

Determination of leuprolide in dog serum using LC-MS/MS

Phan Thi Nghia^{2*}, Hoang Van Duc², Nguyen Thanh Lam¹, Tran Thi Hai Yen¹

¹Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi

²National Institute of Drug Quality Control, 48 Hai Ba Trung, Hoan Kiem, Hanoi

*Corresponding author: Tran Thi Hai Yen, email: yentth@hupedu.vn

ABSTRACT

Studying leuprolide pharmacokinetics using the LC-MS/MS technique to overcome selective and sensitive detection. This study aimed to develop and validate a high throughput and specific method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine leuprolide in dog serum. Leuprolide and internal standard (paracetamol) were prepared from dog serum using protein precipitation followed by liquid-liquid extraction. The prepared samples were chromatographed on a C₁₈ column (50 x 2.1mm, i.d., 1.7 μm) with isocratic elution at a flow rate of 0.2 ml/min using acetonitrile - a solution containing 10mM ammonium bicarbonate at suitable ratio. The ion transitions at m/z 605.4 → 249.1 (leuprolide) and m/z 152 → 110 (paracetamol) were monitored under the positive ion mode of electrospray ionization with multiple reaction monitoring. The standard curves were linear in the range of 0.05 to 50 ng/ml for Leuprolide with a mean correlation coefficient greater than 0.99. The intra-day and inter-day precision and accuracy were within 93.9% - 119.1% with CV ≤ 10%. The assay was applied to determine concentrations of leuprolide in dog serum in pharmacokinetic and bioavailability studies.

Keywords: dog serum, mass spectrometry, leuprolide, LC-MS/MS, protein precipitation.



Xây dựng phương pháp định lượng leuprolid trong huyết thanh chó bằng Phương pháp LC-MS/MS

Phan Thị Nghĩa^{2*}, Hoàng Văn Đức², Nguyễn Thành Lâm¹, Trần Thị Hải Yến¹

¹Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội

²Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, 48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội

* Tác giả liên hệ: Trần Thị Hải Yến, email: yentth@hupedu.vn

(Ngày gửi đăng: 07/05/2023 – Ngày duyệt đăng: 30/07/2023)

TÓM TẮT

Nghiên cứu dược động học của leuprolid sử dụng kỹ thuật LC-MS/MS để định lượng dược chất trong huyết thanh nhằm tăng độ chọn lọc, đặc hiệu của phương pháp. Mục đích của nghiên cứu là xây dựng và thẩm định một phương pháp định lượng bằng LC-MS/MS để xác định nồng độ leuprolid trong huyết thanh chó. Leuprolid và chuẩn nội (paracetamol) được chiết tách từ huyết thanh chó bằng phương pháp tủa protein, sau đó chiết lỏng-lỏng. Sử dụng cột C₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 μm), tốc độ dòng 0,2 ml/phút, pha động acetonitril - dung dịch amoni bicarbonat 10 mM. Giá trị m/z của ion 605,4 → 249,1 (leuprolid) and 152 → 110 (paracetamol) với nguồn ESI và kiểu MRM. Khoảng tuyến tính của đường chuẩn 0,05 to 50 ng/ml với hệ số tương quan lớn hơn 0,99. Kết quả độ đúng trong ngày, khác ngày trong khoảng 93,9% - 119,1% với CV ≤ 10%. Phương pháp có thể áp dụng để định lượng nồng độ leuprolid trong huyết thanh chó trong nghiên cứu dược động học và sinh khả dụng.

Từ khóa: dog serum, mass spectrometry, leuprolide, LC-MS/MS, protein precipitation.

