

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG PYRIDOSTIGMIN BROMID TRONG HUYẾT TƯƠNG THỎ BẰNG SẮC KÍ LỒNG KHỐI PHỔ

Nguyễn Thanh Tuyền^{1*}, Tô Minh Hùng¹, Nguyễn Duy Chí¹
Lê Việt Đức¹, Đỗ Phong Tuệ¹, Đào Hồng Loan¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp định lượng pyridostigmin bromid trong huyết tương thỏ bằng sắc kí lồng khối phổ.

Vật liệu và phương pháp: Khảo sát điều kiện khối phổ, điều kiện sắc kí, quy trình xử lí mẫu huyết tương và thẩm định phương pháp phân tích.

Kết quả: Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng pyridostigmin bromid trong huyết tương thỏ bằng sắc kí lồng khối phổ. Xử lí mẫu bằng phương pháp chiết pha rắn sử dụng cột Oasis HLB 30 mg/1 ml. Điều kiện khối phổ ở chế độ ESI+ với mảnh ion mẹ và mảnh ion con định lượng của pyridostigmin bromid là 180,99 và 72,00; của chất chuẩn nội neostigmin bromid là 222,99 và 72,00. Điều kiện sắc kí gồm: pha động là acetonitril chứa 0,1% acid formic - dung dịch đệm (90:10), cột Phenomenex Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm; 1,7 µm), tốc độ dòng: 0,3 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 5 µl, thời gian phân tích mẫu: 3 phút. Phương pháp có độ đặc hiệu tốt, độ tuyến tính cao (hệ số tương quan $r = 0,9997$); khoảng xác định từ 10-500 ng/ml; độ đúng trong ngày và giữa các ngày của phương pháp tương ứng từ 94,49-112,17% và 95,63-115,64%. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp là 10 ng/ml.

Từ khóa: Sắc kí lồng khối phổ, pyridostigmin bromid, chiết pha rắn.

ABSTRACT

Objectives: Develop a method for quantitative determination of pyridostigmin bromide in rabbit plasma by liquid chromatography-mass spectrometry.

Materials and methods: Research of mass spectrometry conditions; chromatographic conditions; plasma sample processing and validation of analytical methods.

Results: The method of quantitative determination of pyridostigmine bromide in rabbit plasma has been developed and validated by liquid chromatography mass spectrometry. Samples were treated by solid phase extraction using an Oasis HLB column of 30 mg/1 ml. The mass spectrometry conditions in ESI+ mode with the quantitative parent and daughter ion fragments of pyridostigmine bromide are 180.99 and 72.00; of neostigmine bromide are 222.99 and 72.00. Chromatographic conditions include: Mobile phase is acetonitrile containing 0.1% formic acid - buffer solution (90:10), Phenomenex Kinetex C18 column (100 mm x 2.1 mm; 1.7 µm), flow rate: 0.3 ml/min, sample injection volume: 5 µl, sample analysis time: 3 minutes. The method has good specificity, high linearity (the correlation coefficient $r = 0.9997$); the linear range from 10 - 500 ng/ml; the intraday and interday accuracy of the method from 94.49% - 112.17% and 95.63% - 115.64%, respectively. The lowest limit of quantification of the method was 10 ng/ml.

Keywords: Liquid chromatography-mass spectrometry, pyridostigmine bromide, solid phase extraction.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Duy Chí, Email: duychi1273@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/4/2023; mời phản biện khoa học: 5/2023; chấp nhận đăng: 25/5/2023.

¹Viện Kiểm nghiệm, nghiên cứu dược và trang thiết bị y tế Quân đội

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất độc thần kinh gồm các hợp chất phospho hữu cơ có tác dụng chủ yếu lên hệ thần kinh và gây chết người. Cơ chế tác dụng của chất độc thần kinh là gây ức chế không hồi phục cholinesterase, làm ứ đọng acetylcholin nội sinh, dẫn đến rối loạn dẫn truyền thần kinh và hoạt động của các cơ vân. Chất độc thần kinh

hiện vẫn đang là loại chất độc hóa học nguy hiểm nhất vì độc tính cao, chỉ cần tiếp xúc với một lượng rất nhỏ đã có thể gây tử vong nhanh chóng [1].

