

## QUANTIFICATION OF ITOPRIDE IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLE WITH FLUORESCENCE DETECTOR

TRUONG THI THUY<sup>1</sup>, HOANG VAN DUC<sup>1</sup>, LE THI LA<sup>1</sup>, TRAN HOANG<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>National Institute of Drug Quality Control.

✉Corresponding author: tranhoangds@yahoo.com

Received December 21<sup>st</sup>, 2022

Accepted May 15<sup>th</sup>, 2023

**Abstract:** A new method was developed for determination of itopride in human plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (excitation at 265 nm and emission at 344 nm). The method employed one-step extraction of itopride from human plasma with tert-butyl methyl ether using alfuzosin hydrochloride as an internal standard. Chromatographic separation was obtained within 10 min using a reverse phase column (C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and an isocratic mobile phase constituting of acetonitrile, tetrahydrofuran and pH 3.5 buffer (suitable ratio) at a flowrate of 1.2 ml/min. The method was linear in the range of 5 to 1000 ng/ml. The lower limit of quantitation was 5 ng/ml. The intra and inter-day accuracy were within between 86.2 % and 108.5 %. Plasma sample containing itopride were stable for 100 days at -35 °C and for 6 hours at room temperature. This method can be used for BA-BE studies of itopride preparations.

**Keywords:** Itoprid, Bioequivalence, HPLC-RF

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ITOPRID TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC VỚI DETECTOR HUỖNH QUANG

TRƯƠNG THỊ THỦY<sup>1</sup>, HOÀNG VĂN ĐỨC<sup>1</sup>, LÊ THỊ LA<sup>1</sup>, TRẦN HOÀNG<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương

✉Tác giả liên hệ: tranhoangds@yahoo

Nhận bài ngày 21 tháng 12 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 15 tháng 5 năm 2023

**Tóm tắt:** Một phương pháp mới đã được xây dựng để định lượng itoprid trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPCL) với detector huỳnh quang (bước sóng kích thích 265 nm và bước sóng phát xạ 344 nm). Phương pháp này sử dụng chiết xuất một bước, itoprid được tách khỏi huyết tương người, loại protein bằng dung môi tert-butyl methyl ether; sử dụng alfuzosin hydrochlorid làm chất chuẩn nội. Việc phân tách sắc ký thu được trong 10 phút, sử dụng cột pha đảo (C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μm), pha động đẳng dòng gồm acetonitril, tetrahydrofuran và đệm pH 3,5 (với tỷ lệ thích hợp), tốc độ dòng 1,2 ml/phút. Khoảng tuyến tính xác định được từ 5 ng/ml đến 1000 ng/ml. Giới hạn định lượng dưới là 5 ng/ml. Độ chính xác trong ngày và giữa các ngày nằm trong khoảng 86,2 % đến 108,5 %. Độ ổn định mẫu huyết tương chứa itoprid là 100 ngày ở -35 °C và 6 giờ ở nhiệt độ phòng. Phương pháp này có thể được áp dụng để xác định nồng độ itoprid trong huyết tương người trong các nghiên cứu BA-BE các chế phẩm chứa itoprid.

**Từ khóa:** Itoprid, tương đương sinh học, HPLC-RF

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Itoprid hydroclorid là một dẫn xuất benzamid. Thuốc chỉ định trong những triệu chứng về dạ dày-ruột gây ra bởi viêm dạ dày mạn (cảm giác đầy chướng bụng, chán ăn, ợ nóng, buồn nôn và nôn). Itoprid hydroclorid làm tăng sự giải phóng acetylcholin do tác dụng đối kháng với thụ thể  $D_2$  dopamin, và ức chế sự phân hủy acetylcholin esterase, dẫn đến làm tăng nhu động dạ dày-ruột [1].

Itoprid hydroclorid hấp thu nhanh và hầu như hoàn toàn ở đường tiêu hóa. Sau khi uống itoprid hydroclorid với mức liều 50 mg, nồng độ đỉnh trong huyết tương đạt được trong vòng 30 đến 40 phút, nồng độ tối đa trong huyết tương người khoảng 0,28  $\mu\text{g/ml}$  [1]. Do nồng độ của itoprid thấp nên việc xác định nồng độ thuốc trong huyết tương người đòi hỏi phải có phương pháp chiết tách phù hợp và phương pháp phân tích có độ nhạy cao.

