

Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng Isoniazid trong huyết tương bằng phương pháp sắc ký lỏng kết hợp dẫn xuất hóa trước cột với Cinnamaldehyd

Nguyễn Thị Liên Hương**; Lê Thị Luyên*; Nguyễn Thị Kiều Anh**

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 isoniazid (INH) trong huyết tương người. Phương pháp xử lý mẫu: tủa protein huyết tương bằng acetonitril, sau đó lọc. Lấy 200 μ l dịch lọc, thêm 20 μ l H₂O, 2,0 μ l dung dịch axit trichloacetic 10%, 40 μ l dung dịch cinnamaldehyd 1% trong methanol, lắc xoay 1 phút, để yên 9 phút và tiêm mẫu vào máy HPLC để phân tích.

Điều kiện sắc ký:

- Pha tĩnh: zorbax SB-CN (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m); với bảo vệ cột: 8 mm x 4,6 mm; 5 μ m.
- Pha động: methanol - dung dịch natri acetat 5 mM - dung dịch axit acetic băng (42:57:1).
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.
- Thể tích mẫu tiêm: 20 μ l.
- Detector UV, bước sóng phát hiện: 330 nm.

Phương pháp được thẩm định đầy đủ về tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng, độ chính xác, độ đúng theo hướng dẫn của FDA; tiến hành đơn giản, nhanh, với độ tin cậy đảm bảo, có thể ứng dụng để định lượng INH trong huyết tương bệnh nhân (BN) lao.

* Từ khóa: HPLC; Dẫn xuất hóa; Isoniazid; Nồng độ thuốc trong huyết tương.

Study on determination of Isoniazid concentration in human plasma by liquid chromatography using pre-column derivatization with cinnamaldehyde

SUMMARY

An HPLC method was developed to determine concentration of isoniazid in human plasma. Sample treatment: 1,000 ml of acetonitrile was added to 500 μ l plasma sample containing isoniazid. Mixture was vortexed for 5 minutes prior centrifugation at 12,000 rpm in 40C for 15 minutes. The supernatant layer was filtered. A 200 μ l of filtrate was added to 20 μ l water, 2,0 μ l of a 10% (m/v) aqueous trichloacetic acid, and 40 μ l of a 1% cinnamaldehyde solution in methanol, mixed for 1 min, left at room temperature for 9 minutes, then 20 μ l volume was injected into the HPLC system.

* Bộ Y tế

** Đại học D- ợc Hà Nội

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

The chromatographic conditions were as follows:

- Column: zorbax SB-CN (150 x 4.6 mm; 5 μ m), and precolumn 8 mm x 4.6 mm; 5 μ m.
- Mobile phase: methanol - 5 mM sodium acetate solution - glacial acetic acid solution (42:57:1).
- Flow rate: 1.5 ml/min.
- UV detector: 330 nm.

The method was validated on the following criteria: selectivity, linearity, accuracy, limit of quantitation, limit of detection. Experimental results show that the analytical procedure is rapid, simple, accurate and precise.

** Key words: HPLC; Derivatization; Isoniazid; Plasma concentration.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, tại Việt Nam đã áp dụng xác định nồng độ thuốc chống lao trong huyết t-ơng để đánh giá d-ợc động học và sinh khả dụng rifampicin (RMP), isoniazid (INH), pyrazinamid (PZA) là những thuốc chống lao thiết yếu dùng đồng thời trong phác đồ điều trị bệnh lao. Do nồng độ INH trong huyết t-ơng BN rất thấp, cần phải xây dựng quy trình định l-ợng bằng HPLC kết hợp dẫn xuất hóa để tăng khả năng phát hiện INH trong huyết t-ơng.

Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu quy trình và thẩm định ph-ơng pháp định l-ợng INH trong huyết t-ơng bằng HPLC.

VẬT LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thiết bị và hoá chất thí nghiệm.

** Thiết bị:*

- Hệ thống máy HPLC (Spectra System Thermo Finigan - Mỹ).

- Máy lắc xoay Labinco (Hà Lan).

- Máy siêu ly tâm lạnh (Sartorius - Đức).

- Cân phân tích Mettler (Thụy Sĩ) với độ chính xác 0,1 mg.

- Màng lọc có đ-ờng kính lỗ lọc 0,45 µm; 0,2 µm.