1. Giới thiệu

Leuprolid là một thuốc tương tự hormon giải phóng gonadotropin. Thuốc được chỉ định để điều trị ung thư tuyến tiền liệt giai đoạn muộn, lạc nội mạc tử cung, dậy thì sớm ở trẻ em (1). Sau khi tiêm bắp trên chó với mức liều 3,75 mg leuprolid acetat, nồng độ leuprolid trong huyết thanh chó tăng nhanh và đạt đỉnh (C_{max}) khoảng 25 ng/ml sau khoảng 2 giờ, sau đó giảm và duy trì ở nồng

độ rất thấp (2). Như vậy việc xác định nồng độ leuprolid trong huyết thanh đòi hỏi phương pháp phân tích phải có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính rộng. Dựa trên nguyên lý hoạt động của phương pháp sắc ký lỏng - khối phổ, các phương pháp chiết tách và tham khảo tài liệu (3), (4), chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối với detector khối phổ kiểu tứ cực chập ba (LC-MS/MS) có



đủ độ nhạy, đặc hiệu, chính xác, định lượng được leuprolid trong các mẫu huyết thanh chó. Phương pháp phân tích sẽ được áp dụng trong các nghiên cứu sinh khả dụng chế phẩm chứa leuprolid.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Chất chuẩn leuprolid (chuẩn EP, nơi sản xuất: EDQM, lô: Batch 6, hàm lượng: 98,0% nguyên trạng, hạn dùng: lô hiện hành); chất chuẩn paracetamol (nơi sản xuất: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, lô: C0721019, hàm lượng: 100,0% nguyên trạng, hạn dùng: 31/12/2024), được sử dụng làm chất chuẩn nội. Các dung môi, hóa chất đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký lỏng khối phổ. Mẫu trắng huyết thanh chó không có leuprolid (Trường Đại học Dược Hà Nội cung cấp, được lấy từ chó thí nghiệm không được tiêm vi cầu leuprolid acetat).

Thiết bị: Tất cả các thiết bị phân tích đều được chuẩn hóa đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 và GLP bao gồm: Máy sắc ký lỏng khối phổ kiểu tứ cực chập ba LC-MS/MS của hãng Sciex QTrap 6500+ (Mỹ), cân phân tích (Mettler Toledo MS105, Thụy Sĩ, độ chính xác 0,01 mg), máy siêu âm (Powersonic, Hàn Quốc), máy lắc xoáy (Benchmark, Mỹ), tủ lạnh âm sâu (Panasonic, Nhật); các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, pipet có độ chính xác phù hợp.

Đối tượng nghiên cứu: Các mẫu huyết thanh (HT) tự tạo chứa leuprolid (LEU) được chuẩn bị bằng cách hòa tan chuẩn LEU vào các mẫu HT trắng với các nồng độ khác nhau.

Điều kiện sắc ký: Cột Acquity BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7 µm; tốc độ dòng: 0,2 ml/phút; thể tích tiêm mẫu: 5 µl; pha động: acetonitril - dung dịch amonibicarbonat 10 mM (35:65) (tt/tt).

Điều kiện khối phổ: Nguồn ion hóa: ESI; kiểu thu nhận tín hiệu: MRM; các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện leuprolid và chất chuẩn nội như sau:

Thông số / Dược chất	Leuprolid	Paracetamol (IS)
Chế độ ion hóa	ESI(+)	ESI(+)
Dạng ion	[M+2H] ²⁺	[M+H] ⁺
Điện thế ion hóa (IS) (V)	5500	5500
Khí phun sương (GAS1) (psi)	45	45
Khí tăng cường (GAS2) (psi)	45	45
Nhiệt độ hóa hơi (TEM) (°C)	400	400
Điện thế chọn lọc ion (DP) (V)	116	46
Khí làm sạch (CUR) (psi)	35	35
Năng lượng phân mảnh (CE) (V)	37	20
Điện thế đầu ra buồng phân mảnh (CXP) (V)	30	12
Ion ban đầu (parent ion)	605,4	152,0
Ion tạo thành (product ion)	249,1	110,0

Phương pháp chuẩn bị mẫu huyết thanh chứa chuẩn:

+ Dung dịch chuẩn nội: chuẩn bị dung dịch chuẩn nội gốc paracetamol trong methanol có nồng độ là 250 µg/ml. Từ dung dịch chuẩn nội gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn nội làm việc trong nước có nồng độ là 2,5 ng/ml.