Pyridostigmin bromid (PB) là một chất thuộc nhóm carbamat gây ức chế có hồi phục cholinesterase tại khe sinap, do đó, làm chậm quá trình phân hủy acetylcholin, bảo vệ cholinesterase

trước các chất độc thần kinh. Trên lâm sàng, PB được sử dụng chủ yếu để điều trị bệnh nhược cơ; nhưng trong quân sự, PB được nghiên cứu sử dụng để dự phòng nhiễm chất độc thần kinh [1].

Việc xây dựng phương pháp định lượng PB trong huyết tương có vai trò quan trọng, tạo cơ sở khoa học giúp nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng, dược động học để phát triển dạng bào chế mới dự phòng nhiễm chất độc thần kinh. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu phương pháp định lượng PB bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV, sắc ký khí... nhưng giới hạn định lượng còn hạn chế, quy trình phân tích phức tạp, thời gian phân tích dài.

Để góp phần nghiên cứu phát triển dạng bào chế mới của PB (viên tác dụng kéo dài), chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xây dựng phương pháp định lượng PB trong huyết tương thô bằng sắc ký lỏng khối phổ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Acetonitril HPLC (J.T Baker), acid formic (Merck), methanol HPLC (J.T Baker); chuẩn PB (lô SX: ARA457; hàm lượng: 99,99% - Bide Pharma Ltd); chuẩn Neostigmin bromid (IS) (lô SX: P1242717; hàm lượng: 98,0% - Damas beta); huyết tương thô. Các hóa chất và dung môi sử dụng là loại tinh khiết phân tích, đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

- Dụng cụ, thiết bị nghiên cứu: máy sắc ký lỏng khối phổ Acquity UPLC-MS/MS I-Class/Xevo (TQD-Waters, Hoa Kỳ); cân phân tích AB 265S và máy đo pH Seven easy (Mettler-Toledo, Thụy Sĩ); máy li tâm Biofuge Pico (Đức); cột chiết pha rắn Oasis HLB 30 mg/1 ml; cột sắc ký Kinetex C18 100 mm x 2,1 mm; 1,7 µm, phenomenex (Hoa Kỳ); bình định mức, pipet loại Class A (Đức).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát điều kiện khối phổ, điều kiện sắc ký:

Bơm trực tiếp dung dịch chuẩn PB 500 ng/ml và dung dịch chuẩn nội neostigmin bromid (IS) 500 ng/ml được pha trong acetonitril có 0,5% acid formic vào máy khối phổ qua syringe với tốc độ 5 µl/phút. Sử dụng phần mềm của hệ thống để xác định điều kiện khối phổ của từng chất, xác định mảnh ion mẹ và mảnh ion con để định lượng.

Sau khi tìm được điều kiện khối phổ phù hợp với từng chất, tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn hỗn hợp có chứa PB nồng độ 37,5 ng/ml và IS nồng độ 25 ng/ml vào hệ thống theo các điều kiện về thành phần pha động, tốc độ dòng để tìm điều kiện sắc ký phù hợp.

- Khảo sát quy trình xử lý mẫu huyết tương:

Tiến hành xử lý mẫu huyết tương có chứa chất chuẩn PB và IS bằng cột chiết pha rắn, khảo sát lựa chọn dung môi rửa để loại tạp chất và rửa giải để tỉ lệ thu hồi cao, ổn định.