- Dụng cụ thuỷ tinh cần thiết cho phòng thí nghiệm

** Hoá chất:*

- Methanol, acetonitril dùng cho HPLC (Merck - Đức).

- Axit tricloacetic, natri acetat loại tinh khiết phân tích (Merck - Đức).

- Cinnamaldehyd loại tinh khiết phân tích (Sigma - Mỹ).

- Chất chuẩn quốc gia: rifampicin (RMP), isoniazid (INH), pyrazinamid (PZA) (Viện Kiểm nghiệm thuốc TW).

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

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

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Cách pha dung dịch chuẩn:*

Pha dung dịch chuẩn gốc: cân chính xác riêng các chất chuẩn 80 mg PZA, 30 mg RMP và 10 mg INH cho vào các bình định mức 10 ml. Hòa tan trong 10 ml methanol đ-ợc dung dịch chuẩn gốc có nồng độ t-ơng ứng là RMP 3 mg/ml, PZA 8 mg/ml và INH 1 mg/ml.

Dung dịch URS: lấy 0,1 ml dung dịch chuẩn gốc cho vào bình định mức 10 ml, thêm huyết t-ơng trắng đến vạch, lắc đều thành dung dịch URS có nồng độ INH 10 µg/ml.

** Xây dựng và thẩm định ph-ơng pháp định l-ợng INH trong huyết t-ơng ng-ời:*

- Xây dựng ph-ơng pháp định l-ợng:

+ Ph-ơng pháp xử lý mẫu: tủa protein bằng acetonitril nh- trong nghiên cứu về định l-ợng nồng độ đồng thời PZA và RMP từ huyết t-ơng ng-ời. Sau đó, dẫn xuất hóa

bằng cinnamaldehyd để tăng độ nhạy khi định lượng INH.

+ Xây dựng chương trình sắc ký: lựa chọn điều kiện sắc ký thích hợp về cột sắc ký, pha động, lưu lượng dòng, thể tích tiêm, bước sóng hấp thụ cực đại để phân tích.

- Thẩm định phương pháp định lượng: dựa vào quy định của FDA [4] về thẩm định phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học, tiến hành thẩm định phương pháp xây dựng theo các chỉ tiêu: tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Quy trình định lượng INH trong huyết tương.

* Xử lý mẫu:

- Xử lý mẫu bằng phương pháp tủa protein huyết tương: hút chính xác 0,5 ml huyết tương có chứa INH vào ống nghiệm có nút xoáy, thêm 1 ml acetonitril, lắc xoáy 5 phút. Ly tâm với tốc độ 15.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Hút phần dịch trong và lọc qua màng lọc có đường kính lỗ lọc 0,2 µm để dịch lọc.

- Dẫn xuất hóa dịch lọc: lấy 200 µl dịch lọc, thêm 20 µl H₂O, lắc nhẹ trong 15 giây. Thêm 2,0 µl dung dịch axit tricloacetic 10%, lắc xoáy trong 1 phút. Thêm 40 µl dung dịch

cinnamaldehyd 1% trong methanol, lắc xoáy trong 1 phút. Để yên trong 9 phút và tiêm mẫu vào cột HPLC.

* Chương trình sắc ký:

- Pha tĩnh: cột sắc ký Zorbax SB-CN (4,6 x 150 mm; 5 µm), bảo vệ cột: 8 x 4,6 mm; 5 µm.

- Pha động: methanol - dung dịch natri acetat 5 mM - dung dịch axit acetic băng (42:57:1).

- Lưu lượng dòng: 1,5 ml/phút.

- Thể tích tiêm mẫu: 20 µl.

- Bước sóng phát hiện: 330 nm.