+ Các dung dịch chuẩn: chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc LEU trong methanol có nồng độ là 1000 µg/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc trong hỗn hợp methanol - nước tỷ lệ (1:1,tt/tt) có nồng độ lần lượt là 1000 ng/ml và 10 ng/ml. Từ dung dịch chuẩn làm việc, pha dãy dung dịch trong hỗn hợp methanol - nước tỷ lệ (1:1,tt/tt) có nồng độ lần lượt là 1, 2, 40, 100, 200, 400, 850, 1000 ng/ml.

+ Đường chuẩn và mẫu kiểm tra trong huyết thanh: Chuẩn bị dãy đường chuẩn trong huyết thanh chứa LEU có nồng độ lần lượt là 0,05; 0,1; 2; 5; 10; 20; 42,5; 50 ng/ml. Mẫu kiểm tra được chuẩn bị độc lập ở 3 mức nồng độ LQC (0,15 ng/ml), MQC (20 ng/ml), HQC (37,5 ng/ml).

Quy trình xử lý mẫu leuprolid trong huyết thanh chó: Mẫu huyết thanh (HT) để rã đông ở nhiệt độ phòng. Hút 200 µl mẫu, thêm 10 µl dung dịch chuẩn nội làm việc. Thêm 400 µl acetonitril, lắc xoáy 30s, ly tâm với tốc độ 9000



vòng/phút trong 5 phút. Chuyển toàn bộ lớp dịch nổi sang ống khác, thêm 100 µl dung dịch acid formic 20%, thêm 600 µl dicloromethan. Lắc xoáy 5 phút, ly tâm với tốc độ 9000 vòng/phút trong 5 phút. Hút lấy lớp dung môi phía trên để tiêm sắc ký.

Thẩm định phương pháp: Tiến hành thẩm định độ đặc hiệu - chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ chính xác, tỷ lệ thu hồi hoạt chất, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định, ... của phương pháp theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học của US-FDA (5) và EMA (6).

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện khối phổ

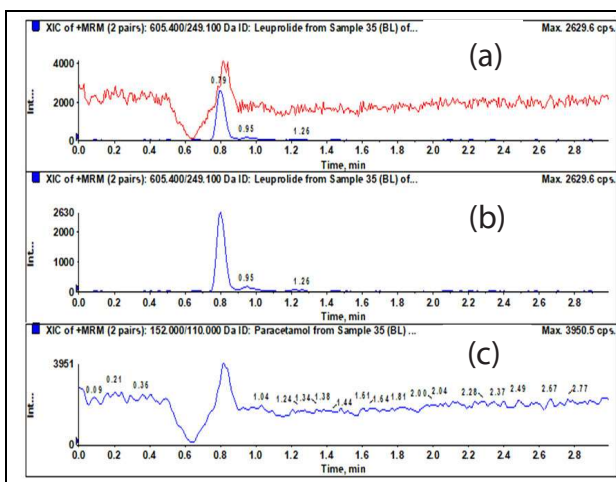
Trên phổ khối, LEU được ion hóa mang điện tích dương, nhận thấy ion có $m/z = 605,4$ ứng với số khối của ion $[LEU+2H]^{2+}$, phù hợp với cấu trúc hóa học của chất phân tích. Do đó, mảnh phổ ion mẹ có $m/z = 605,4$ được lựa chọn để khảo sát các điều kiện tiếp theo gồm xác định ion tạo thành, điện thế ion hóa, điện thế chọn lọc ion, năng lượng phân mảnh, nhiệt độ hóa hơi để tín hiệu của chất phân tích cao và ổn định nhất.

