

Định lượng omeprazol trong huyết tương bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD)

Nguyễn Lê Văn Hà, Nguyễn Thị Thủy, Dương Đình Chung*

Đại học Nguyễn Tất Thành

*ddchung@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, phương pháp HPLC để định lượng omeprazol trong huyết tương người đã được xây dựng và thẩm định. Mẫu huyết tương được làm sạch bằng phương pháp gây tủa protein với dung môi là methanol, sau đó li tâm với tốc độ 12000rpm trong 10 phút. Dịch sau khi li tâm được lọc qua màng lọc 0,45µm làm dịch tiêm sắc kí. Điều kiện sắc kí được thực hiện như sau: Cột C₁₈ (4,6 x 150mm, 5µm), với lọc tiền cột tương ứng; Đầu dò - DAD (301nm); Pha động: acetonitril – dipotassium hydrogen phosphate 3mM (27:73); Tốc độ dòng 1,2ml/phút; phương pháp này đã được thẩm định cho khả năng lặp lại (RSD <5%), độ chính xác (92,91 - 98,48%), tính tuyến tính ($r > 0,999$ ở 250 - 8000ng/ml) và độ nhạy (LOQ 289,5ng/ml). Hiệu suất chiết cao (94,2 - 98,8%) với RSD <5%. Mẫu huyết tương ổn định sau 3 chu kỳ đông - rã và trong quá trình xử lý mẫu. Tất cả các chỉ tiêu đã thẩm định và đạt yêu cầu theo hướng dẫn của FDA. Do đó, phương pháp này có thể áp dụng được để định lượng OMZ trong huyết tương.

Nhận 22.08.2018
Được duyệt 07.09.2018
Công bố 20.09.2018

Từ khóa
omeprazol, huyết tương người, sắc kí lỏng hiệu năng cao

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Y học phát triển, việc cá thể hóa điều trị hiện đang chú trọng đến hiệu quả điều trị của thuốc đối với từng bệnh nhân. Để làm được điều này, việc định lượng nồng độ thuốc trong máu, dịch sinh học rất cần thiết. Omeprazol (OMZ) là thuốc dùng phổ biến cho việc điều trị bệnh đau dạ dày, tá tràng hay trào ngược thực quản [1]. Phương pháp định lượng OMZ trong chế phẩm đã có trong Dược Việt Nam V và một số nghiên cứu đã tiến hành định lượng OMZ trong huyết tương bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao [2-6]. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có công trình nào công bố định lượng OMZ trong dịch sinh học. Nghiên cứu này nhằm: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng nồng độ OMZ trong huyết tương theo hướng dẫn của FDA, ứng dụng để đánh giá sinh khả dụng, tương đương sinh học của các chế phẩm chứa OMZ trên thực nghiệm.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Huyết tương có chứa Omeprazol

2.2 Thiết bị và vật liệu

Hệ thống HPLC 1206 Agilent – PDA.

Methanol, acetonitril (Merck – Đức), các hóa chất khác đạt chuẩn phân tích. Huyết tương do Bệnh viện Truyền máu và Huyết học Tp.HCM cung cấp. Chất chuẩn Omeprazol và Indomethacin do Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.HCM cung cấp.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Khảo sát qui trình xử lý mẫu

Chuẩn bị mẫu: Lấy 400µl huyết tương cho vào ống ly tâm. Thêm 50µl dung dịch chuẩn (hoặc QC), vortex trong 30 giây. Thêm 50µl dung dịch chất nội chuẩn IDM, vortex trong 1 phút. Tiến hành khảo sát các phương pháp chiết tách:

Phương pháp 1: Thêm vào mẫu phân tích 1,2ml dung dịch methanol, vortex trong 5 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút x 10 phút. Lấy dịch nổi, lọc qua màng 0,45µm. Dịch lọc thu được dùng để tiêm sắc kí.

Phương pháp 2: Thêm vào mẫu phân tích 4,5ml hỗn hợp dung môi dichloromethan - methanol (5:1), vortex trong 5 phút. Ly tâm 4.500 vòng/phút x 10 phút. Lấy 3ml dịch nổi, bốc hơi ở 40°C bằng máy ủ nhiệt khô, cạn thu được đem hòa tan vào 1ml dung dịch pha động, lọc qua màng 0,45µm. Dịch lọc thu được dùng để tiêm sắc kí.