Dựa trên các trang thiết bị hiện có, đặc tính của chất phân tích và tham khảo một số phương pháp phân tích đã được các tác giả công bố [2], [3], [4] đồng thời áp dụng các nguyên lý của phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao, chúng tôi đã tiến hành xây dựng được phương pháp HPLC-RF có đủ độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chính xác để định lượng itoprid trong các mẫu huyết tương người nhằm đáp ứng nhu cầu đánh giá tương đương sinh học các chế phẩm chứa itoprid.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, chất chuẩn

#### 2.1.1. Thiết bị, dụng cụ phân tích

Tất cả các thiết bị được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC 17025 và GLP, bao gồm: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-2030C Plus với detector huỳnh quang RF -20A (Nhật Bản); Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác  $d = 0,01$  mg); Tủ lạnh sâu  $-35^\circ\text{C}$  (Panasonic - Nhật Bản); Máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16KS - Đức); Micropipet eppendorf; Máy đo pH Metrohm và các thiết bị khác như: Máy cô bốc hơi dung môi dùng khí nitơ; máy lắc cơ học; máy lọc nước siêu sạch...

Các dụng cụ: bình định mức, ống chiết thủy tinh, pipet thủy tinh... đạt tiêu chuẩn loại A.

#### 2.1.2. Dung môi, hóa chất

Acetonitril, methanol và tetrahydrofuran loại dùng cho HPLC được cung cấp bởi Merck-Đức; Tert-butyl methyl ether loại PA (Fisher scientific); Acid pecloric 70-72 % (Merck-Đức); và nước RO (Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương).

#### 2.1.3. Chất chuẩn:

Các chất chuẩn gồm Itoprid hydroclorid được cung cấp từ Sigma-Aldrich, số lô: 0000111297, hàm lượng 99,9 % tính theo nguyên trạng và Alfuzosin hydroclorid, chất chuẩn Dược điển của Anh, số lô: 2994, hàm lượng 99,6 % tính theo nguyên trạng. Alfuzosin hydroclorid được sử dụng làm chất chuẩn nội (IS) của itoprid trong phương pháp phân tích.

### 2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu huyết tương (HT) trắng: không có itoprid do Viện huyết học truyền máu Trung ương và Bệnh viện Trung ương quân đội 108 cung cấp. Từ huyết tương trắng chuẩn bị các mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn itoprid.

#### 2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Dựa trên các tài liệu tham khảo, tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký để lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu. Việc xây dựng quy trình xử lý mẫu còn dựa trên đặc tính của chất phân tích.

##### 2.2.2.1. Quy trình phân tích

\* Điều kiện sắc ký

Hệ thống HPLC với detector huỳnh quang có bước sóng kích thích ( $E_x$ ) = 265 nm, bước sóng phát xạ ( $E_m$ ) = 344 nm. Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo Phenomenex RP-18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) với nhiệt độ cột được duy trì ở  $40^\circ\text{C}$ . Sử dụng pha động là hỗn hợp acetonitril – pha động B với tỷ lệ 23 : 77 (tt/tt) trong đó pha động B là hỗn hợp đệm pH 3,5 – tetrahydrofuran với tỷ lệ 1000 : 12,5 (tt/tt). Đệm pH 3,5 được chuẩn bị từ acid perclorid 0,5 % trong nước đã được xử lý qua máy lọc nước siêu sạch (Millipore, Pháp) và chỉnh pH về 3,5 bằng natri hydroxyd 2 M. Nhiệt độ buồng tiêm mẫu được đặt ở nhiệt độ phòng. Dung dịch mẫu (50  $\mu\text{l}$ ) được tiêm vào hệ thống với tốc độ dòng không đổi 1,2 ml/phút.