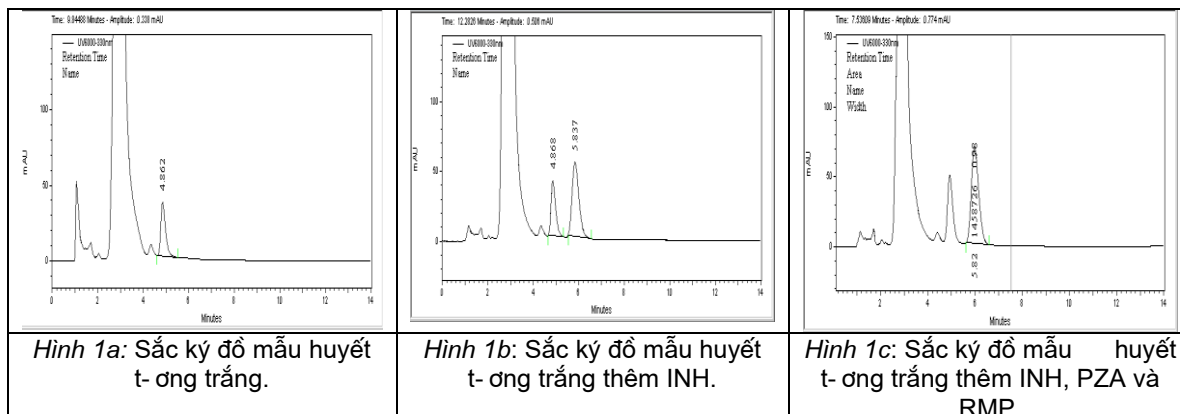
- Nhiệt độ phân tích: nhiệt độ phòng.

- Thời gian phân tích: 14 phút.

2. Thẩm định phương pháp định lượng.

* Tính chọn lọc của phương pháp đối với INH:

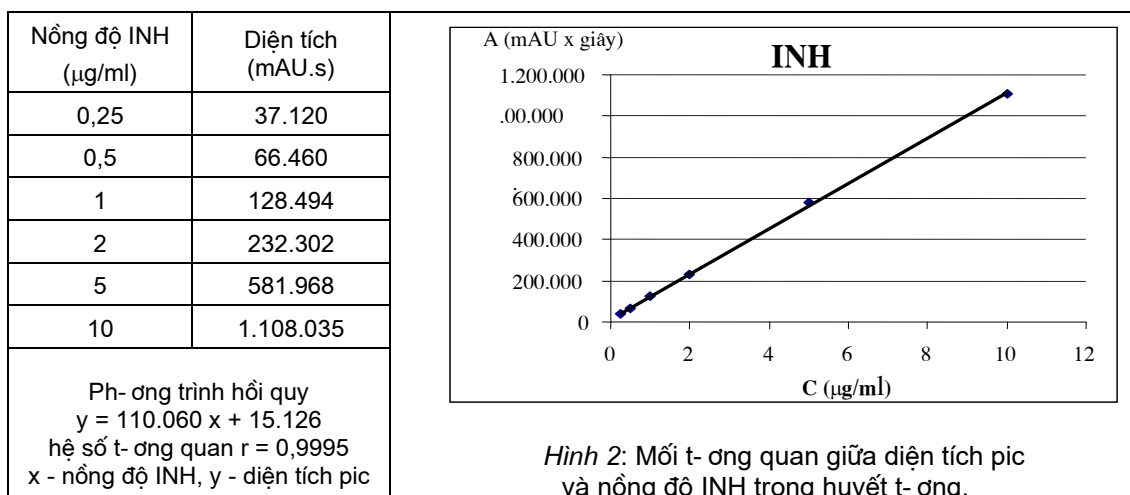
Do BN lao điều trị phác đồ có đồng thời INH, RMP, PZA, nên chúng tôi khảo sát tính chọn lọc của phương pháp đối với INH trong mẫu huyết tương có mặt cả RMP, PZA. Phân tích mẫu huyết tương trắng, huyết tương thêm INH, huyết tương thêm đồng thời INH, PZA, RMP, huyết tương BN điều trị lao có INH. Xử lý mẫu và tiến hành chạy sắc ký.



Trên sắc ký đồ của mẫu huyết t-ơng thêm INH và mẫu thêm đồng thời INH, PZA, RMP, pic của INH ở 5,8 phút, 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.

Từ dung dịch chuẩn URS của INH, pha loãng bằng huyết t-ơng trắng thành dãy mẫu có nồng độ INH từ 0,25 - 10 µg/ml. Xử lý mẫu và phân tích. Thiết lập mối t-ơng quan giữa diện tích pic với nồng độ INH trong khoảng nồng độ khảo sát, thể hiện bằng đ-ờng hồi quy tuyến tính và hệ số t-ơng quan r.

