

Xây dựng phương pháp định lượng carboplatin trong thuốc tiêm đông khô carboplatin bằng HPLC

Phan Thị Mỹ Hoàng, Bành Thị Ngọc Quỳnh, Mai Tòng Ba, Lý Thị Mỹ Dung

Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định

Đề tài đã xây dựng được phương pháp định lượng carboplatin trong chế phẩm thuốc tiêm đông khô carboplatin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), dựa trên sự tham khảo các dược điển nước ngoài. Phương pháp này đã được thẩm định một cách đầy đủ và xác định được các điều kiện sắc ký thích hợp về: độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác.

Đây là một nội dung nghiên cứu trong dự án cấp nhà nước giai đoạn 2011-2015, mã số KC10.DA04/11-15: "Hoàn thiện quy trình sản xuất thuốc tiêm đông khô carboplatin để điều trị ung thư", do Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định chủ trì.

Từ khóa: carboplatin, sắc ký lỏng hiệu năng cao, thuốc tiêm đông khô.

Chỉ số phân loại 3.4

CARBOPLATIN MEASURING METHOD IN FREEZE-DRIED CARBOPLATIN INJECTION DRUG BY HPLC

Summary

The high performance liquid chromatography (HPLC) is a fast, sensitive and accurate method to measure carboplatin in injection drug. Therefore, the authors have made a carboplatin measuring method in freeze-dried carboplatin 50 mg and 150 mg injection drugs with liquid chromatographic conditions as follows: UV detector at 230 nm wave length; column: RP 18 (250x4.6 mm; 5 μ m); mobile phase: water: acetonitrile (20:80); flow rate: 1ml/min. This method has been evaluated to meet requirements of linear range: linearity range at 0.4-1.4 ppm ($R^2 = 0.9999$); the detecting limit: 2.012 μ g/ml; the quantitation limit: 6.099 μ g/ml; precision: RSD = 0.96%; accuracy (recovery rate): 100.67%, RSD = 0.21%.

Keywords: carboplatin, freeze-dried, HPLC.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Hiện nay, căn bệnh ung thư ngày càng gia tăng mạnh mẽ trong khi giá thành của những loại thuốc điều trị ung thư lại rất cao, đặc biệt là các thuốc nhập khẩu. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất thuốc tiêm đông khô carboplatin dùng điều trị ung thư là một nhiệm vụ cấp thiết nhằm giảm phần nào gánh nặng chi phí điều trị cho cả bệnh nhân và xã hội. Để đánh giá được chất lượng của sản phẩm trong suốt quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng carboplatin trong chế phẩm đông khô bằng các trang thiết bị hiện có của Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định dựa trên sự tham khảo các dược điển nước ngoài.

Phương pháp HPLC ra đời năm 1967-1968 trên cơ sở phát triển và cải tiến từ phương pháp sắc ký cột cổ điển. HPLC là một phương pháp chia tách trong đó pha động là chất lỏng và pha tĩnh chứa trong cột là chất rắn đã được phân chia dưới dạng tiểu phân hoặc một chất lỏng phủ lên một chất mang rắn, hay một chất mang đã được biến bằng liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ. Phương pháp này được sử dụng ngày càng rộng rãi và phổ biến vì nhiều ưu điểm: thời gian phân tích nhanh, độ phân giải tốt, độ nhạy cao, chính xác và kết quả phân tích ít phụ thuộc vào các thao tác kỹ thuật nên tránh được sai số. Do có độ nhạy cao nên HPLC được áp dụng để tách các chất có hàm lượng nhỏ trong các thuốc đa thành phần. Có thể áp dụng cho nhiều chất: hợp chất cao phân tử và các ion thuộc các đối tượng nghiên cứu y, sinh học, các chất không bền trong tự nhiên, kém bền ở nhiệt độ cao, ví dụ: nucleosid, nucleotid, acid nucleic, các acid amin, protein carbohydrat, vitamin, kháng sinh, chất màu... Bên cạnh đó, cột sắc ký có thể sử dụng được nhiều lần mà không phải tái sinh, mẫu phân tích có thể thu lại được vì đa số các detector không phân hủy mẫu. Chính vì vậy, chúng tôi chọn phương pháp này để định lượng carboplatin trong chế phẩm thuốc tiêm đông khô carboplatin.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Thuốc tiêm đông khô carboplatin 50 mg và 150 mg do Công ty Cổ phần Dược - Trang thiết bị y tế Bình Định nghiên cứu sản xuất.

Phương pháp nghiên cứu

Xây dựng phương pháp định lượng bằng HPLC.

+ *Thiết bị:*

- Hệ thống sắc ký lỏng HITACHI D-7000 với đầu dò UV-VIS, cột RP 18 (250x4,6 mm; 5 μ m).

- Cân điện tử 5 số lẻ Satorius, máy siêu âm Ultrasonik.

- Các dụng cụ thủy tinh chính xác.

+ *Thuốc thử:*

- Acetonitril dùng cho HPLC.

- Dung dịch đối chiếu: carboplatin đối chiếu trong nước.

- Nước cất.