\* Phương pháp chuẩn bị mẫu

*Dung dịch chuẩn gốc:* chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc trong methanol có nồng độ itoprid (ITO) khoảng 500  $\mu\text{g/ml}$  và dung dịch chuẩn nội (IS) gốc trong hỗn hợp methanol - natri hydroxyd 2 M tỷ lệ 500 : 3 (v/v) có nồng độ alfuzosin khoảng 500  $\mu\text{g/ml}$ .

*Dung dịch chuẩn nội làm việc:* từ dung dịch chuẩn nội gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn IS làm việc trong hỗn hợp methanol - natri hydroxyd 2 M tỷ lệ 500 : 3 (v/v) có nồng độ alfuzosin khoảng 7,5  $\mu\text{g/ml}$ .

*Dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương:* từ dung dịch chuẩn gốc ITO, chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm

việc trong huyết tương có nồng độ ITO lần lượt là 1000 ng/ml và 100 ng/ml.

**Đường chuẩn và mẫu QC:** Từ các dung dịch chuẩn làm việc trong huyết tương, pha loãng với huyết tương trắng để thu được các mẫu đường chuẩn có nồng độ ITO như sau: 5; 10; 30; 100; 250; 500; 800; 1000 ng/ml. Các mẫu LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa ITO có nồng độ tương ứng lần lượt là 5; 15; 400 và 700 ng/ml.

**\* Phương pháp xử lý mẫu**

Mẫu huyết tương để ráo đông ở nhiệt độ phòng. Lấy 500  $\mu$ l HT, thêm 50  $\mu$ l dung dịch chuẩn nội làm việc (từ mẫu blank). Thêm 3,5 ml tert-butyl methyl ether, lắc cơ học ngang 5 phút. Ly tâm 3000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 2 ml lớp dung môi phía trên, bốc hơi dưới dòng khí nitơ ở 40 °C, thu được cặn. Hòa tan cặn trong 0,7 ml pha động. Tiêm sắc ký.

**\* Phương pháp tính kết quả**

Xác định nồng độ ITO có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic tương ứng ITO/IS thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện.

### 2.2.2.2. Thẩm định quy trình

Tiến hành thẩm định phương pháp theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA với các chỉ tiêu: độ đặc hiệu-chọn lọc, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ đúng-độ chính xác, tỷ lệ thu hồi, độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương... [5], [6].

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

Itoprid có một số tính chất hóa lý như: có tính chất base, hệ số phân bố ( $\log P = 2,4$ ), hằng số phân ly  $pK_a = 8,77$ .

Đặc điểm của quá trình định lượng mẫu sinh học bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như: lượng mẫu ít; chất phân tích có giới hạn định lượng tương đối nhỏ; huyết tương người có nhiều thành phần phức tạp: protein, lipid, phospholipid, các chất nội sinh, chất chuyển hóa...; sự khác nhau giữa các cá thể... Vì vậy phương pháp phân tích phải được thiết lập tối ưu nhất và thẩm định để đảm bảo độ tin cậy.

#### 3.1.1. Tối ưu điều kiện sắc ký

Dựa vào các tài liệu tham khảo nhận thấy khoảng  $C_{max}$  của hoạt chất trong máu thấp. Theo hướng dẫn của EMA, yêu cầu giới hạn định lượng của ITO bằng khoảng 1/20  $C_{max}$ , phương pháp HPLC sử dụng detector DAD không đáp ứng được yêu cầu. Các phương pháp sử dụng trên

thiết bị sắc ký lỏng ghép khối phổ (LCMS) có chi phí cao hơn, yêu cầu vận hành phức tạp. Vì vậy chúng tôi đã khảo sát, xây dựng phương pháp định lượng trên thiết bị HPLC, detector huỳnh quang (RF) vẫn giúp phát hiện được giới hạn định lượng dưới thấp với chi phí thấp.

Chúng tôi đã khảo sát về cột sắc ký, tỉ lệ pha động, tốc độ dòng, bước sóng, nồng độ chất phân tích và lựa chọn được điều kiện sắc ký tối ưu đã trình bày trong “2.2.2.1. Điều kiện sắc ký”.

Với điều kiện sắc ký này chất phân tích ITO và chuẩn nội tách rõ ràng trên sắc ký đồ; thời gian lưu của các pic ổn định, hợp lý, không bị trôi.

