

## Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng đồng thời Rifampicin và Pyrazinamid trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Lê Thị Luyến\*; Nguyễn Thị Kiều Anh\*\*; Nguyễn Thị Liên Hương\*\*

### TÓM TẮT

Ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xây dựng quy trình và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời nồng độ rifampicin (RMP) và pyrazinamid (PZA) trong huyết tương. Phương pháp chiết RMP và PZA từ huyết tương: lấy 0,5 ml huyết tương có chứa RMP, PZA vào ống nghiệm, thêm 1 ml acetonitril, nút kín, lắc kỹ bằng máy lắc xoay trong vòng 5 phút. Ly tâm dung dịch này bằng máy siêu ly tâm lạnh với tốc độ 15.000 vòng/phút ở 40C trong 15 phút. Hút lấy phần dịch trong và lọc bằng màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,2  $\mu$ m. Bơm dịch lọc vào máy HPLC để phân tích.

Phương pháp trên định lượng đồng thời RMP và PZA trong huyết tương. Cách tiến hành đơn giản, nhanh. Phương pháp này đã được thẩm định đầy đủ về tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng, tính chính xác, độ đúng...

\* Từ khóa: Sắc ký lỏng hiệu năng cao; Rifampicin; Pyrazinamid; Nồng độ thuốc trong huyết tương.

## High performance liquid chromatographic assay in determination plasma concentration of Rifampicin and Pyrazinamide

### SUMMARY

HPLC method was proposed to determine concentration of rifampicin and pyrazinamide in plasma with a mobile phase. Extraction of rifampicin and pyrazinamide in plasma samples: mix 0.5 ml sample of plasma, which containing rifampicin and pyrazinamide and 1.0 ml acetonitril on a vortex mixer for 5 minute prior to centrifugation at 12000rpm in 40C for 15 minutes. The organic layer was filtered through filter membrane 0.2  $\mu$ m and 100  $\mu$ l volume was injected into the HPLC system.

The chromatographic conditions were as follows:

Column: Inertsil OSD-3 (250 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m), and precolumn 12mm x 4.6mm; 5  $\mu$ m.

Mobile phase: acetonitril - A solution containing dinatri hydrogen phosphate adjusted to pH 7.5 by the addition of phosphoric acid. Mobile phase is a gradient solution from 5 % to 48% acetonitril.

Flow rate: 1.3 ml/min.

UV detector: 265 nm.

Experimental results showed that the sample preparation technique is very fast and simple; the method is accurate and precise.

\* Key words: HPLC; Rifampicin; Pyrazinamide; Plasma concentration.

\* Bộ Y tế

\*\* Đại học Dược Hà Nội

Phân biệt khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Sắc ký lỏng hiệu năng cao là phương pháp phổ biến được sử dụng để định lượng

nồng độ thuốc chống lao [6] trong dịch sinh học do có độ chính xác cao, khoảng thời gian phân tích hợp lý và chi phí chấp nhận đ- ợc. RMP, isoniazid (INH), PZA là các thuốc chống lao thiết yếu dùng đồng thời trong phác đồ điều trị bệnh. Nồng độ các thuốc chống lao trong máu thấp, có thể là một trong các nguyên nhân gây ra nguy cơ đáp ứng điều trị kém, kháng thuốc và tăng khả năng tái phát bệnh lao [5]. Việc nghiên cứu về nồng độ thuốc chống lao trong huyết t- ơng để đánh giá d- ợc động học và sinh khả dụng của thuốc chống lao tại Việt Nam gặp khó khăn, do chỉ có ph- ơng pháp định l- ợng RMP trong huyết t- ơng đ- ợc xây dựng trong nghiên cứu tr- ớc đây [1], mặc dù hiện nay ở Việt Nam, máy HPLC t- ơng đối phổ biến.