2.3.2 Xác định điều kiện sắc kí

Điều kiện sắc kí được khảo sát trên máy HPLC Agilent 1260 (Mĩ), đầu dò DAD, bước sóng phát hiện 301nm, nhiệt độ cột 40°C, thể tích tiêm mẫu 20µl. Thăm dò một số pha động trên cột C18, sử dụng hỗn hợp pha động là methanol, acetonitril, nước điều chỉnh với các điều kiện tỉ lệ khác nhau. Chọn điều kiện sắc kí sao cho pic OMZ và IDM tách hoàn toàn nhau và tách khỏi các pic tạp và đạt độ tinh khiết cần thiết cho định lượng và các thông số sắc kí đạt yêu cầu.

2.4 Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp định lượng chất trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA [7]. Các chỉ tiêu thẩm tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại trong ngày, độ lặp lại khác ngày, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới (LOQ), hiệu suất chiết và độ ổn định của OMZ trong huyết tương.

3 Kết quả nghiên cứu và bàn luận

3.1 Quy trình xử lý mẫu

Kết quả cho thấy hiệu suất chiết trung bình của 6 lần lặp lại bằng hai phương pháp gây tủa protein và chiết phân bố lỏng – lần lượt là 96,87%; RSD=6,72% và 97,77; RSD=5,42%. Phân tích Anova cho kết quả khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$). Mặt khác, giữa 2 phương pháp chiết tách OMZ thì việc gây tủa protein dễ thực hiện, nhanh chóng. Vì vậy, quy trình xử lý mẫu bằng phương pháp gây tủa protein với dung môi là methanol tỉ lệ 1:3 được lựa chọn để tiếp tục khảo sát.

3.2 Khảo sát điều kiện sắc kí

Thăm dò một số pha động trên cột C18, sử dụng hỗn hợp pha động là methanol, acetonitril, nước điều chỉnh với các điều kiện tỉ lệ khác nhau. Chọn điều kiện sắc kí sao cho pic OMZ và IDM tách hoàn toàn nhau và tách khỏi các pic tạp và đạt độ tinh khiết cần thiết cho định lượng và các thông số sắc kí đạt yêu cầu. Điều kiện sắc kí phân tích OMZ trong huyết tương được lựa chọn như sau: Cột sắc kí Zobrac XDB C18 (150x4,6mm, 5µm) và tiền cột XDB (10x

4,6mm, 5µm) (Agilent, Mĩ), nhiệt độ cột 40°C, bước sóng phát hiện 301nm, thể tích tiêm mẫu là 20µl. Pha động acetonitril – nước chứa 3mM K_2HPO_4 (37:73) với tốc độ dòng 1,2ml/phút.

3.2.1 Quy trình định lượng OMZ trong huyết tương

Dung dịch chuẩn gốc: indomethacin 275µg/ml và 70µg/ml omeprazol trong methanol.

Mẫu chuẩn: Lấy 400µl huyết tương cho vào ống li tâm. Thêm 50µl dung dịch chuẩn gốc OMZ, vortex trong 30 giây. Thêm 50µl dung dịch chất nội chuẩn IDM, vortex trong 1 phút. Thêm 1,2ml dung dịch methanol, vortex trong 5 phút. Li tâm 12,000 vòng/phút x 10 phút. Lấy dịch nổi, lọc qua màng 0,45µm. Dịch lọc thu được dùng để tiêm sắc kí.

Mẫu thử: Lấy 400µl huyết tương cho vào ống li tâm. Thêm 50µl dung dịch chất nội chuẩn IDM, vortex trong 1 phút. Thêm 1.250ml dung dịch methanol, vortex trong 5 phút. Li tâm 12.000 vòng/phút x 10 phút. Lấy dịch nổi, lọc qua màng 0,45µm. Dịch lọc thu được dùng để tiêm sắc kí.

