Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng linezolid trong huyết tương người bằng HPLC

Ngô Quang Trung, Bùi Thị Lan Phương, Tống Thị Thanh Vượng, Lê Đình Chi*

Trường Đại học Dược Hà Nội

** Tác giả liên hệ: child@hup.edu.vn*

(Ngày gửi đăng: 10/5/2022 – Ngày duyệt đăng: 20/6/2022)

SUMMARY

An HPLC method was developed for the quantification of linezolid in human plasma with benzoic acid as internal standard. To 500 µL of plasma sample, 800 µL of acetonitrile and 50 µL of solvent IS were added, then vortexed for 10 seconds, centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes. The obtained supernatant was filtered through 0.45 µm PTTFE. The chromatoghraphic procedure was established as: Column C18 HPLC (4,6 mm x 250 mm; 5 µm); Mobile phase – Acetonitrile-phosphoric acid 0.05 % (40:60) 1.0 ml/min; Runtime – within 10 minutes. The proposed method was validated by FDA guidelines for selectivity, linearity, accuracy, precision, recovery and stability. The method proved simple, time-saving and well applicable to routine quantification of linezolid in human plasma.

Từ khóa: *huyết tương người, HPLC linezolid*

Đặt vấn đề

Linezolid (LINZ) là một kháng sinh mới nhóm oxazolidinone có những tiềm năng trong điều trị lâm sàng hiện nay. LINZ là một kháng sinh phụ thuộc vào thời gian: hiệu quả lâm sàng của thuốc được dự đoán tốt nhất bởi phần trăm thời gian mà nồng độ thuốc trong máu vẫn ở trên nồng độ MIC. Đây là một thuốc được phát triển trong điều trị hiệu chỉnh liều theo nguyên tắc PK/PD [1], [2]. Để có được thời gian chính xác mà nồng độ LINZ trong máu trên MIC thì cần định lượng LINZ trong máu bệnh nhân sau khi sử dụng ở các thời điểm theo phác đồ điều trị. Do đó, định lượng LINZ trong dịch sinh học điều cần thiết. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu định lượng LINZ trong huyết tương [3], [4], [5], [6] đã được công bố, nhưng ở Việt nam chưa có công bố nào được đăng tải.

Bài báo này trình bày kết quả xây dựng phương pháp định lượng LINZ trong huyết tương bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phương pháp này có khả năng ứng dụng đánh giá nồng độ thuốc trong nghiên cứu điều trị lâm sàng hoặc trong đánh giá tương đương sinh học.

Hóa chất, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, vật tư thí nghiệm

Chất chuẩn: Linezolid hàm lượng 2mg/ml (Ahlcon Parenterals (I) Limited, số lô A20G042N), Methylparaben (chuẩn nội – IS) hàm lượng 99,64 % theo nguyên trạng (Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS 0316108.03), acid benzoic (99,5 % nguyên trạng, Scharlau, AC05631000) , aspirin (100,17 % nguyên trạng, Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố HCM, QT078 071112) acid salicylic

(99,61 % nguyên trạng, Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố HCM, QT158 050712)

Dung môi hóa chất: acetonitril (HPLC, Fisher, Mỹ); methanol (HPLC, Fisher, Mỹ); acid phosphoric (PA, Merck, Đức).

Huyết tương trắng: từ người khỏe mạnh chưa uống thuốc (Viện huyết học và truyền máu trung ương).

Thiết bị, dụng cụ

Hệ thống HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity (Mỹ); cột VertiSepTM GES C18 HPLC (4,6 mm × 250 mm; 5µm) (Thái Lan)

Các thiết bị và dụng cụ khác: cân phân tích AND GF-224A (d=0,1 mg), Nhật. Máy li tâm lạnh Hettich Mikro 220R, Đức. Tủ lạnh âm sâu (-30) Sanyo MDF-U333, Nhật. Máy lắc xoáy Vortex Benmark, Mỹ. Tất cả các thiết bị dụng cụ đều được chuẩn hóa theo quy định Thực hành phòng thí nghiệm tốt (GLP).