* Khoảng nồng độ tuyến tính:



* Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định l-ợng (LOQ):

Từ mẫu huyết t-ơng trắng, thêm chuẩn INH để đ-ợc nồng độ 0,25 - 0,125 - 0,0625 µg/ml. Phân tích các mẫu. Mỗi mẫu tiến hành 3 lần song song. Tính trung bình của tỷ số chiều cao pic INH (S) so với chiều cao

nhiều đ-ờng nền (N) của 3 lần tại mỗi nồng độ khảo sát. Tại nồng độ có tỷ số S/N bằng 10 là LOQ, tỷ số S/N bằng 3,3 là LOD.

Kết quả: giới hạn định l-ợng INH (LOQ) = 0,0625 µg/ml; giới hạn phát hiện (LOD) = 0,019 µg/ml.

*** Độ chính xác:**

Chuẩn bị các mẫu chứa INH trong huyết t- ơng trắng với 3 mức nồng độ khác nhau: 0,75, 5,0 và 7,5 µg/ml. Xử lý mẫu và tiến hành sắc ký. Xác định độ chính xác bằng cách định l- ợng tại 3 nồng độ, mỗi nồng độ làm 6 lần song song. Tính độ lệch chuẩn t- ơng đối (RSD) giữa những lần định l- ợng, giá trị RSD phải ≤ 15%.

Bảng 1: Kết quả khảo sát độ chính xác của ph- ơng pháp phân tích.

NỒNG ĐỘ INH THỰC (µg/ml)	0,75	5,0	7,5
Nồng độ INH xác định đ- ợc (µg/ml)	0,644	5,06	7,82
	0,703	5,11	7,17
	0,671	4,96	7,08
	0,715	5,05	7,26
	0,715	5,57	7,09
	0,688	5,15	7,36
X	0,689	5,150	7,300
RSD%	4,03	4,21	3,78

RSD% của INH ở nồng độ khảo sát nằm trong khoảng từ 3,78 - 4,21% (< 15%), đạt yêu cầu về độ chính xác theo quy định về phân tích thuốc trong dịch sinh học.

*** Độ đúng:**

Xác định độ đúng dựa trên so sánh nồng độ INH định l- ợng đ- ợc với nồng độ thực (tỷ lệ tìm lại) ở 3 mức nồng độ nh- phân đánh giá độ chính xác.

Bảng 2: Kết quả khảo sát độ đúng.

	NỒNG ĐỘ INH THỰC (µg/ml)		
	0,75	5	7,5

Nồng độ xác định đ- ợc so với nồng độ thực (%)	85,86	101,13	104,26
	93,71	102,17	95,66
	89,47	99,28	94,45
	95,29	100,94	96,85
	95,29	111,47	94,57
	91,77	103,01	98,18
X	91,90	103,0	97,33

Tỷ lệ tìm lại là 91,90 - 103% (nằm trong khoảng cho phép 85,0 - 115,0%), 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:* ph- ơng pháp tủa protein với acetonitril. Trong nghiên cứu về định l- ợng đồng thời RMP và PZA, chúng tôi đã đề cập đến ph- ơng pháp xử lý mẫu huyết t- ơng có cả INH và PZA, RMP. Ph- ơng pháp này nhanh, đơn giản, đảm bảo 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, do đó độ nhạy của ph- ơng pháp bị giảm đáng kể.

Trong thực tế, nồng độ INH trong dịch sinh học của BN rất thấp, có thể cỡ vài chục ng/ml. Do đó, phải nâng cao độ nhạy của ph- ơng pháp phân tích. Quy trình dẫn chất hoá tr- ớc cột định l- ợng riêng INH đáp ứng đ- ợc yêu cầu thực tế khi theo dõi nồng độ INH trong huyết t- ơng của BN lao. Kết quả cho thấy: đáp ứng phân tích tăng lên nhiều lần, cùng 1 nồng độ INH là 10 µg/ml huyết t- ơng, nếu định l- ợng theo ph- ơng pháp trực tiếp (định l- ợng đồng thời 3 chất),