Điều kiện sắc kí: Máy HPLC Agilent 1260 (Mĩ), đầu dò DAD, bước sóng phát hiện 301nm, nhiệt độ cột 40°C, thể tích tiêm mẫu 20µl. Pha động acetonitril – nước chứa 3 mM K_2HPO_4 (37:73) với tốc độ dòng 1,2mL/phút. Hàm lượng OMZ được tính theo công thức sau:

$$X(\mu\text{g/l}) = \frac{S_{C/IS}}{S_{T/IS}} \times \frac{C \times p \times 10^3}{V}$$

$S_{C/IS}$ và $S_{T/IS}$: Tỉ lệ diện tích pic của OMZ/IS trong mẫu chuẩn, mẫu thử

C : nồng độ dung dịch chuẩn (µg/l)

P : độ tinh khiết chất chuẩn (%)

V : thể tích mẫu thử (µl)

3.3 Thẩm định phương pháp phân tích

3.3.1 Tính tương thích hệ thống

Kết quả phân tích lặp lại 6 lần mẫu huyết tương thêm chất chuẩn OMZ 2000ng/ml và chất nội chuẩn IDM 8000ng/ml được trình bày ở Bảng 1

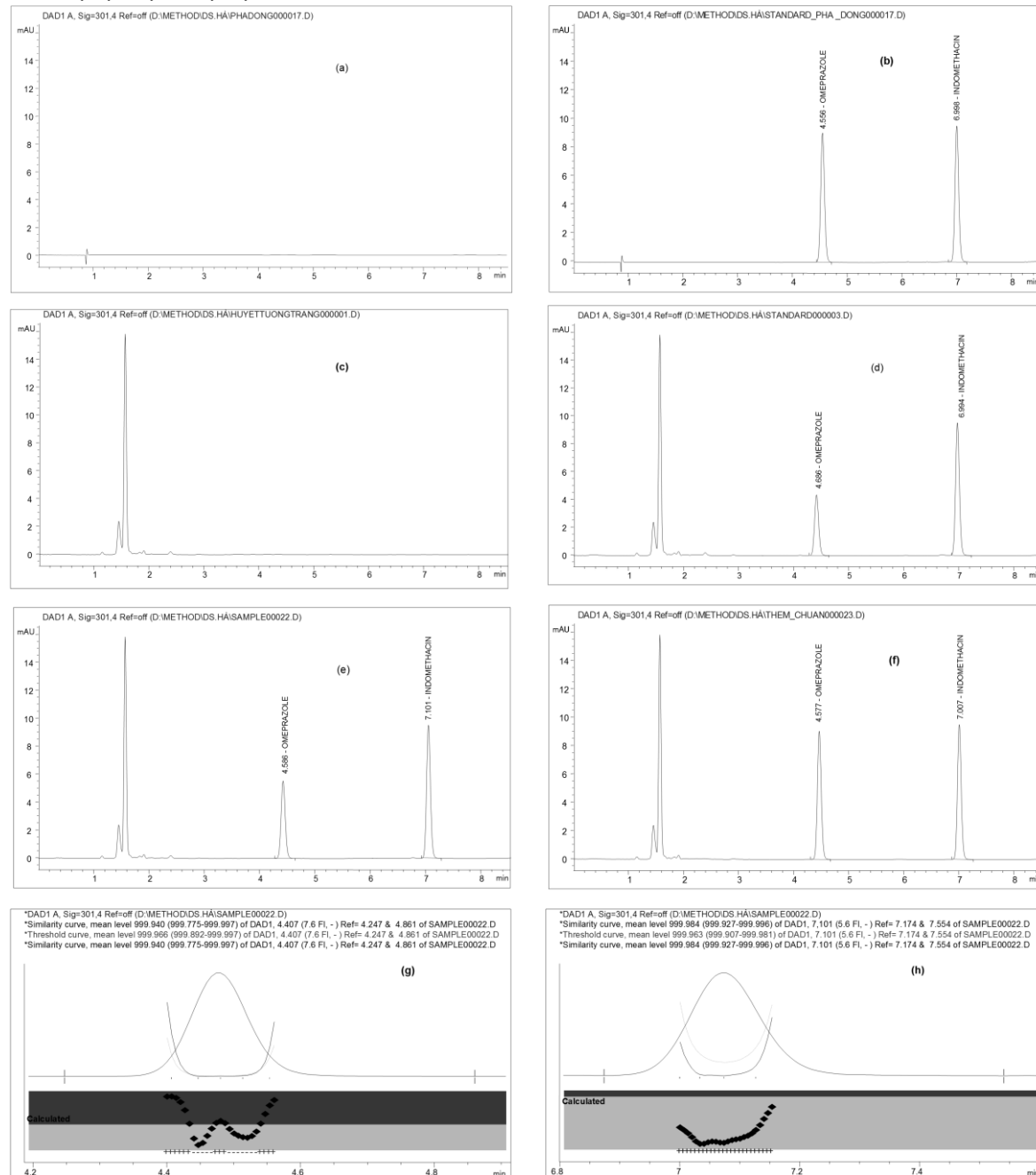
Bảng 1 Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu huyết tương thêm chuẩn (n=6)