- Thẩm định phương pháp phân tích:

Tiến hành thẩm định tính tương thích của hệ thống, độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp; ảnh hưởng của nền mẫu; giới hạn định lượng dưới; đường chuẩn - khoảng tuyến tính; độ đúng - độ chính xác trong ngày, khác ngày; tỉ lệ thu hồi và độ ổn định của hoạt chất trong quá trình xử lý, phân tích và bảo quản mẫu dài ngày theo hướng dẫn của FDA [5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Điều kiện khối phổ và điều kiện sắc ký

Các hợp chất nghiên cứu được ion hóa theo kiểu ESI (+) với các thông số hỗ trợ cho quá trình ion hóa đã được tối ưu gồm: tốc độ dòng khí hóa hơi dung môi 650 L/h, nhiệt độ nguồn 150°C, nhiệt độ dòng khí hóa hơi dung môi 200°C, tốc độ dòng khí bắn phá 1 L/h, thế ion hóa 2300V. Hai thông số của thiết bị khối phổ đặc trưng cho sự phân mảnh là thế cone và năng lượng va chạm đồng thời xác định được mảnh ion con m/z có cường độ lớn nhất dùng để định lượng, mảnh ion con thứ 2 có cường độ thấp hơn dùng để định tính. Kết quả thực nghiệm trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ion mẹ và các ion con, thế cone, năng lượng va chạm của PB và IS.

Tên chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Thế cone (V)	Năng lượng va chạm (V)
PB	180,99	72,00*	38	46
		124,00	38	46
IS	222,99	72,00*	18	36
		208,06	18	36
* Ion con dùng để định lượng				

Qua khảo sát, chúng tôi lựa chọn điều kiện sắc ký như sau:

- Pha động: acetonitril chứa 0,1% acid formic - dung dịch đệm (90:10).
- Cột phenomenex Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm; 1,7 µm).
- Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút.
- Detector MS ở chế độ ESI (+), như bảng 1.
- Thể tích tiêm: 5 µl.
- Thời gian chạy: 3 phút.

3.2. Quy trình xử lý mẫu huyết tương

Qua khảo sát, chúng tôi lựa chọn quy trình xử lý mẫu huyết tương bằng cột chiết pha rắn Oasis HLB 30 mg/1 ml như sau:

- Hút chính xác 250 µl huyết tương vào ống eppendorf 2 ml, thêm 50 µl IS nồng độ 500 ng/ml, lắc đều.

- Lắp cột chiết Oasis HLB 30 mg/1 ml lên hệ thống chiết. Hoạt hóa cột bằng 1 ml methanol, tiếp theo là 1 ml nước.

- Đưa huyết tương lên cột chiết.

- Rửa loại tạp bằng 1 ml nước và 1 ml methanol 50%.

- Rửa giải bằng 1 ml acetonitril chứa 0,5% acid formic.

- Li tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Hút dịch trong phía trên để định lượng.

3.3. Kết quả thẩm định phương pháp

- Tính tương thích của hệ thống:

Bảng 2. Kết quả đánh giá tính tương thích của hệ thống.

STT	PB		IS		Hệ số FPB/IS
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	
1	0,72	29.743	0,71	25.907	1,1481
2	0,71	29.691	0,71	25.759	1,1526
3	0,71	30.682	0,71	26.447	1,1601
4	0,72	30.175	0,71	26.401	1,1429
5	0,71	29.647	0,71	26.381	1,1238
6	0,72	29.192	0,71	26.059	1,1202
Trung bình	0,715	29.855,0	0,710	26.159,0	1,1413
RSD%	0,77	1,71	0,00	1,11	1,40

Tiêm lặp lại 6 lần cùng một dung dịch có chứa PB và IS trong huyết tương ở mức nồng độ 150 ng/ml (MQC) vào hệ thống sắc kí theo điều kiện đã chọn. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD% của thời gian lưu tR, diện tích pic, tỉ lệ đáp ứng giữa pic PB và pic IS. Kết quả thu được (bảng 2) cho thấy, pic của PB và IS tương đối cân xứng; RSD% của cả thời gian lưu, diện tích pic của PB và IS cũng như tỉ lệ đáp ứng giữa 2 pic đều nhỏ hơn 2%, chứng tỏ hệ thống phù hợp để định lượng PB trong huyết tương.

- Tính chọn lọc - đặc hiệu:

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp.