Ở Việt Nam, cho đến thời điểm tiến hành nghiên cứu này, ch- a có ph- ơng pháp định l- ợng nồng độ INH, PZA trong huyết t- ơng phù hợp. Trong quá trình xây dựng ph- ơng pháp định l- ợng nồng độ các thuốc trên, chúng tôi đã xây dựng đ- ợc quy trình định l- ợng đồng thời nồng độ RMP và PZA trong huyết t- ơng bệnh nhân lao và một quy trình khác định l- ợng nồng độ INH. Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu quy trình và thẩm định ph- ơng pháp định l- ợng đồng thời RMP, PZA trong huyết t- ơng bằng HPLC.

#### VẬT LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên vật liệu và thiết bị.

\* *Máy móc:*

Hệ thống máy HPLC: Spectra System Thermo Finigan.

Máy lắc cơ học.

Máy siêu âm đuối khí.

Máy siêu ly tâm lạnh.

Cân phân tích với độ chính xác 0,1 mg.

Màng lọc đ- ờng kính lỗ lọc 0,45  $\mu\text{m}$ ; 0,2  $\mu\text{m}$ .

Các dụng cụ thuỷ tinh cần thiết cho phòng thí nghiệm.

\* *Hoá chất:*

Methanol, acetonitril dùng cho HPLC.

Dinatri dihydro phosphat: loại tinh khiết phân tích (P.A).

Chất chuẩn quốc gia: RMP, INH, PZA (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung - ơng).

Huyết t- ơng trắng (Viện Huyết học Truyền máu).

Huyết t- ơng ng- ời uống thuốc điều trị lao có RMP - PZA (lấy ở thời điểm 2 giờ sau khi uống thuốc).

#### 2. Phương pháp nghiên cứu.

\* *Pha dung dịch chuẩn:*

Pha dung dịch chuẩn gốc: cân chính xác riêng các chất chuẩn 80 mg PZA, 30 mg RMP, 10 mg INH cho vào các bình định mức 10 ml. Hòa tan vừa đủ 10 ml methanol, đ- ợc dung dịch chuẩn gốc có nồng độ t- ơng ứng là RMP 3 mg/ml, PZA 3 mg/ml và INH 1 mg/ml.

Dung dịch chuẩn URS của từng chất: lấy 0,1 ml dung dịch chuẩn gốc của từng chất

cho vào bình định mức 10 ml, thêm huyết t-ơng đến vạch, lắc đều thành các dung dịch URS của từng chất có nồng độ PZA 80 µg/ml, RMP 30 µg/ml, INH 10 µg/ml.

\* *Xây dựng và thẩm định ph-ơng pháp định l-ợng đồng thời RMP, PZA trong huyết t-ơng ng-ời:*

- Xây dựng ph-ơng pháp định l-ợng:

Từ các tài liệu, tiến hành khảo sát và lựa chọn ra ph-ơng pháp phù hợp để định l-ợng PZA, RMP từ huyết t-ơng ng-ời, cụ thể:

+ Xây dựng ph-ơng pháp xử lý mẫu: lựa chọn điều kiện và ph-ơng pháp chiết RMP, PZA từ huyết t-ơng ng-ời.

+ Xây dựng ch-ơng trình sắc ký: lựa chọn các điều kiện sắc ký thích hợp về cột sắc ký, pha động, l-ưu l-ợng dòng, thể tích tiêm, b-óc sóng hấp thụ cực đại để phân tích.

\* *Thẩm định ph-ơng pháp định l-ợng:*

Dựa trên quy định của FDA [7] về thẩm định ph-ơng pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học, chúng tôi tiến hành thẩm định ph-ơng pháp xây dựng theo các tiêu chuẩn sau: tính chọn lọc của ph-ơng pháp; khoảng tuyến tính; độ chính xác (độ đúng và độ lặp lại), độ lặp lại, giới hạn định l-ợng và giới hạn phát hiện;

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Quy trình định l-ợng đồng thời RMP và PZA.

