatography. J. Chromatography, 1988, 428, pp. 103-112.