không tạo dẫn xuất tr- ớc cột [1], cho đáp ứng phân tích 38.247 mAU.s. Còn theo ph- ơng pháp của chúng tôi, diện tích pic INH thu đ- ợc là 1.108.035 mAU.s, gấp khoảng 30 lần. Hơn nữa, thể tích tiêm mẫu giảm 5 lần (100 μ l [1] so với 20 μ l) trong quy trình này, do đó pic sắc ký cân đối và hiệu quả tách tốt hơn. Mặt khác, khoảng nồng độ tuyến tính đ- ợc mở rộng và cho hệ số t- ơng quan cao hơn (khoảng nồng độ tuyến tính là 2 - 10 μ g/ml, với $r = 0,990$ [1] so với ph- ơng pháp này có khoảng nồng độ tuyến tính là 0,25 - 10 μ g/ml, với $r = 0,9995$), đáp ứng tốt yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học.

* *Về ph- ơng pháp phân tích:* điều kiện sắc ký không quá phức tạp, pha động dùng đệm acetat và methanol là những dung môi không quá đắt, dễ kiếm, dễ dàng triển khai tại các phòng thí nghiệm của Việt Nam. INH tách khỏi các thành phần tạp có trong mẫu huyết t- ơng với thời gian phân tích 14 phút.

* *Tính chọn lọc:* tại vị trí ứng với vị trí thời gian l- u của pic INH trên sắc ký đồ của huyết t- ơng trắng, không xuất hiện pic lạ. Thời gian l- u hợp lý, pic gọn, cân đối. Phép định l- ợng INH trong huyết t- ơng sau khi tạo dẫn chất của INH với cinamaldehyde đ- ợc đo ở b- ớc sóng 330 nm, nên tính chọn lọc đ- ợc nâng cao.

* *Tính chính xác:* cho giá trị RSD% từ 3,78 - 4,21% (< 15%), đáp ứng yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học.

* *Độ đúng:* độ đúng của ph- ơng pháp phân tích INH từ 91,90 - 103% (nằm trong khoảng 85 - 115%), đáp ứng yêu cầu độ đúng về phân tích thuốc trong dịch sinh học.

* *Độ nhạy:* so với ph- ơng pháp phân tích có thiết bị hiện đại nh- LC-MS, giới hạn phát hiện INH của ph- ơng pháp này ch- a bằng (khoảng 20 ng/ml so với 1 ng/ml [3]), nh- ng hoàn toàn đáp ứng yêu cầu theo dõi nồng độ INH trong huyết t- ơng BN. Mặt khác, thiết bị LC-MS rất đắt tiền, không phổ biến, đặc biệt giá phân tích đắt gấp hàng chục lần so với ph- ơng pháp này. Do vậy, khả năng ứng dụng thực tế không cao.

KẾT LUẬN

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

- Ph- ơng pháp chiết INH từ huyết t- ơng bằng rửa protein với dung môi rửa là acetonitril là ph- ơng pháp đơn giản, dễ thực hiện, phù hợp với ph- ơng pháp định l- ợng nồng độ thuốc để xác định sinh khả dụng và các thông số dược động học. Ph- ơng pháp dẫn xuất hoá để làm tăng độ phát hiện INH trong mẫu.

- Ch- ơng trình sắc ký có 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 INH trong huyết t- ơng mà chúng tôi xây dựng đã đ- ợc thẩm định khá đầy đủ các chỉ tiêu theo quy định của FDA về ph- ơng pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học. Do đó, có thể ứng dụng để xác định nồng độ INH trong huyết t- ơng BN lao, phục vụ công tác điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Thị Hồng Nhung, Nguyễn Thị Kiều Anh, Lê Thị Luyến. Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời RMP, INH, PZA trong huyết

tương bằng phương pháp HPLC. Trường Đại học Dược - Hội nghị Khoa học công nghệ tuổi trẻ lần thứ XIV. 2007.

2. Lê Thị Luyến, Hoàng Thị Kim Huyền, Thái Phan Quỳnh Như, Nguyễn Thị Liên Hương, Nguyễn Anh Đào. Ứng dụng phương pháp HPLC định lượng RMP trong huyết tương người uống đồng thời RMP, INZ, PZA. Tạp chí Dược học. 2005, 347 (45), pp.32-34.

3. Ng K.Y, Zhou H, Zhang Y.L, Hybertson B, Randolph T, Christians U. Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line extraction. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007, 847 (2), pp.188-198.

4. 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.