\* *Ph-ơng pháp xử lý mẫu (chiết RMP, PZA từ huyết t-ơng):*

Sau khi tham khảo các nghiên cứu đã công bố [2, 4], thực nghiệm một số ph-ơng pháp chiết và lựa chọn xử lý mẫu bằng ph-ơng pháp tủa protein huyết t-ơng nh- sau: hút chính xác 0,5 ml huyết t-ơng có chứa RMP, PZA vào ống nghiệm có nút, thêm 1 ml acetonitril vào ống nghiệm, nút kín. Lắc kỹ bằng máy lắc xoáy trong 5 phút. Ly tâm dung dịch này bằng máy siêu ly tâm lạnh với tốc độ 15.000 vòng/phút, ở 4°C trong 15 phút. Hút lấy phần dịch trong và lọc qua màng lọc có đ-ờng kính lỗ lọc 0,2 µm. Phân tích dịch lọc trên máy HPLC với điều kiện sắc ký.

\* *Ch-ơng trình sắc ký:*

Pha tĩnh: cột Inertsil OSD-3 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); với cột bảo vệ: 12 mm x 4,6 mm; 5 µm.

Pha động: acetonitril - đệm phosphat pH 7,5 với gradient dung môi nh- bảng 1.

*Bảng 1:* Thành phần pha động theo gradient dung môi định l-ợng đồng thời RMP, PZA.

THÀNH PHẦN PHA ĐỘNG	THỜI GIAN (phút)					
	0	5	6	15	16	20
MeCN (%)	5	5	58	58	5	5
Đệm phosphat pH 7,5 (%)	95	95	42	42	95	95

Tốc độ dòng: 1,3 ml/phút.

Thể tích mẫu tiêm: 100  $\mu$ l.

Detector UV, b- ớc sóng phát hiện: 265 nm.

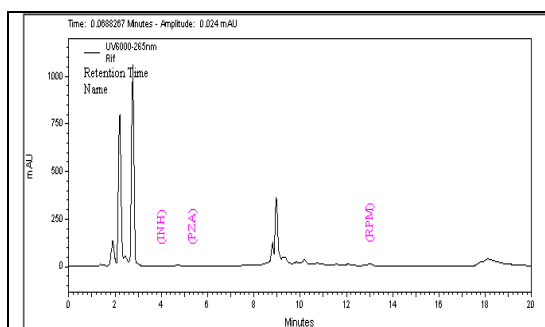
Nhiệt độ phân tích: nhiệt độ phòng.

Thời gian phân tích mẫu: 20 phút.

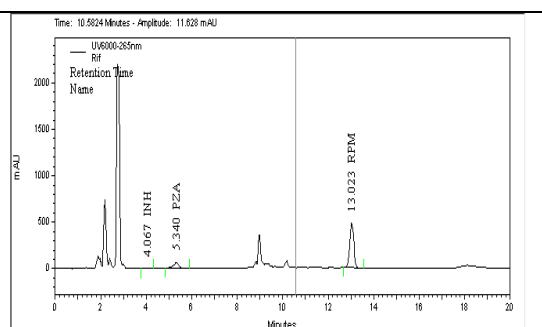
## 2. Thẩm định ph- ơng pháp định l- ợng.

\* *Tính chọn lọc của ph- ơng pháp đối với RMP và PZA trong huyết t- ơng:*

Do BN điều trị th- ờng dùng đồng thời INH, RMP, PZA trong phác đồ điều trị nên chúng tôi khảo sát tính chọn lọc của ph- ơng pháp đối với RMP, PZA trong mẫu huyết t- ơng có hiện diện của INH. Phân tích mẫu huyết t- ơng trắng, huyết t- ơng trắng thêm PZA, huyết t- ơng trắng thêm RMP, huyết t- ơng trắng thêm đồng thời INH, PZA, RMP. Xử lý mẫu và tiến hành chạy sắc ký.



Hình 1a: Sắc ký đồ mẫu huyết t- ơng trắng.



Hình 1b: Sắc ký đồ mẫu huyết t- ơng trắng thêm INH, PZA và RMP.