+ *Điều kiện sắc ký:*

Cột RP 18 (250x 4,6 mm; 5 μ m).

Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

Detector UV: 230 nm.

Pha động: nước - Acetonitrile (20: 80), điều chỉnh nếu cần.

Thể tích tiêm: 10 μ l.

+ *Quy trình nghiên cứu:*

- Tính tương thích của hệ thống.

- Thành lập đường cong chuẩn độ xác định khoảng tuyến tính.

- Xác định các giá trị sau đây của phương pháp: giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác.

Kết quả

Chuẩn bị dung dịch chuẩn và thử:

- Dung dịch chuẩn: hòa tan một lượng carboplatin chuẩn trong nước để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

- Dung dịch thử: hòa tan 1 lọ bột đông khô carboplatin đối chiếu trong nước để được dung dịch có nồng độ 1 mg/ml.

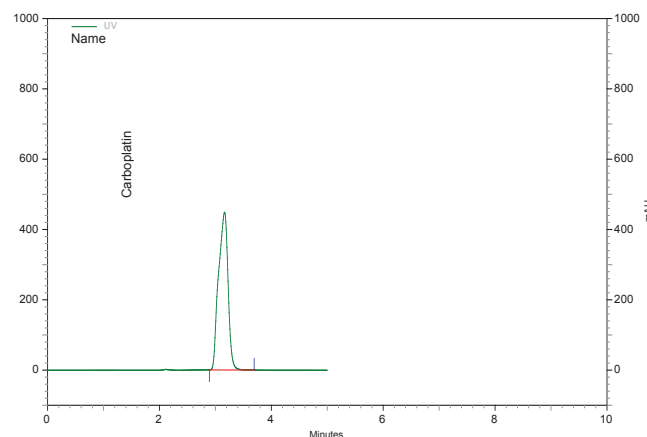
Tính tương thích của hệ thống

Trong điều kiện thí nghiệm, tính tương thích hệ thống khi các thông số sắc ký trong cả hai mẫu: mẫu chuẩn và mẫu thử có $RSD \leq 2\%$ được ghi ở bảng 1.

Bảng 1: các thông số sắc ký trong mẫu chuẩn và mẫu thử

	Thời gian lưu	Diện tích đỉnh	Số đĩa lý thuyết	Hệ số bất đối	Hệ số dung lượng
RSD (%) Mẫu chuẩn	0,31	0,21	1,22	0,53	0,44
RSD (%) Mẫu thử	0,26	0,86	1,10	0,50	0,31

Kết quả lựa chọn pha động cho thấy, trong 5 pha động thì pha động 5 cho các giá trị thông số sắc ký đạt yêu cầu quy định của một quy trình định lượng bằng phương pháp HPLC (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1: pic đồ pha động 5

Tiếp tục tiến hành thẩm định phương pháp định lượng carboplatin với các nội dung: khoảng tuyến tính; xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng; độ đúng; độ chính xác.

Thành lập đường cong chuẩn độ xác định khoảng tuyến tính

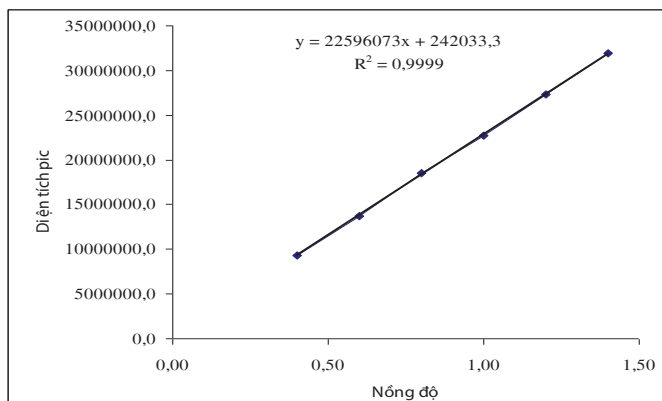
Độ tuyến tính của một phương pháp phân tích là sự phụ thuộc tuyến tính giữa đại lượng đo được (Y) với nồng độ chất phân tích (X) trong một khoảng xác định. Nó được biểu thị bằng

phương trình hồi quy $\hat{Y} = aX + b$ và hệ số tương quan tuyến tính R^2 .

Tiến hành: chuẩn bị dãy mẫu chuẩn carboplatin với các nồng độ từ 0,4 đến 1,4 μ g trong 1 ml chế phẩm (3 lần cho mỗi nồng độ dung dịch).

Bảng 2: tương quan giữa nồng độ và diện tích pic trung bình của dãy mẫu chuẩn carboplatin

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic	Diện tích pic (TB)	Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic	Diện tích pic (TB)
0,4	9294692	9283007,7	1	22689115	22757047
	9285857			22682887	
	9268474			22899139	
0,6	13582221	13709144	1,2	27683398	27332370
	13763266			27143079	
	13781946			27170634	
0,8	18487660	18497719	1,4	31887119	31891710
	18556432			31885352	
	18449066			31902659	



Biểu đồ 2: tương quan giữa nồng độ và diện tích pic trung bình của dãy mẫu chuẩn carboplatin

Nhận xét: $R^2 = 0,9999$. Vậy phương pháp đạt sự tuyến tính rất tốt.