Mẫu	OMZ					IDM					Tỉ lệ S
	t_R (min)	S (mAU.S)	USP Tail	R_s	N	t_R (min)	S (mAU.S)	USP Tail	R_s	N	
1	4,48	428,83	1,05	24,33	12376	6,99	1798,32	1,05	8,41	12410	0,238
2	4,42	426,66	1,04	24,32	12313	6,97	1788,35	1,05	8,42	12424	0,239
3	4,46	427,24	1,04	24,15	12382	6,98	1798,64	1,05	8,41	12436	0,238
4	4,41	426,12	1,04	24,47	12371	6,99	1797,65	1,05	8,43	12419	0,237
5	4,44	426,28	1,04	24,38	12337	6,96	1797,20	1,04	8,41	12472	0,237
6	4,47	429,99	1,05	24,35	12368	6,99	1788,62	1,06	8,44	12422	0,240
TB	4,44	427,52				6,98	1794,80				0,238
SD	0,03	1,56				0,01	4,91				0,00
RSD	0,63	0,36				0,18	0,27				0,53

Nhận xét: Kết quả cho thấy các pic của OMZ và IDM nhọn, cân đối (USP Tailling 0,8 -1,5), số đĩa lí thuyết cho mỗi chất ($N > 2000$) và độ phân giải tốt ($R_s > 2$). RSD của các thông số khảo sát gồm thời gian lưu, diện tích pic, tỉ lệ diện tích chất chuẩn/nội chuẩn $< 2\%$, chứng tỏ qui trình có tính phù hợp hệ thống.

3.3.2 Độ đặc hiệu - chọn lọc

Phân tích các mẫu pha động, mẫu chuẩn và nội chuẩn trong pha động, mẫu huyết tương trắng, mẫu chuẩn và nội chuẩn trong huyết tương, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn (giả lập) với nồng độ 2000ng/ml có chất nội chuẩn idomethacin theo phương pháp đã xây dựng.



Hình 1 Sắc kí đồ: (a) pha động, (b) chất chuẩn và chất nội chuẩn trong pha động, (c) huyết tương trắng, (d) mẫu chuẩn và chất nội chuẩn trong huyết tương, mẫu thử và chất nội chuẩn trong huyết

tương và (f) mẫu thử thêm chuẩn và chất nội chuẩn trong huyết tương; Độ tinh khiết của tín hiệu: (g) pic OMZ, (h) pic IDM.

Nhận xét:

Trên sắc kí đồ pic tách rời nhau, tại thời gian lưu 4,5 và 7,0 phút lần lượt tương ứng với tín hiệu của OMZ và IDM (Hình 1b, c, e, f). Trong khi đó không thấy xuất hiện pic trên sắc kí đồ của mẫu pha động, mẫu huyết tương trắng tại thời gian của mẫu của các chất này (Hình 1a, c). Độ tinh khiết pic của mỗi pic của mẫu thử được đánh giá bằng phần mềm Chemstation - Agilent với đầu dò DAD cho và kết quả đáp ứng trên 99,99% cho mỗi chất (Hình 1g,

h). Do vậy, phương pháp đặc hiệu và chọn lọc với OMZ/IDM.