Trên sắc ký đồ của mẫu huyết t- ơng trắng thêm đồng thời INH, PZA, RMP, pic của PZA, RMP có thời gian l- u lần l- ợt là 4,0 phút; 5,3 phút; 13,0 phút. Các pic gọn, cân đối, tách tốt. Trên sắc ký đồ của mẫu huyết t- ơng trắng không xuất hiện các pic tại vị trí ứng với pic của INH, PZA, RMP. Tuy nhiên, do nồng độ INH huyết t- ơng thấp và ch- ơng trình sắc ký này ch- a phù hợp với INH, độ nhạy với INH rất thấp. Vì vậy, chúng tôi chỉ áp dụng ph- ơng pháp này đối với RMP và PZA.

\* *Khoảng nồng độ tuyến tính:*

Từ dung dịch chuẩn URS của từng chất, pha loãng thành dãy nồng độ chứa đồng thời RMP, PZA, nồng độ của PZA từ 5 đến 80  $\mu$ g/ml và RMP từ 1,875 đến 30  $\mu$ g/ml. Phân tích nồng độ của các mẫu trên. Thiết lập mối t- ơng quan giữa đáp ứng phân tích (diện tích pic) và nồng độ hoạt chất trong khoảng nồng độ khảo sát, thể hiện bằng đ- ường hồi quy tuyến tính và hệ số t- ơng quan r.

Bảng 2: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của nồng độ PZA trong huyết t- ơng.

NỒNG ĐỘ PZA (µg/ml)	DIỆN TÍCH (mAU.s)
5	275770
10	485281
20	989037
40	1850408
80	3806055

Ph- ơng trình hồi quy  
 $y = 47019x + 23727$   
 hệ số t- ơng quan  $r = 0,9995$   
 x- nồng độ PZA, y - diện tích pic

**PZA**

Diện tích pic (mAU x giây)

Nồng độ (mcg/mL)

Hình 2: Mối t- ơng quan giữa diện tích pic và nồng độ PZA trong huyết t- ơng.

Bảng 3: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của nồng độ RMP trong huyết t- ơng.

NỒNG ĐỘ RMP (µg/ml)	DIỆN TÍCH (mAU.s)
1,875	566704
3,75	1002156
7,5	2179121
15	4366137
30	8819589

Ph- ơng trình hồi quy  
 $y = 295129x - 44135$   
 hệ số t- ơng quan  $r = 0,9998$   
 x- nồng độ RMP, y - diện tích pic

**RMP**

Diện tích pic (mAU x giây)

Nồng độ (mcg/mL)

Hình 3: Mối t- ơng quan giữa diện tích pic và nồng độ RMP trong huyết t- ơng.

\* Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):

Chuẩn bị các mẫu chứa PZA, RMP trong huyết t- ơng trắng với nồng độ khác nhau:

Mẫu 1: có 0,25 µg/ml PZA và 0,25 µg/ml RMP.

Mẫu 2: có 0,5 µg/ml PZA và 0,5 µg/ml RMP.

Mẫu 3: có 1 µg/ml PZA và 1 µg/ml RMP.

Phân tích các mẫu trên. Tính trung bình của tỷ số chiều cao ứng các pic PZA, INH và RMP so với chiều cao nhiễu để nền của 3 lần làm song song tại mỗi nồng độ khảo sát. Tại nồng độ có: tỷ số S/N bằng 10 chính là LOQ của phương pháp và tỷ số S/N bằng 3,3 chính là LOD của phương pháp.

Kết quả thu được như sau:

- Với PZA, LOQ = 0,5 µg/ml; LOD = 0,15 µg/ml.

- Với RMP, LOQ = 0,25 µg/ml; LOD = 0,076 µg/ml.

\* Độ lặp lại:

Chuẩn bị các mẫu chứa PZA, RMP trong huyết trắng với 3 mức nồng độ khác nhau:

Mẫu 1: có 10 µg/ml PZA và 3,75 µg/ml RMP.

Mẫu 2: có 40 µg/ml PZA và 15 µg/ml RMP.

Mẫu 3: có 60 µg/ml PZA và 25 µg/ml RMP.

Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký. Xác định độ chính xác bằng cách định lượng tại ba nồng độ, mỗi nồng độ làm 6 lần song song. Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) giữa những lần định lượng, giá trị RSD phải ≤ 15%.