3.1.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

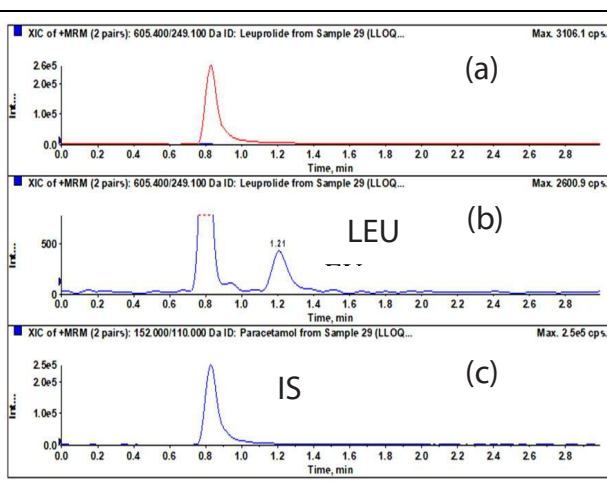
Do tính chất thân nước của các chất phân tích, đồng thời nền mẫu dịch sinh học sau xử lý vẫn còn chứa nhiều tạp chất nên quá trình sắc ký phải rửa giải, tách các chất khỏi tạp của nền mẫu. Quá trình khảo sát trên các hệ pha động và cột sắc ký khác nhau, lựa chọn pha động gồm acetonitril và dung dịch amonibicarbonat 10 mM (35:65, tt/tt) và sử dụng cột sắc ký Acquity BEH C18 100 x 2,1 mm; 1,7µm cho thấy đáp ứng pic LEU cao hơn rõ rệt khi sử dụng hệ pha động acetonitril - dung dịch acid formic 0,1%.

3.1.3. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Dựa trên tính chất của chất phân tích và điều kiện sẵn có, tiến hành khảo sát quy trình xử lý mẫu bằng kỹ thuật rửa protein và chiết lỏng - lỏng. Với kỹ thuật chiết lỏng - lỏng, thường thu được mẫu sạch hơn kỹ thuật rửa protein và có thể làm giàu mẫu. Tuy nhiên, do chất phân tích có tính chất thân nước, nên tỷ lệ thu hồi rất thấp. Với kỹ thuật rửa protein, tín hiệu chất phân tích thu được thấp do sự giảm tín hiệu gây ra bởi hiệu ứng nền mẫu, không đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng cần phải đạt được. Tiến hành khảo sát phương pháp xử lý mẫu kết hợp rửa protein và chiết lỏng-lỏng. Sau rửa protein, mẫu được acid



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu huyết thanh trắng



Hình 2: Sắc ký đồ mẫu huyết thanh tự tạo chứa chuẩn LEU (0,05 ng/ml) và chuẩn nội

Sắc ký đồ tổng (a), sắc ký đồ chọn lọc ion LEU (b), sắc ký đồ chọn lọc ion chuẩn nội (c)



hóa và chiết lỏng-lỏng để loại tạp tan trong pha dung môi hữu cơ, quá trình acid hóa giúp tỷ lệ thu hồi ổn định.

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu HT trắng và các mẫu HT tự tạo chứa chuẩn LEU với nồng độ khoảng 0,05 ng/ml có chứa nội chuẩn theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên sắc ký đồ mẫu HT trắng (Hình 1) tại các thời điểm khoảng 1,21 và 0,81 phút (trùng với thời gian lưu của LEU và IS trong sắc ký đồ mẫu chuẩn - hình 2), không xuất hiện các pic có các mảnh phổ khối $m/z = 605,4 \rightarrow 249,1$ (LEU) và $m/z = 152 \rightarrow 110$ (IS). Do vậy, phương pháp đặc hiệu và chọn lọc đối với LEU và chuẩn nội.