Độ chính xác

Tiến hành: chuẩn bị 6 mẫu thử riêng biệt khác nhau. Chạy sắc ký cho mỗi mẫu thử để xác định độ lệch chuẩn tương đối.

Yêu cầu: phương pháp có độ lặp lại khi tính giá trị thống kê diện tích pic thu được trên 6 mẫu có $RSD \leq 2\%$.

Bảng 3: kết quả diện tích pic của 6 mẫu carboplatin với nồng độ 1 mg/ml

STT	Diện tích pic của 6 mẫu carboplatin với nồng độ 1 mg/ml	Thống kê
1	20836471	$S_{\text{tb}} = 20988471$ $RSD = 0,96\% < 2\%$
2	21190129	
3	20750023	
4	21164360	
5	20832452	
6	21157389	

Nhận xét: RSD của 6 lần tiến hành sắc ký trên 6 mẫu nhỏ hơn 2%. Vậy phương pháp đạt độ chính xác.

Độ đúng

Tiến hành: thêm vào mẫu thử một lượng chất chuẩn (khoảng 10%, 20%, 30%) so với lượng hoạt chất có sẵn (1 mg/ml), sao cho mỗi hoạt chất trong dung dịch không nằm ngoài khoảng tuyến tính đã khảo sát. Sau đó tiến hành định lượng theo phương pháp phân tích cân thẩm định (mỗi nồng độ ít nhất 3 lần lặp lại).

Yêu cầu: phương pháp đạt độ đúng khi tỷ lệ phục hồi thực nghiệm nằm trong giới hạn cho phép của tỷ lệ phục hồi lý thuyết (98-102%).

Bảng 4: kết quả tỷ lệ phục hồi khi thêm chuẩn

Tỷ lệ chất chuẩn thêm vào (%)	Lượng chất chuẩn thêm vào (mg)	Lượng tìm thấy (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Kết quả thống kê
10	5,9	5,96	101,01	- Tỷ lệ phục hồi trung bình: 100,67% - RSD: 0,21%
	5,9	5,94	100,67	
	5,9	5,95	100,84	
20	11,2	11,32	101,07	
	11,2	11,27	100,63	
	11,2	11,26	100,54	
30	15,0	15,10	100,67	
	15,0	15,04	100,27	
	15,0	15,05	100,34	

Nhận xét: tỷ lệ phục hồi thực nghiệm (100,67%) nằm trong giới hạn cho phép của tỷ lệ phục hồi lý thuyết (98-102%). Vậy phương pháp đạt được độ đúng.

Giới hạn phát hiện

Giới hạn phát hiện tính theo công thức:

$$D = 3,3 \times \frac{S}{B}$$

trong đó: B là độ dốc; S là độ lệch chuẩn của phương trình hồi quy.

Vậy nồng độ giới hạn phát hiện tính chính xác hơn:

$$D = 3,3 * S/B = 3,3 * 13626,92/22596073 = 2,012 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Giới hạn định lượng

Cách xác định: tiến hành xác định nồng độ tương ứng của chất cần thử có tín hiệu đo được gấp 10 lần tín hiệu đường nền.

Theo Dược điển Anh (2001), Dược điển Nhật Bản (2001) trong phương pháp sắc ký, độ nhiễu của đường nền có thể thay cho tín hiệu mẫu trắng và giới hạn định lượng phải cho $RSD < 10\%$.

$$Q = 10H_{\max} \times F \quad \text{hoặc} \quad Q = 10 \times \frac{S}{B}$$

trong đó: Q là giới hạn định lượng.

$$Q = 10 \times S/B = 10 \times 13626,92/22596073 = 6,099 \text{ } \mu\text{g/ml.}$$

Kết luận

Phương pháp định lượng carboplatin trong thuốc tiêm đông khô carboplatin 50 mg và 150 mg bằng HPLC đã xác định được các điều kiện sắc ký thích hợp. Phương pháp này đã được thẩm định một cách đầy đủ về: độ tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác.

Hy vọng, phương pháp này sẽ cung cấp một công cụ hữu ích giúp cho các cơ sở sản xuất, điều

trị, các cơ quan kiểm tra chất lượng đánh giá chính xác hiệu quả những sản phẩm này.

Tài liệu tham khảo

1. Dược điển Việt Nam IV, Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
2. Jonathan M. Stoddard, Lien Nguyen, Hector Mata-Chavez and Kelly Nguyen (2007), "TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions", *Chem Commun*, pp 1240-1241.
3. "Thẩm định phương pháp phân tích trong nghiên cứu và kiểm nghiệm thuốc" (2005), *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Bộ Y tế, **số 3/tập 3**, tr. 25-29.
4. The British Pharmacopoeia (2007).
5. Nguyễn Đức Tuấn (2005), *HPLC*, Bộ môn Phân tích - Kiểm nghiệm, Khoa Dược - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, tr. 10-18.
6. USP 26.