STT	SPB			SIS		
	Mẫu trắng	LLOQ	Tỉ lệ đáp ứng	Mẫu trắng	LLOQ*	Tỉ lệ đáp ứng
1	110	4733	43,0	66,2	45582	688,5
2	238	4632	19,5	74,5	38011	510,2
3	231	4404	19,1	45,8	42935	937,4
4	182	3525	19,4	48,8	35805	733,7
5	236	3151	13,3	53,2	35670	670,5
6	188	4089	21,7	39,4	39600	1005,1
Trung bình	197,5	4088,6	22,7	54,7	39600,1	757,6
<i>LLOQ: giới hạn định lượng dưới</i>						

Tiến hành phân tích trên 6 mẫu huyết tương trắng và 6 mẫu tự tạo có chứa chuẩn nội và chất phân tích ở nồng độ thấp nhất của đường chuẩn (nồng độ 10 ng/ml) trong nền huyết tương trắng. Ghi lại sắc đồ, đáp ứng pic và các thông số pic của các mẫu trắng và mẫu chuẩn. Kết quả thu được (bảng 3) cho thấy, trên sắc kí đồ của mẫu chuẩn pha trong huyết tương, các pic của PB và IS được xác định rõ ràng và không bị ảnh hưởng bởi các pic khác. Đáp ứng pic của từng mẫu ở giới hạn định lượng dưới (LLOQ) đều gấp trên 20 lần đáp ứng pic của mẫu trắng; tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS, đáp ứng pic của từng mẫu LLOQ lớn hơn trên 500 lần đáp ứng pic của mẫu trắng, chứng tỏ phương pháp có độ chọn lọc và độ đặc hiệu cao để định lượng PB trong huyết tương.

- Độ tuyến tính và khoảng xác định: bảng 4 (trang bên) cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ PB và tỉ lệ diện tích pic của PB/IS trong khoảng nồng độ từ 10-500 ng/ml, với hệ số tương quan $r = 0,9997$.

- Giới hạn định lượng dưới: phân tích trên 6 mẫu huyết tương trắng, 6 mẫu tự tạo có chứa IS và chất phân tích ở giới hạn định lượng dưới (10 ng/ml). Ghi lại sắc đồ và so sánh tỉ lệ đáp ứng pic của mẫu trắng và mẫu chuẩn. Kết quả cho thấy, nồng độ PB ở mức 10 ng/ml tính được từ đường chuẩn nằm trong khoảng từ 92,5-117,3% so với nồng độ lí thuyết có độ lệch chuẩn tương đối RSD = 8,25% đáp ứng yêu cầu về thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ tuyến tính và khoảng xác định.

Tỉ lệ	Lần	Nồng độ PB (ng/ml)					
		10	50	100	200	300	500
Tỉ lệ SPB/SIS	1	0,1039	0,4700	0,8152	1,7374	2,3268	3,8446
	2	0,1218	0,3986	0,7999	1,4972	2,6099	4,1338
	3	0,1025	0,3421	0,8058	1,6375	2,4392	4,0119
	4	0,0985	0,3423	0,8733	1,6886	2,4980	3,9444
	5	0,0883	0,3306	0,8796	1,6049	2,3621	3,8731
	Trung bình	0,1030	0,3767	0,8348	1,6331	2,4472	3,9616
Phương trình hồi quy			$y = 7,9367x + 0,025$				
Hệ số tương quan			$r = 0,9997$				

- Thẩm định độ đúng - độ chính xác trong ngày và khác ngày: thẩm định độ đúng và độ chính xác bằng cách thêm chuẩn vào các mẫu huyết tương trắng ở 3 mức nồng độ 25 ng/ml, 150 ng/ml và 400 ng/ml; mỗi nồng độ tiến hành lặp lại 5 lần. Kết quả cho thấy, độ đúng trong ngày của phương pháp nằm trong khoảng 94,49-112,17% với độ lệch chuẩn tương đối RSD% từ 3,19-6,98%; độ đúng khác ngày của phương pháp nằm trong khoảng từ 95,63-115,64% với độ lệch chuẩn tương đối RSD% từ 1,99-2,64% đáp ứng được yêu cầu về độ đúng và độ chính xác của một phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