#### 3.1.2. Lựa chọn chuẩn nội (IS)

Việc sử dụng chất chuẩn nội giúp hạn chế được sai số do máy móc và kĩ thuật gây ra.

Nhóm nghiên cứu đã dựa vào các tài liệu tham khảo và thực nghiệm để lựa chọn khảo sát trên một số các IS như: metoprolol, ofloxacin, levofloxacin, etoricoxib, atenolol, alfuzosin... Tuy nhiên chỉ có alfuzosin với các tính chất khá tương đồng với itoprid (có tính chất base, hằng số phân ly  $pK_a = 8,13$ ; hệ số phân bố  $\log P = 1,4$ ) là cho kết quả phù hợp làm chuẩn nội. Kết quả thu được trên sắc đồ cho thấy đáp ứng pic alfuzosin tương đối cao, thời gian lưu hợp lý, tách rõ ràng với pic chuẩn. Các chất còn lại không phát hiện được pic hoặc pic xấu hoặc trong cùng khoảng bước sóng với itoprid cho đáp ứng pic thấp.

#### 3.1.3. Lựa chọn phương pháp xử lý mẫu

Có 3 phương pháp xử lý mẫu huyết tương thông dụng nhất bao gồm: tủa protein, chiết lỏng – lỏng, chiết pha rắn. Kết quả khảo sát cho thấy:

Phương pháp tủa protein tuy đơn giản nhưng nền mẫu sau xử lý không được sạch, còn nhiều tạp, gây khó khăn cho việc tách các chất đồng thời gây bẩn cột, mẫu bị pha loãng nhiều nên giới hạn định lượng thường lớn.

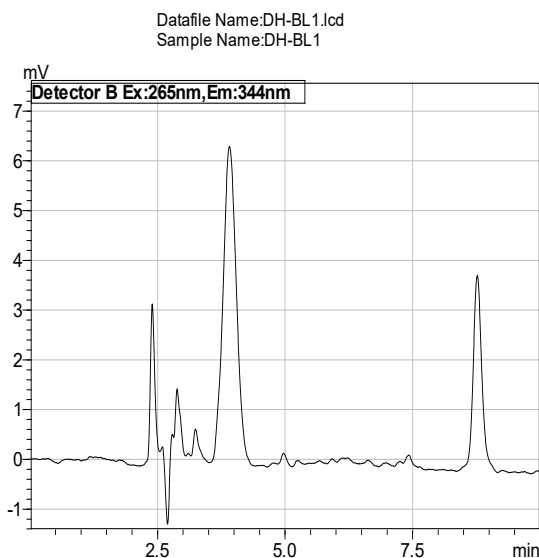
Phương pháp chiết pha rắn khá phức tạp, chi phí cao.

Phương pháp chiết lỏng – lỏng với các dung môi khác nhau như: tert-butyl methyl ether, chloroform, hỗn hợp dung môi diethyl ether-chloroform với các tỷ lệ khác nhau... Kết quả khảo sát cho thấy đối với hỗn hợp dung môi chiết như diethyl ether-chloroform, chloroform, mẫu sau chiết có nhiều tạp. Phương pháp chiết lỏng – lỏng với tert-butyl methyl ether và hòa tan cặn trong pha động cho thấy các chất phân tích đều được thu hồi với tỷ lệ tương đối cao và ổn định, nền mẫu sạch. Ngoài ra tert-butyl methyl ether là dung môi cho nhiều ưu điểm: các bước xử lý mẫu đơn giản; thời gian bốc hơi dung môi nhanh và là dung môi ít gây độc hại hơn các dung môi khác.