3.3.3 Độ lặp lại, độ đúng

Độ lặp lại, độ đúng trong ngày, khác ngày được tiến hành phân tích trên các mẫu LQC (1000ng/ml), MQC (3000ng/ml) và HQC (5000ng/ml), các mẫu được chuẩn bị độc lập với dung dịch chuẩn gốc pha đường chuẩn, mỗi mẫu 6 lần trong ngày, liên tục trong 3 ngày. Kết quả trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2 Bảng kết quả phân tích độ đúng, độ lặp lại trong ngày, khác ngày.

Mẫu	Trong ngày (n=6)			Khác ngày (n=18)		
	Độ đúng trung bình %	SD	RSD %	Độ đúng trung bình %	SD	RSD %
LQC	91,58	1,82	1,98	92,91	2,30	2,47
MQC	96,54	1,49	1,54	98,48	2,99	3,03
HQC	96,47	1,77	1,84	97,75	3,57	3,65

Nhận xét:

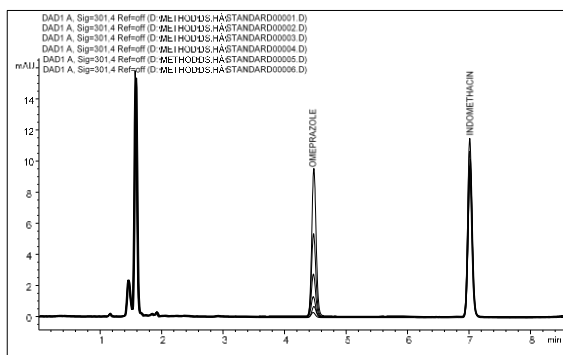
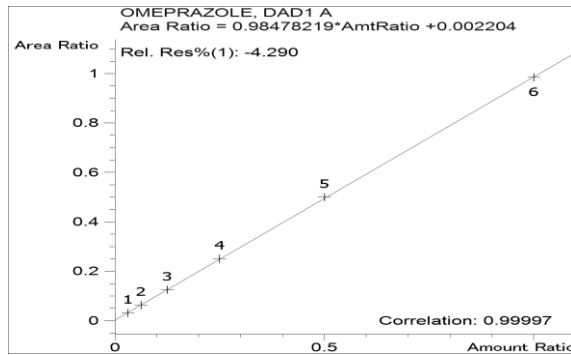
Phương pháp có độ đúng tốt giá trị phân tích trong ngày (n=6) có độ đúng từ 91,58 - 96,47%, độ lặp lại RSD từ 1,49 - 1,82%. Giá trị phân tích độ đúng khác ngày (n=18) cho độ đúng từ 92,91 - 98,48% và độ lặp lại tốt RSD từ 2,47 - 3,65%. Tất cả các mẫu LQC, MQC và HQC được phân tích, kết quả đều cho độ đúng trong khoảng qui định 85 - 115%, độ chính xác nhỏ hơn $\pm 15\%$ chứng tỏ đạt yêu cầu phân tích trong dịch sinh học.

Bảng 3 Bảng kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Nồng độ OMZ (ng/ml)	250	500	1000	2000	4000	8000
Diện tích pic OMZ (mAU.s)	56,76	111,12	220,84	446,83	894,01	1770,90
Diện tích pic IDM (mAU.s)	1798,27	1759,16	1769,51	1779,93	1788,89	1799,91
Tỉ lệ diện tích pic OMZ/IDM	0,0316	0,0632	0,1248	0,2510	0,4998	0,9839
Tỉ lệ nồng độ OMZ/IDM	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
Phương trình hồi qui tuyến tính ($y = A.x + B$)	$y = 0,9837.x + 0,0029$; $R^2 = 0,9999$					
Độ đúng tính theo đường chuẩn (%)	93,18	97,99	99,12	100,89	101,01	99,72
RSD %	9,36	4,29	2,12	1,18	0,88	0,83

3.3.4 Khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu chuẩn OMZ trong huyết tương có nồng độ 125; 500; 1000; 2000; 4000, 8000ng/ml, chuẩn bị theo qui trình đã xây dựng, tiến hành 5 mẫu cho mỗi nồng độ. Xác định mối tương quan giữa nồng độ OMZ trong huyết tương và tỉ lệ diện tích pic OMZ/DCF đo được. Kết quả được trình bày trong Bảng 3 và Hình 2, 3 cho thấy phương pháp có khoảng tuyến tính từ 250 - 8000ng/ml với hệ số tương quan $R^2=0,9999$.