- Tỉ lệ thu hồi (chỉ tiêu đánh giá khả năng tìm lại của chất phân tích và chuẩn nội sau quá trình chiết tách xử lí mẫu): xác định bằng cách so sánh kết quả đáp ứng của các mẫu có qua chiết tách với đáp ứng của các mẫu chuẩn không được xử lí qua chiết tách (mẫu pha trong acetonitril chứa 0,5% acid formic). Kết quả cho thấy độ thu hồi ở nồng độ 25 ng/ml của PB là 91,96-113,22% với RSD = 9,51%; của IS là 75,23-90,16% với RSD = 8,23%; độ thu hồi ở nồng độ 150 ng/ml của PB là 91,89-119,51% với RSD = 13,54%; của IS là 81,61-106,85% với RSD = 11,73%; độ thu hồi ở nồng độ 400 ng/ml của PB là 84,74-109,30% với RSD = 10,13%; của IS là 87,51-105,54% với RSD = 7,67%. Như vậy, độ thu hồi đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

- Độ ổn định: xác định độ ổn định của PB trong huyết tương sau 3 chu kì đông - rã đông; trong quá trình xử lí mẫu; trong quá trình bảo quản dài ngày và sau xử lí mẫu ở nồng độ 25 ng/ml, 400 ng/ml (ở mỗi nồng độ, xử lí 5 mẫu). Tính nồng độ của các mẫu dựa vào đường chuẩn. Kết quả cho thấy, nồng độ PB phân tích sau 3 chu kì đông - rã đông; phân tích sau khi rã đông rồi để ở nhiệt độ phòng 4 giờ; phân tích 25 giờ sau xử lí cũng như phân tích sau 45 ngày bảo quản ở nhiệt độ -30°C và phân tích ngay sau khi pha khác nhau. Kết quả phân tích mẫu ở nồng độ 25 ng/ml và 400 ng/ml khác biệt không có ý nghĩa thống kê,

với $p > 0,05$. Điều này chứng tỏ các mẫu phân tích ổn định trong khoảng thời gian nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng PB trong huyết tương thỏ bằng sắc kí lỏng khối phổ với điều kiện khối phổ và điều kiện sắc kí phù hợp. Phương pháp xử lí mẫu bằng cột Oasis HLB 30 mg/1 ml. Kết quả thẩm định thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao; khoảng tuyến tính rộng với nồng độ từ 10-500 ng/ml (hệ số tương quan $r = 0,9997$); độ đúng trong ngày của phương pháp nằm trong khoảng 94,49-112,17% với độ lệch chuẩn tương đối RSD% từ 3,19-6,98%; độ đúng khác ngày của phương pháp nằm trong khoảng 95,63-115,64% với độ lệch chuẩn tương đối RSD% từ 1,99-2,64% (đáp ứng được yêu cầu về độ đúng và độ chính xác của một phương pháp phân tích trong dịch sinh học). Giới hạn định lượng dưới của phương pháp là 10 ng/ml. Mẫu thử ổn định trong khoảng thời gian 45 ngày sau khi pha. Phương pháp này có thể ứng dụng trong đánh giá sinh khả dụng và thử tương đương sinh học của các chế phẩm chứa PB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Học viện Quân y (2002), *Độc học và Phóng xạ quân sự*, Bộ môn Độc học và phóng xạ quân sự, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, Hà Nội.
2. *British Pharmacopoeia 2014*.
3. FDA Food and Drug Administration (2018), *Bioanalytical method validation Guidance for industry*, U.S. Department of Health and Human Service, 8-25.
4. Semih Ötles, Canan Kartal (2016), "Solid-phase extraction (SPE): principles and applications in food samples", *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 15 (1), pp. 5-15.
5. The United States Pharmacopoeia 38 (2015). □