Bảng 4: Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp phân tích.

NỒNG ĐỘ THỰC (µg/ml)	PZA			RMP		
	10	40	60	3,75	15	25
Nồng độ xác định được (µg/ml)	10,16	38,77	60,41	3,91	15,30	22,85
	9,89	38,20	59,70	3,82	14,94	26,20
	10,09	43,09	59,10	3,34	15,34	23,85
	10,10	38,30	58,82	3,51	14,29	26,39
	8,84	35,88	63,76	3,34	15,44	25,23
	9,81	38,85	60,36	3,58	15,06	24,91
X	9,816	38,848	60,36	3,583	15,06	24,90
RSD%	5,03	6,04	2,96	6,66	2,78	5,48

Kết quả cho thấy: độ lệch chuẩn tương đối RSD% của cả 2 chất ở những nồng độ khảo sát nằm trong khoảng từ 2,78 - 6,66 (< 15%), điều đó chứng tỏ phép thử đạt yêu cầu về độ lặp lại của phương pháp theo quy định về phân tích thuốc trong dịch sinh học.

\* Độ đúng:

Độ đúng được xác định dựa trên so sánh nồng độ PZA và RMP định lượng được với nồng độ thực.

Bảng 5: Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp phân tích.

NỒNG ĐỘ THỰC ( $\mu\text{g/ml}$ )	PZA			RMP		
	10	40	60	3,75	15	25
Nồng độ xác định đ- ợc so với nồng độ thực (%)	101,56	96,94	100,69	104,29	101,98	91,39
	98,93	95,51	99,50	101,74	99,57	104,78
	100,92	107,72	98,50	89,07	102,25	95,41
	100,96	95,74	98,04	93,50	95,29	105,57
	88,44	89,70	106,27	89,09	102,92	100,94
	98,14	97,11	100,60	95,54	100,40	99,62
X	98,16	97,12	100,60	95,54	100,40	99,62

Tỷ lệ tìm lại là 95,54 - 100,6%, nằm trong khoảng cho phép 85,0 - 115,0%. Điều đó chứng tỏ ph- ơng pháp có độ đúng phù hợp với yêu cầu đối với phép phân tích thuốc trong dịch sinh học

## BÀN LUẬN

\* *Ph- ơng pháp xử lý mẫu*: sử dụng trong nghiên cứu này là ph- ơng pháp tủa protein với acetonitril. Ph- ơng pháp xử lý mẫu này nhanh, đơn giản, đảm bảo đ- ợc sự ổn định của hoạt chất. Tuy nhiên, dùng acetonitril để chiết và không bay hơi dung môi tr- ớc khi phân tích, nên mẫu thử bị pha loãng, hạn chế tới LOQ của ph- ơng pháp. Cùng với RMP và PZA, ph- ơng pháp này chiết đ- ợc cả INH. Tuy nhiên, do nồng độ INH t- ơng đối thấp, nên chúng tôi đã xây dựng ph- ơng pháp xử lý mẫu và phân tích INH thành quy trình riêng, sẽ đ- ợc công bố trong một nghiên cứu khác.

\* *Về ph- ơng pháp phân tích*: điều kiện sắc ký không quá phức tạp, pha động dùng đệm phosphat và acetonitril là những dung môi không quá đắt, dễ kiếm, dễ dàng triển khai tại phòng thí nghiệm của Việt Nam, PZA, RMP đều tách hoàn toàn ra khỏi nhau và ra khỏi các thành phần tạp có trong mẫu huyết t- ơng với thời gian phân tích d- ới 20 phút.

\* *Tính chọn lọc*: tại vị trí ứng với thời gian l- u của pic INH, PZA, RMP, trên sắc ký đồ của huyết t- ơng trắng không xuất hiện pic lạ, 3 pic có thời gian l- u hợp lý, các pic tách rời nhau, pic gọn, cân đối.