**Hình 2** Sắc kí đồ của dung dịch chuẩn từ 250 - 8000 ng/ml và chất nội chuẩn 8000 ng/ml**Hình 3** Đồ thị tương quan giữa tỉ lệ nồng độ OMZ/IDM và tỉ lệ diện tích pic OMZ/IDM**3.3.5 Giới hạn định lượng dưới (LOQ)**

Dựa vào độ lệch chuẩn của đáp ứng với độ dốc của phương trình hồi qui tuyến tính, kết luận giới hạn định lượng dưới

của phương pháp là 289,5ng/ml. Giới hạn định lượng của phương pháp có thể đáp ứng khả năng phân tích nồng độ thuốc OMZ trong máu lấy trong thời gian 1/10 – 1/20 giá trị $C_{\max}$ của chất OMZ.

Bảng 4 Bảng kết xác định giới hạn định lượng dưới.

Regression Statistics	
Multiple R	0,99997
R Square	0,99993

Bảng 5 Bảng kết quả hiệu suất chiết của phương pháp.

STT	Hiệu suất chiết của các mẫu tại các điểm chuẩn khảo sát (%)					
	250ng/ml	500ng/ml	1000ng/ml	2000ng/ml	4000ng/ml	8000ng/ml
1	93,18	97,99	99,12	100,89	101,01	99,72
2	98,97	100,90	100,59	101,63	101,40	99,92
3	86,24	93,73	96,22	98,65	99,12	98,02
4	88,33	95,26	97,46	99,75	100,14	98,99
5	76,70	90,13	95,56	99,49	100,69	99,92
TB	88,68	95,60	97,79	100,08	100,47	99,31
SD	8,30	4,10	2,07	1,18	0,89	0,82
RSD %	9,36	4,29	2,12	1,18	0,88	0,83

Nhận xét: Trong Bảng 5, ở các nồng độ từ 250 – 8000ng/ml, phương pháp đều cho hiệu suất chiết cao (từ 88,68 - 100,47%). Độ lặp lại tốt, trong đó tại điểm có nồng độ thấp nhất (RSD<15%), tất cả các điểm còn lại trong dãy nồng độ khảo sát có RSD chênh lệch nhau không quá 5%. Vì vậy, phương pháp xử lý mẫu được xây dựng phù hợp để chiết tách OMZ từ huyết tương.

Bảng 6 Bảng kết quả phân tích độ ổn định.

Độ ổn định	LQC 1000ng/ml			HQC 1000ng/ml		
	Nồng độ đo ban đầu (n = 6)	Nồng độ đo lại sau (n = 6)	Giá trị P	Nồng độ đo ban đầu (n = 6)	Nồng độ đo lại sau (n = 6)	Giá trị P
3 chu kì đông - rã đông	912,83 ± 10,96	926,28 ± 34,47	0,2407	5000,69 ± 77,18	4909,14 ± 216,83	0,4350
Độ ổn định trong thời gian ngắn (5 giờ; nhiệt độ phòng)	924,20 ± 25,88	904,42 ± 32,11	0,3019	4528,36 ± 96,45	4671,00 ± 177,72	0,1456
Độ ổn định dài ngày (24 ngày; -20°C)	916,00 ± 17,91	923,45 ± 34,52	0,6238	4752,49 ± 21,59	4781,91 ± 222,83	0,7841

Nhận xét: Độ ổn định sau 3 chu kì đông - rã đông, trong thời gian ngắn (5 giờ; nhiệt độ phòng) và sau khi bảo quản 24 ngày ở -20°C. Hàm lượng OMZ ở cả 2 mức nồng độ LQC và HQC đều khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P>0,05). Như vậy, nghiên cứu đã xây dựng được qui trình định lượng OMZ trong huyết tương người. Kết quả thẩm định cho thấy đạt yêu cầu theo hướng dẫn của FDA.