### 3.2. Thẩm định quy trình phân tích

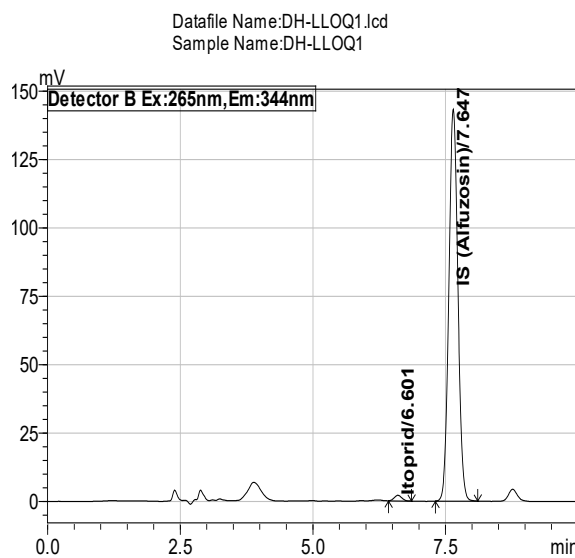
#### 3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng từ sáu lô có nguồn gốc khác nhau; các mẫu HT tự tạo có chứa ITO ở nồng độ 5 ng/ml và IS theo phương pháp đã xây dựng, ghi lại sắc ký đồ (SKĐ) (Hình 1 và 2).



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng

Trên SKĐ của mẫu HT trắng (Hình 1), tại thời điểm 6,6 phút và 7,6 phút trùng với thời gian lưu của ITO và IS trong mẫu chuẩn (Hình 2) không xuất hiện các pic. Trên SKĐ của mẫu chuẩn ở nồng độ LLOQ (5 ng/ml) (Hình 2), pic của ITO và IS cân đối, được nhận diện rõ ràng. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với ITO và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc theo dịch sinh học [5], [6].



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn ITO (5 ng/ml) và chuẩn nội

#### 3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Khảo sát trên 5 đường chuẩn riêng biệt, mỗi đường chuẩn có 8 mẫu chuẩn trong huyết tương với khoảng nồng độ ITO từ 5 ng/ml đến 1000 ng/ml. Chuẩn bị các mẫu chuẩn như đã trình bày trong mục “2.2.2.2. Phương pháp chuẩn bị mẫu”. Phân tích các mẫu đường chuẩn

theo phương pháp xử lý mẫu. Ghi lại sắc ký đồ. Xác định sự tương quan giữa nồng độ ITO có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng ITO/IS bằng phương pháp hồi quy tuyến tính  $y = ax + b$ , sử dụng hệ số tỷ trọng  $1/(\text{nồng độ})^2$ .

Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

STT	Phương trình hồi quy* ( $y = ax + b$ )	Hệ số tương quan (r)
Đường chuẩn 1	$y = 0,0018 x - 0,0001$	0,9999
Đường chuẩn 2	$y = 0,0019 x - 0,0012$	0,9999
Đường chuẩn 3	$y = 0,0019 x + 0,00001$	0,9995
Đường chuẩn 4	$y = 0,0019 x - 0,0002$	0,9996
Đường chuẩn 5	$y = 0,0018 x + 0,0008$	0,9993

(\* Ghi chú: x là nồng độ ITO (ng/mL) có trong mẫu; y là tỷ lệ diện tích pic ITO/IS

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ từ 5 ng/ml đến 1000 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ ITO và tỷ lệ diện tích pic tương ứng ITO/IS với hệ số tương quan xấp xỉ 1. Nồng độ ITO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết nằm trong giới hạn cho phép (80 % - 120 % đối với nồng độ thấp nhất, 85 % - 115 % đối với các nồng độ còn lại) theo qui định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5], [6].

### 3.2.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và mẫu HT chứa ITO với nồng độ khoảng 5 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ ITO có trong các mẫu LLOQ từ các đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả xác định giá trị LLOQ

Ngày	1	2	3
Đáp ứng mẫu Zero (n = 1)	0	0	0
Đáp ứng trung bình mẫu LLOQ (n = 6)	17223	18414	22541
Độ đúng (%) (n = 6)	86,2	97,9	108,5
CV (%) (n = 6)	3,7	3,4	7,0
Độ đúng (%) (n = 18)	97,5		
CV (%) (n = 18)	10,9		

Kết quả thẩm định cho thấy trong các mẫu trắng thêm chuẩn nội không xuất hiện pic tạp có cùng thời gian lưu của pic ITO trong các mẫu LLOQ; tỷ lệ giữa nồng độ ITO xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết có trong các mẫu nằm trong khoảng 86,2 % - 108,5 % (trung bình = 97,5 % và CV = 10,9 %) đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5], [6].