\* *Khoảng nồng độ tuyến tính*: các đ- ờng hồi quy ứng với từng hoạt chất có dạng đ- ờng thẳng với hệ số t- ơng quan r đều > 0,99, đáp ứng yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học. Ph- ơng pháp phân tích sử dụng trong đề tài có khoảng tuyến tính hẹp hơn so với ph- ơng pháp chúng tôi xây dựng năm 2005 (1 - 30 µg/ml) [1]. Tuy nhiên, qua phân tích mẫu thực là dịch sinh học của BN cho thấy khoảng tuyến tính của RMP, PZA hoàn toàn phù hợp với yêu cầu thực tế.

\* *Độ lặp lại*: kết quả khảo sát cho giá trị RSD% đều 2,78 - 6,66 % (< 15%), đáp ứng yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học.

\* *Độ đúng*: độ đúng của ph- ơng pháp phân tích RMP, PZA đều 95,54 - 100,6% (nằm trong khoảng 85 - 115%). Nh- vậy, ph- ơng pháp phân tích đáp ứng yêu cầu độ đúng về phân tích thuốc trong dịch sinh học.

\* *Giới hạn định l- ợng*: so với các ph- ơng pháp phân tích hiện đại nh- LC - MS có giới hạn định l- ợng RMP (0,2 ng/ml), PZA (13 ng/ml) [3] ph- ơng pháp chúng tôi sử dụng có giới hạn định l- ợng cao hơn: RMP 0,25 µg/ml, PZA 0,5 µg/ml. So với ph- ơng pháp định l- ợng bằng HPLC chúng tôi xây dựng năm 2005, ph- ơng pháp cho kết quả t- ơng tự giới hạn định l- ợng RMP (0,2 µg/ml) [1].

Áp dụng ph- ơng pháp định l- ợng này trong nghiên cứu về nồng độ thuốc trong huyết t- ơng BN lao.

## KẾT LUẬN



Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Ph- ơng pháp chiết RMP, PZA trong huyết t- ơng bằng tủa protein với dung môi tủa là acetonitril là ph- ơng pháp đơn giản, dễ thực hiện, phù hợp với ph- ơng pháp định l- ợng nồng độ thuốc trong dịch sinh học.

Ph- ơng pháp định l- ợng đồng thời RMP, PZA trong cùng một hệ pha động đã xây dựng đ- ợc với thời gian phân tích mẫu hợp lý. Hệ dung môi pha động không quá đắt, dễ tìm trên thị tr- ờng Việt Nam.

Ph- ơng pháp định l- ợng RMP, PZA xây dựng đã thẩm định đầy đủ về tiêu chuẩn của FDA quy định về ph- ơng pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thị Luyến Hoàng Thị Kim Huyền, Thái Phan Quỳnh Như, Nguyễn Thị Liên Hương, Nguyễn Anh Đào. Ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao định lượng RMP trong huyết tương người uống đồng thời rifampicin-isoniazid-pyrazinamid. Tạp chí Dược học. 2005. 347 (45), pp.32-34.

2. Jamaluddin A. B., Sarwar G., Rahim M. A., Rahman M. K High-performance liquid chromatographic assay of rifampicin in human serum, J Chromatogr. 1990, 525 (2), pp. 495-497.

3. Khuawar M. Y., Rind F. M. Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002, 766 (2), pp.357-363.

4. McIleron H., Wash P., Burger A., Norman J., Folb P. I., Smith P. Determinants of rifampin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol pharmacokinetics in a cohort of tuberculosis patients. Antimicrob Agents Chemother. 2006. 50 (4), pp.1170-1177.

5. Peloquin C.A. Therapeutic drug monitoring in treatment of tuberculosis. Drugs. 2002, 62 (15), p.15.

6. Smith P. J., van Dyk J., Fredericks A. Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. Int J Tuberc Lung Dis. 1999, 3 (11 Suppl 3), pp.S325 - 8; discussion S351 - 2.

7. U.S. Department of health and human services food and drug administration, center for drug evaluation and research; Center for veterinary medicine. Guidance for industry Bioanalytical method validation. 2001.