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Tiến hành pha các mẫu HT chứa chuẩn LEU có nồng độ khoảng từ 0,05 ng/ml đến 50 ng/ml. Phân tích theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ LEU (x) có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic LEU/IS (y) bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/x^2$). Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 1.

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng

nồng độ từ 0,05 ng/ml đến 50 ng/ml có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ LEU với tỷ lệ diện tích pic của LEU/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ LEU xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt xấp xỉ 100% và nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.3. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết thanh chứa LEU với nồng độ khoảng 0,05 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định diện tích pic LEU và IS của các mẫu LLOQ và xác định nồng độ LEU có trong các mẫu từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện. Thử nghiệm lặp lại trên 3 ngày. 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	Ngày 2	Ngày 3
Tỷ số tín hiệu/nền (S/N)	> 10	> 10	> 10
Độ đúng trung bình (%)	119,1	102,1	116,4
Độ lặp lại (CV%)	7,5	4,6	9,9
Độ đúng trung bình - 3 ngày (%)	112,5		
Độ lặp lại - 3 ngày (CV%)	10,1		

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

Mẫu	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)				
		Đường chuẩn 1	Đường chuẩn 2	Đường chuẩn 3	Đường chuẩn 4	Đường chuẩn 5
S1	0,050	104,0	103,2	103,9	103,4	101,9
S2	0,100	91,9	93,4	92,3	93,3	95,8
S3	2,000	103,1	103,0	97,2	98,3	105,4
S4	5,000	97,0	97,2	101,4	99,7	106,6
S5	10,00	100,2	101,6	101,1	99,3	104,0
S6	20,00	101,3	98,8	98,4	100,9	89,3
S7	42,50	102,6	104,4	106,3	105,9	99,2
S8	50,00	99,9	98,3	99,5	99,2	97,8
Phương trình hồi quy ($y = ax + b$)		a = 0,0562	a = 0,0543	a = 0,0547	a = 0,0577	a = 0,0562
		b=0,00127	b=0,00129	b=0,00116	b=0,00095	b=0,0015
		r = 0,9991	r = 0,9992	r = 0,9990	r = 0,9992	r = 0,9981



Bảng 3: Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày

Độ đúng, Độ lặp lại		Mẫu LLOQ (0,05ng/ml)		Mẫu LQC (0,15 ng/ml)		Mẫu MQC (20,0 ng/ml)		Mẫu HQC (37,5 ng/ml)	
		Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)	Độ đúng (%)	Độ lặp lại (CV%)
Trong ngày (n = 6)	Ngày 1	119,1	7,5	114,7	7,8	99,8	3,9	106,6	6,5
	Ngày 2	102,1	4,6	102,0	4,3	93,9	5,1	101,7	3,2
	Ngày 3	116,4	9,9	106,5	5,2	93,5	4,7	102,2	5,4
Khác ngày (n = 18)		112,5	10,1	107,7	7,6	95,7	5,3	103,5	5,4

Bảng 4: Kết quả khảo sát tỷ lệ thu hồi của LEU và IS

Mẫu	Mẫu LQC (0,15 ng/ml)		Mẫu MQC (20 ng/ml)		Mẫu HQC (37,5 ng/ml)		IS	
	HT	Nền mẫu	HT	Nền mẫu	HT	Nền mẫu	HT	Nền mẫu
Diện tích pic trung bình	10500 (n = 6)	14270 (n = 6)	117392 (n = 6)	151263 (n = 6)	2341606 (n = 6)	2890071 (n = 6)	1236888 (n = 18)	3452585 (n = 18)
CV(%)	2,7	6,2	3,8	4,1	3,9	3,0	4,7	3,3
Tỷ lệ thu hồi	73,6%		77,6%		81,0%		36,4	

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ số tín hiệu trên nền mẫu của pic LEU trong các mẫu LLOQ (nồng độ khoảng 0,05 ng/ml) đều lớn hơn 10; tỷ lệ nồng độ LEU xác định từ đường chuẩn so với nồng độ thực có trong mẫu có độ đúng trung bình = 112,5% và CV = 10,1 %, đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.4. Độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 4 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa LEU có nồng độ tương ứng là 0,05; 0,15; 20 và 37,5 ng/ml. Xác định hàm lượng LEU có trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tỷ lệ phần trăm giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày xấp xỉ 100%; độ lặp lại trong ngày, khác ngày với

giá trị CV < 15,0%; đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ lặp lại của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA và EMA.