Phương pháp nghiên cứu

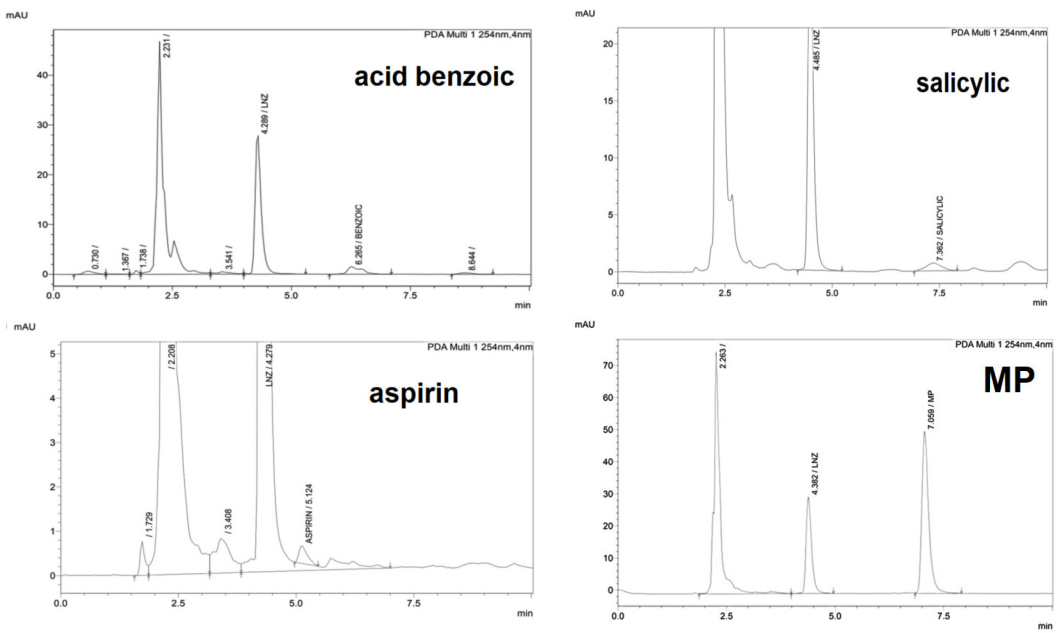
Sử dụng phương pháp kết tủa protein trong xử lý mẫu để chiết tách LINZ trong huyết tương. Khảo sát lựa chọn giữa 2 chất methanol và acetonitril.

Sử dụng phương pháp HPLC với đầu dò mảng diod (DAD) ở bước sóng 254 nm định lượng LINZ trong huyết tương. Chọn IS phù hợp giữa các chất: acid benzoic, aspirin, acid salicylic, methylparaben (MP). Điều kiện phân tích được lựa chọn sau khi thực hiện tối ưu hóa pha động với các tỷ lệ khác nhau giữa acetonitril (MeCN) và H_3PO_4 0,5 %: tỷ lệ MeCN ở các mức 25, 30, 40, 50 % thành phần pha động (v/v).

Các dung dịch chuẩn: từ dung dịch LINZ 2 mg/ml; pha loãng với nước thành các dung dịch chuẩn có nồng độ 10 - 500 µg/ml, sau đó pha loãng bằng huyết tương trắng thành dãy chuẩn trong huyết tương nồng độ 1-50 µg/ml.

Dung dịch IS: cân chính xác khoảng 25 mg IS, hòa tan trong methanol (MeOH) được dung dịch nồng độ khoảng 1000 µg/ml. Pha loãng bằng nước cất được dung dịch nồng độ 100 µg/ml.

Tiến hành thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của US – FDA [7]: độ chọn lọc – đặc hiệu, giới hạn định lượng dưới (LLOQ), khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng – độ chính xác, tỷ lệ thu hồi, độ nhiễm chéo, độ ổn định.



Hình 1. Sắc ký đồ khảo sát lựa chọn chuẩn nội

Kết quả nghiên cứu

Khảo sát, xác định điều kiện sắc ký và lựa chọn chuẩn nội

Lựa chọn chuẩn nội

Trong nghiên cứu này, chọn chuẩn nội không xuất hiện đồng thời với LINZ trên lâm sàng, có cấu trúc phân tử chứa nhân thơm như LINZ và tính chất hóa lý tương đồng. Tiến hành khảo sát một số chất làm chuẩn nội gồm: acid benzoic, aspirin, acid salicylic, methylparaben(MP). Kết quả được thể hiện trong Hình 1:

Kết quả khảo sát cho thấy với acid benzoic, pic bị chẻ, choãi, không phù hợp với phương pháp. Aspirin và acid salicylic, ở cùng nồng độ LINZ và nội chuẩn thì đáp ứng pic của IS nhỏ hơn rất nhiều so với LINZ, nếu tăng nồng độ IS quá nhiều sẽ ảnh hưởng khả năng chiết của LINZ. Bên cạnh đó, thời gian lưu của LINZ và aspirin khá là gần nhau.Với MP cho thấy pic MP tách tốt so với pic LINZ (Rs = 10,1) và với các tạp trên nền huyết tương; ở cùng nồng độ với chất chuẩn cho đáp ứng khá tương đương, hình dạng pic đẹp, cân đối. MP không phải là thuốc, có thể kiểm soát không xuất hiện trong nền mẫu thực nên lựa chọn MP làm nội chuẩn cho đề tài này.

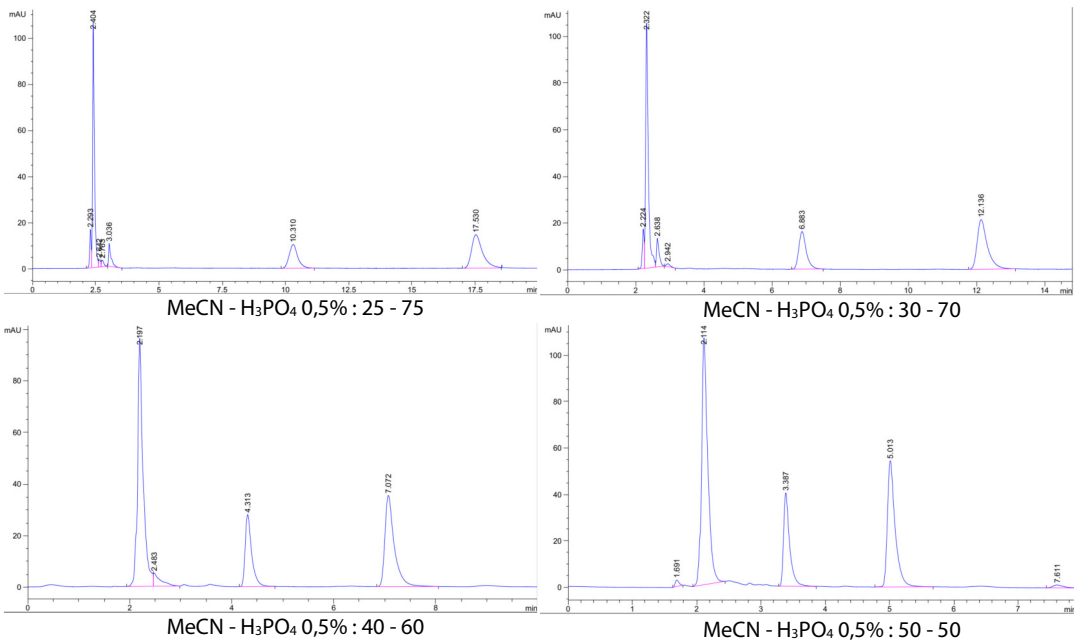
Khảo sát tỉ lệ pha động

Khảo sát tỉ lệ pha động MeCN và H_3PO_4 0,5 % ở các mức tỉ lệ MeCN là mức 25, 30, 40, 50 (%) thành phần pha động (v/v). Kết quả khảo sát thể hiện trong Hình 2.