4 Kết Luận

Đã xây dựng được phương pháp định lượng OMZ trong huyết tương bằng HPLC. Phương pháp đã được thẩm định

3.3.6 Hiệu suất chiết của phương pháp

Đánh giá hiệu suất chiết của phương pháp thông qua đáp ứng của 5 đường chuẩn. Kết quả so sánh giá trị đáp ứng đo được với giá trị đáp ứng của các mẫu chuẩn với nồng độ tương ứng được chuẩn bị trong pha động.

3.3.7 Độ ổn định của OMZ trong huyết tương

Xác định độ ổn định của OMZ trong huyết tương trên các mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của OMZ bằng cách so sánh tỉ lệ diện tích của OMZ/IDM có trong mẫu được bảo quản với điều kiện nhất định với các mẫu có nồng độ tương ứng được phân tích ngay sau khi chuẩn bị. Kết quả được trình bày trong Bảng 6.

với các thông số theo hướng dẫn của FDA và đạt yêu cầu. Phương pháp có độ đặc hiệu, độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày với độ lệch chuẩn tương đối đều <5%. Phương pháp có độ đúng 92,91 – 98,48% trong khoảng tuyến tính của phương pháp từ 250 – 8000ng/ml. Giới hạn định lượng dưới 285,5ng/ml. Phương pháp xử lý mẫu cho hiệu suất chiết cao từ 88,68 - 100,47%. Mẫu huyết tương ổn định sau 3 chu kì đông - rã đông, trong quá trình xử lý mẫu và bảo quản mẫu dài ngày. Kết quả này, có thể ứng dụng trong đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học cho thuốc.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế, *Dược Thư Việt Nam*. 2015.
2. Yuen, K.H., et al., *Improved high performance liquid chromatographic analysis of omeprazole in human plasma*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2001. **24**(4): p. 715-719.
3. Hussein, R.F., et al., *A validated reversed phase HPLC assay for the determination of omeprazole in human plasma*. EJPMR, 2016. **3**(6): p. 26-30.
4. Yeung, P.K., et al., *A simple high performance liquid chromatography assay for simultaneous: determination of omeprazole and metronidazole in human plasma and gastric fluid*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1998. **17**(8): p. 1393-1398.
5. Rezk, N.L., K.C. Brown, and A.D. Kashuba, *A simple and sensitive bioanalytical assay for simultaneous determination of omeprazole and its three major metabolites in human blood plasma using RP-HPLC after a simple liquid-liquid extraction procedure*. Journal of Chromatography B, 2006. **844**(2): p. 314-321.
6. Kobayashi, K., et al., *Simultaneous determination of omeprazole and its metabolites in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with an alkaline-resistant polymer-coated C18 column*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1992. **579**(2): p. 299-305.
7. U.S. Department of Health and Human Services. Food and drug administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. 2001.

Determination of omeprazole in human plasma by high performance chromatography method (HPLC-DAD)

Van Ha Nguyen Le, Thuy Nguyen Thi, Dinh Chung Duong*

University of Nguyen Tat Thanh

*ddchung@ntt.edu.vn

Abstract In this study, the HPLC method for determination of omeprazole in human plasma was developed and validated. Plasma samples were cleared of protein by methanol, followed by centrifugation at 12000rpm for 10min. Solutions obtained after centrifugation were filtered through 0.45 μ m pore size membrane prior to injecting. Chromatography was performed as follows: Column C₁₈ (4.6 x 150mm, 5 μ m) with corresponding pre-column; Detector – DAD (301nm); Mobile phase: acetonitrile – dipotassium hydrogen phosphate 3mM (27:73; Flow rate 1.2ml/min; The method was validated for repeatability (RSD<5%), accuracy (92.91 – 98.48%), linearity ($r>0.999$ at 250 – 8000ng/ml) and sensitivity (LOQ = 289.5ng/ml). The high extraction efficiency (94.2 - 98.8%) with RSD<5% was obtained. Plasma samples were stable after 3 cycles of freezing and during sample processing. All proved the method well met the FDA requirements for quantitation of omeprazole in the biological sample. Thus, this analytical procedure can be applied to quantify OMZ in serum human.

Keywords omeprazole; human plasma; high performance liquid chromatography