### 3.2.4. Xác định độ đúng, độ chính xác của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ chính xác trên 4 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Xác định nồng độ ITO có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày

Độ đúng, Độ chính xác	LLOQ (5 ng/ml)		LQC (15 ng/ml)		MQC (400 ng/ml)		HQC (700 ng/ml)	
	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%	Độ đúng (%)	CV%
Ngày 1 (n = 6)	86,2	3,7	103,2	4,1	104,0	1,6	102,9	2,1
Ngày 2 (n = 6)	97,9	3,4	99,7	1,4	100,9	1,8	97,7	1,0
Ngày 3 (n = 6)	108,5	7,6	101,7	2,8	102,8	1,9	99,8	0,9
Khác ngày (n = 18)	97,5	10,9	101,5	3,2	102,6	2,1	100,1	2,6

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày trong khoảng từ 86,2 % – 108,5 %; độ chính xác trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15 %; đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ chính xác của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA và EMA [5], [6].

### 3.2.5. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Đánh giá độ ổn định của ITO trong HT bằng cách so sánh nồng độ ITO có trong mẫu được bảo quản ở những điều kiện khác nhau trong quá trình phân tích mẫu với nồng độ pha thực tế. Tiến hành đánh giá độ ổn định của mẫu HT ở hai mức nồng độ LQC và HQC. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của ITO trong huyết tương ở cả hai khoảng nồng độ thấp và cao được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của ITO trong huyết tương**

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	% độ ổn định	CV%
Sau 5 chu kỳ đông – rã đông	LQC	14,4	96,2	1,3
	HQC	649,3	92,7	1,8
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	14,5	96,8	1,1
	HQC	647,1	92,4	2,6
Độ ổn định trong autosampler (143 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	15,8	105,2	3,3
	HQC	704,0	100,5	2,5
Độ ổn định thời gian dài (100 ngày; -35°C)	LQC	13,6	90,9	4,2
	HQC	667,7	95,3	1,0

Kết quả thẩm định cho thấy độ ổn định của ITO trong huyết tương tại các điều kiện bảo quản khác nhau (sau 5 chu kỳ đông – rã đông; bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 6 giờ; bảo quản trong autosampler sau 143 giờ và bảo quản ở - 35 °C sau 100 ngày) đáp ứng các yêu cầu về độ ổn định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [5], [6].

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng itoprid trong huyết tương người bằng HPLC kết

nối detector huỳnh quang. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có giới hạn định lượng dưới thấp (5 ng/mL); khoảng tuyến tính rộng (5 ng/mL đến 1000 ng/mL); độ đúng đạt từ 86,2 % – 108,5 %; độ chính xác với giá trị CV < 15 %, phương pháp xử lý mẫu nhanh, đơn giản, đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của EMA và US-FDA. Phương pháp đã thẩm định có thể được ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học chế phẩm chứa hoạt chất itoprid.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y Tế - Cục Quản Lý Dược Việt Nam, *Elthon 50mg*, Cục Quản Lý Dược: Drugbank.vn.
- Lee H.-W., J.-H. Seo, S.-K. Choi, and K.-T. Lee (2007), Determination of itopride in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study, *Analytica chimica acta*, 583 (1), pp. 118-123.
- Ma J, Yuan LH, Ding MJ, Zhang J, Zhang Q, Xu QW, Zhou XM (2009), Determination of itopride hydrochloride in human plasma by RP-HPLC with fluorescence detection and its use in bioequivalence study, *Pharmacological research*, 59 (3), pp. 189-193.
- Singh S.S., M. Jain, K. Sharma, B. Shah, M. Vyas, P. Thakkar, R. Shah, S. Singh, and B. Lohray (2005), Quantitation of itopride in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and its application to a bioequivalence study, *Journal of Chromatography B*, 818 (2), pp. 213-220.
- European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012), *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*.
- U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (2018), *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*.