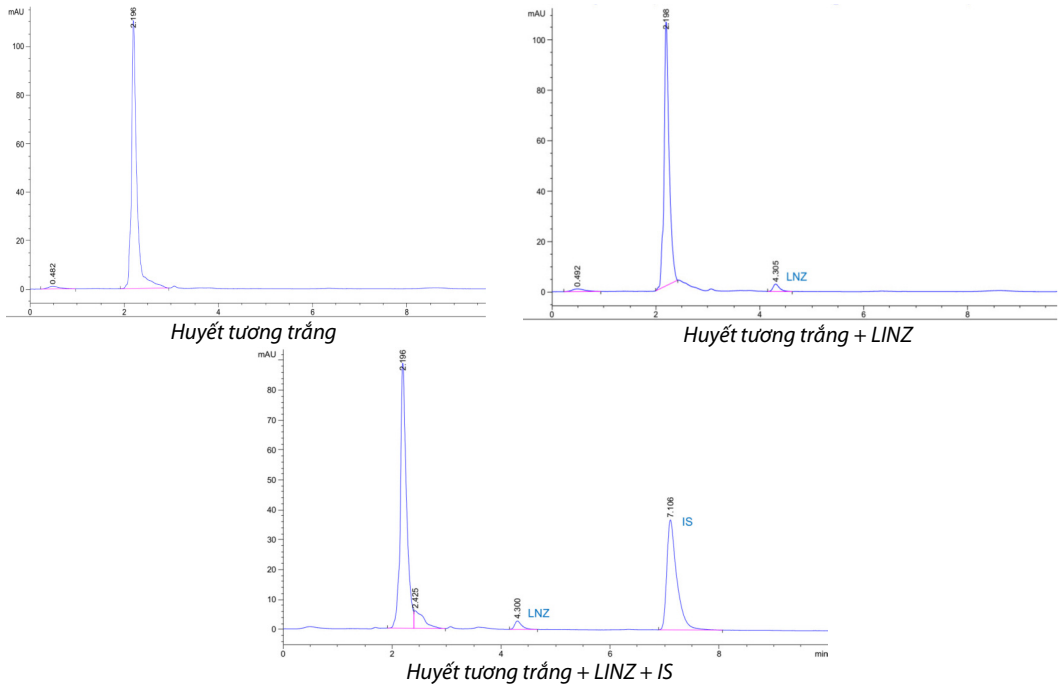
Khi tỷ lệ MeCN trong pha động thấp (25 – 30 %) sẽ dẫn đến thời gian phân tích kéo dài (>15 phút) trong khi nếu để MeCN tỷ lệ lên 50 % pha động sẽ làm LINZ có thời gian lưu gần với các pic tạp của nên huyết tương. Vì vậy, 40 % MeCN được lựa chọn là pha động cho kết quả tách tốt giữa LINZ với IS và tạp nền huyết tương cũng như có thời gian phân tích thích hợp (10 phút).

Lựa chọn dung môi tủa protein

Tiến hành tủa protein trong mẫu huyết tương với dung môi methanol và acetonitrile theo quy trình xử lý sau: 500 µL huyết tương + 50 µL IS. Lắc xoáy 5 giây + 800 µL MeCN/MeOH. Lắc xoáy 10 giây. Ly tâm 10000



Hình 2. Sắc ký đồ khảo sát tỷ lệ pha động



Hình 3. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu

vòng/phút x 10 phút. Hút dịch trong phía trên tiến hành phân tích sắc ký.

Kết quả cho thấy khi tủa với methanol nền mẫu xuất hiện nhiều pic tạp chất hơn, trong khi tủa bằng acetonitrile thì nền mẫu khá sạch, ít pic tạp. Do đó, lựa chọn acetonitrile để kết tủa protein là phù hợp với nghiên cứu này.

Thẩm định phương pháp phân tích

Độ phù hợp hệ thống phân tích

Tiến hành phân tích 6 lần mẫu chuẩn có nồng độ LINZ là 25 mg/l trong huyết tương (nồng độ MQC) được xử lý mẫu theo quy trình phân tích. Thời gian lưu của LINZ là 4,290 ± 0,007 phút (RSD = 0,2 %), của IS là 7,106 ± 0,014 phút (RSD = 0,2 %); diện tích pic của LINZ là 586,8 ± 5,3 mAU.s (RSD = 0,9 %), của IS là 441,9 ± 2,4 mAU.s (RSD = 0,5 %); tỷ lệ diện tích LINZ/IS là 1,33 ± 0,01 (RSD = 0,7 %). Kết quả cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ phù hợp hệ thống phân tích [7].

Độ chọn lọc/Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích 3 mẫu: mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương trắng thêm LINZ nồng độ 10 µg/ml, mẫu huyết tương trắng thêm cả chuẩn LINZ 10 µg/ml (nồng độ LLOQ) và IS nồng độ 10 µg/ml. Sắc ký đồ các mẫu trình bày ở hình 3.

Trên sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng không xuất hiện pic ở vị trí thời gian lưu của LINZ và IS. Ở sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng thêm LINZ, xuất hiện pic của LINZ. Trên sắc ký đồ mẫu huyết trắng thêm LINZ và IS xuất hiện pic của LINZ trùng thời gian lưu với pic LINZ trong mẫu huyết tương trắng thêm LINZ và pic của IS. Điều đó khẳng định tính chọn lọc của phương pháp phân tích.

Tiến hành xử lý mẫu và phân tích theo phương pháp đã xây dựng trên 06 mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau và 06 mẫu thêm chuẩn trong huyết tương chứa LINZ ở nồng độ LLOQ (10 µg/ml). Kết quả thu được tại thời gian lưu của LINZ, đáp ứng pic của các mẫu LLOQ lớn hơn 5 lần đáp ứng pic của mẫu trắng (diện tích pic tương ứng ở mẫu

trắng = 0); tại thời gian lưu của nội chuẩn IS, đáp ứng pic của nồng độ LLOQ lớn hơn 20 lần đáp ứng pic của mẫu trắng (diện tích pic tương ứng ở mẫu trắng = 0). Phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu [7].

Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Tiến hành xử lý và phân tích 06 mẫu chuẩn trong huyết tương có nồng độ của LINZ 1 mg/l (nồng độ LLOQ điểm thấp nhất của đường chuẩn). Kết quả đánh giá giới hạn định lượng dưới như sau: tại vị trí thời gian lưu của LINZ, đáp ứng mẫu chuẩn trong huyết tương ở nồng độ 1 mg/l lớn hơn 5 lần đáp ứng mẫu trắng trắng (diện tích pic tương ứng ở mẫu trắng = 0). Độ đúng 92,1 ± 1,9 % (nằm trong khoảng từ 80 – 120 %) RSD 2,0 % < 20 %. Phương pháp đạt yêu cầu về LLOQ [7].

Đường chuẩn và độ tuyến tính

Tiến hành pha 05 bộ mẫu huyết tương thêm chuẩn LINZ có nồng độ lần lượt là 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50 µg/ml và nội chuẩn với nồng độ10 µg/ml. Phân tích theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ LINZ trong mẫu với tỉ lệ diện tích pic LINZ/IS bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả tuyến tính được trình bày trong bảng 1.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, trong khoảng nồng độ từ 1 µg/ml đến 50 µg/ml của LINZ có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ LINZ với tỉ lệ diện tích pic của LINZ/IS với hệ số tương quan lớn hơn 0,99. Độ đúng của nồng độ LINZ được xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học: độ đúng ở LLOQ và giới hạn định lượng trên (ULOQ) ≤ 20 %; các điểm khác của đường chuẩn ≤ 15 % [7].

Độ đúng, độ chính xác

Chuẩn bị đường chuẩn, 06 mẫu mỗi tại các mức nồng độ: mẫu LLOQ, mẫu kiểm tra khoảng nồng độ thấp 1,5 µg/ml (LQC), mẫu kiểm tra khoảng nồng độ thấp 25 µg/ml (MQC), mẫu kiểm tra khoảng nồng độ cao 40 µg/ml (HQC). Thực hiện phân tích các mẫu theo quy trình. Xác định nồng độ, độ đúng và

Bảng 1. Đường chuẩn và độ tuyến tính

Nồng độ (µg/ml)	Độ đúng (%)				
	Đường 1	Đường 2	Đường 3	Đường 4	Đường 5
1,0	97,8	97,4	85,4	94,7	101,4
2,0	95,7	99,5	89,3	100,6	98,0
5,0	94,6	96,4	99,0	97,4	101,4
10,0	93,3	99,2	99,8	97,9	99,3
15,0	102,5	100,1	99,7	101,7	97,8
20,0	102,3	101,9	101,5	102,1	101,2
30,0	103,2	99,9	101,9	98,8	100,6
50,0	98,7	99,7	99,1	103,1	99,7
PTHQ (y = ax + b)	a = 0,0562	a = 0,0553	a = 0,0532	a = 0,0534	a = 0,0546
	b = 0,0026	b = 0,0016	b = 0,0079	b = 0,0080	b = 0,0074
	R^2 = 0.9989	R^2 = 0,9999	R^2 = 0,9996	R^2 = 0,9993	R^2 = 0,9999

Bảng 2. Kết quả độ đúng – độ chính xác

SST	Mẫu thẩm định	Trong ngày (n=6)		Khác ngày (3 ngày, n=18)	
		Độ đúng(%)	RSD(%)	Độ đúng(%)	RSD(%)
1	LLOQ (1,0 µg/ml)	92,1 ± 1,9	2,0	101,6 ± 8,6	8,5
2	LQC (1,5 µg/ml)	95,5 ± 2,8	3,0	98,8 ± 4,1	4,2
3	MQC (25 µg/ml)	95,7 ± 3,6	3,8	99,4 ± 3,7	3,7
4	HQC (40 µg/ml)	100,2 ± 2,2	2,1	100,6± 2,2	2,2

độ chính xác của các mẫu. Kết quả thể hiện trong Bảng 2 phần độ đúng – độ chính xác trong ngày.

Thực hiện đánh giá chỉ tiêu độ đúng - độ chính xác của phương pháp trong 3 ngày phân tích khác nhau. Trong mỗi ngày, tiến hành tương tự như phần độ đúng – độ chính xác trong ngày. Kết quả thể hiện trong bảng 2 phần độ đúng – độ chính xác khác ngày.

Từ các kết quả phân tích cho thấy ở 3 mức QC, phương pháp có độ đúng trong ngày và khác ngày nằm trong giới hạn cho phép 85-115%, độ chính xác có giá trị RSD (%) không quá 15 %; riêng mẫu LLOQ có độ đúng nằm trong giới hạn cho phép 80 -120%, độ chính xác trong ngày có giá trị RSD (%) không quá 20 % [7].

Độ thu hồi

Tỷ lệ thu hồi được xác định bằng cách so sánh diện tích pic LINZ và IS trong các lô mẫu huyết tương đã được chiết tách (CT) theo quy trình xử lý đã xây dựng và các mẫu có nồng độ chất phân tích tương ứng pha trong nền mẫu không qua chiết tách.

Chuẩn bị các lô mẫu LQC, MQC, HQC trong huyết tương, mỗi lô mẫu gồm 6 mẫu độc lập, xử lý và phân tích theo qui trình. Song song, chuẩn bị các lô mẫu QC trong pha động, mỗi lô mẫu QC gồm 6 mẫu độc lập. Phân tích sắc ký các mẫu trên không qua chiết tách.

Độ thu hồi ở LQC là 106,6 %; MQC là 107,3 %; HQC là 103,7 %; của IS là 103,5 % đáp ứng yêu cầu độ thu hồi nằm trong khoảng 30-110 % và chênh lệch độ thu hồi giữa các mức không quá 15 % [7].

Độ nhiễm chéo

Tiêm xen kẽ từng mẫu huyết tương trắng sau mẫu ULOQ. Tại thời gian lưu của LINZ và IS, so sánh đáp ứng pic trên mẫu huyết tương trắng với đáp ứng pic trên các mẫu LLOQ. Kết quả thu được không xuất hiện pic trong mẫu huyết tương trắng trùng với thời gian lưu của pic LINZ và IS trong mẫu LLOQ. Như vậy, không xuất hiện khả năng nhiễm chéo trong quá trình phát triển phương pháp.

Độ ổn định của mẫu huyết tương

Thực hiện thẩm định độ ổn định của mẫu huyết tương chứa LINZ ở mức LQC (1,5 µg/ml) và HQC (40 µg/ml), thực hiện phân tích mỗi mức 06 mẫu về các chỉ tiêu:

Thời gian ngắn ở nhiệt độ phòng: so sánh nồng độ trung bình ở mỗi mức nồng độ ở thời điểm sau 6 giờ với thời điểm ban đầu.

Sau 3 chu kì đông rã: đông lạnh hoàn toàn các lô mẫu LQC, HQC ở - 30 ˚C ± 5 ˚C, sau đó để rã đông ở nhiệt độ phòng. Sau 3 chu kì đông – rã liên tiếp, phân tích xác định nồng độ hoạt chất trong các mẫu và so sánh với thời điểm ban đầu.

Mẫu sau xử lý (mẫu để trong bộ tiêm mẫu tự động): so sánh nồng độ mẫu để trong bộ tiêm mẫu tự động sau xử lý 18h với thời điểm ban đầu.

Bảo quản dài ngày: so sánh nồng độ mẫu được bảo quản ở -30 ˚C ± 5 ˚C dài ngày (14 ngày) với thời điểm ban đầu.

Kết quả được thể hiện ở bảng 3:

Kết quả cho thấy, nồng độ LINZ trung bình cả 2 lô mẫu LQC và HQC bảo quản ở các chỉ tiêu đều nằm trong khoảng 85-115 % so với nồng độ ban đầu với RSD < 15 %. Vậy mẫu LINZ ổn định trong các chỉ tiêu thẩm định.

Bàn luận

Quy trình xử lý và phân tích phù hợp với

Bảng 3. Kết quả độ ổn định của mẫu huyết tương

Chỉ tiêu	Mẫu LQC (1,5 µg/ml)		Mẫu HQC (40 µg/ml)	
	% ban đầu	RSD (%)	% ban đầu	RSD (%)
Thời gian ngắn	95,8	2,1	102,1	1,8
3 chu kì đông rã	100,0	2,5	96,0	1,0
Mẫu sau xử lý	100,0	2,1	100,5	1,1
Thời gian dài (14 ngày)	109,4	4,3	104,5	1,5

ứng dụng thực tiễn trên lâm sàng vì một số ưu điểm:

Đơn giản: chỉ tủa protein bằng tác nhân đơn giản, không làm thay đổi tính chất của chất phân tích (acetonitril) và ly tâm hút dịch lọc trong phía trên. Nghiên cứu [5] cũng sử dụng quy trình xử lý mẫu tương tự nhưng tác nhân tủa protein dùng acid perchloric 65 % là tác nhân có tính acid và oxi mạnh. Các nghiên cứ [3], [4], [6] có quá trình xử lý mẫu nhiều bước hơn, làm tăng thời gian xử lý mẫu và yêu cầu thêm về thiết bị cô Nito.

Thời gian phân tích nhanh (10 phút) cùng pha động đơn giản, dễ chuẩn bị

Khoảng nồng độ phù hợp để phân tích các mẫu huyết tương người trong việc theo dõi các bệnh nhân đang điều trị trên lâm sàng.

Phương pháp được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn của FDA cho kết quả tin cậy.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định LINZ trong huyết tương bằng phương pháp HPLC với IS là methylparaben, sử dụng cột VertiSepTM GES C18 HPLC (4,6 mm × 250 mm; 5µm), pha động MeCN - H3PO4 0,5 % (40/60, v/v) 1,0 ml/phút, bước sóng 254 nm. Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn của FDA về độ chọn lọc/đặc hiệu, đường chuẩn, độ đúng và chính xác, giới hạn định lượng dưới, độ nhiễm chéo, tỷ lệ thu hồi, độ ổn định của mẫu trong thời gian ngắn (nhiệt độ phòng), độ ổn định sau khi xử lý mẫu, độ ổn định sau 3 chu kì đông – rã, độ ổn định sau 14 ngày ở - 30 ± 5 ˚C. Phương pháp có thể triển khai và định lượng LINZ trên các mẫu huyết tương trong các nghiên cứu lâm sàng, nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học các chế phẩm chứa dược chất linezolid.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Owens R.C. và Shorr A.F. (2009), "Rational dosing of antimicrobial agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies", *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists,* 66(12-4), pp23-30.
2. Karen W (2015), *Lippincott Pharmacology Illustrated Review 6th Edition,* Wolters Kluwer, pp.474-476.
3. Boak L.M., Li J., Nation R.L. và cộng sự (2006), "High-performance liquid chromatographic method for simple and rapid determination of linezolid in human plasma", *Biomedical Chromatography,* 20(8), pp.782–786.
4. Buerger C., Joukhadar C., Muller M. và cộng sự (2003), "Development of a liquid chromatography method for the determination of linezolid and its application to in vitro and human microdialysis samples", *Journal of Chromatography.* B, 796(1), pp.155–164.
5. A.16. Cattaneo D., Baldelli S., Conti F. và cộng sự (2010), "Determination of linezolid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection", *Ther Drug Monit,* 32(4), pp.520–524.
6. Peng G.W., Stryd R.P., Murata S. và cộng sự (1999), "Determination of linezolid in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 20(1–2), pp.65–73.
7. Food and Drug Administration – United States (2018), Guidance for industry – Bioanalytical method validation.