4.2.5. Tỷ lệ thu hồi dược chất

Xác định tỷ lệ thu hồi LEU và IS bằng cách so sánh diện tích pic LEU và IS trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong nền mẫu). Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi của LEU và IS ở cả ba khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao được trình bày trong Bảng 4.

Kết quả khảo sát cho thấy, phương pháp xử lý mẫu cho hiệu suất chiết dược chất cao (> 70%) và ổn định (CV% < 15%; sai khác giữa các nồng độ không quá 10%).

3.2.6. Xác định ảnh hưởng của nền mẫu

Chuẩn bị các lô huyết thanh trắng từ 6 con chó khác nhau, tiến hành xử lý theo qui trình thu được các dung dịch nền mẫu. Chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong các dung dịch nền mẫu tương ứng. Song



song chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong pha động. Đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu qua tỷ số MF_{LEU}/MF_{IS} trong đó MF_{LEU} , MF_{IS} được xác định bằng cách so sánh diện tích pic của LEU và IS của các mẫu pha trong nền mẫu so với diện tích pic của các mẫu pha trong pha động. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5: Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu

STT	MF_{LEU}		MF_{IS}		MF_{LEU}/MF_{IS}	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
1	1,295	1,076	0,392	0,394	3,305	2,732
2	1,246	1,027	0,398	0,388	3,134	2,651
3	1,233	1,102	0,374	0,375	3,294	2,935
4	1,184	1,091	0,380	0,361	3,113	3,024
5	1,217	1,004	0,364	0,373	3,345	2,694
6	1,196	1,032	0,376	0,388	3,185	2,657
TB	1,229	1,055	0,381	0,380	3,229	2,782
CV (%)	3,2	3,7	3,3	3,2	3,0	5,7

Kết quả cho thấy không có sự sai khác giữa các nền mẫu khác nhau với tỷ số MF_{LEU}/MF_{IS} có giá trị CV < 15%.

3.2.7. Độ ổn định của dược chất trong huyết thanh

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của LEU trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh

Bảng 6: Kết quả nghiên cứu độ ổn định của LEU trong huyết thanh

Độ ổn định		LQC	HQC
Sau 5 chu kỳ đông – rã đông	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,162	34,302
	% độ ổn định	107,8	91,5
	CV%	7,4	5,3
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,155	40,761
	% độ ổn định	103,6	108,7
	CV%	3,8	5,1
Độ ổn định thời gian dài (209 ngày; -35°C ± 5°C)	Nồng độ trung bình (ng/ml)	0,149	34,307
	% độ ổn định	99,4	91,5
	CV%	5,2	6,8

giá độ ổn định của LEU trong HT bằng cách so sánh nồng độ LEU có trong mẫu được bảo quản ở những điều kiện nhất định với nồng độ pha thực tế. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của LEU trong huyết thanh ở cả hai khoảng nồng độ thấp và cao được trình bày trong Bảng 6.

3.2. Thảo luận

Sau khi tiêm bắp 11,25 mg vi cầu leuprolid tác dụng kéo dài, nồng độ leuprolid trong huyết thanh người tăng nhanh và đạt đỉnh (C_{max}) khoảng 36,3 ng/ml sau khoảng 4 giờ, sau đó giảm và duy trì ở nồng độ rất thấp ($0,23 \pm 0,09$ ng/ml) trong khoảng thời gian kéo dài tới 3-12 tuần (7). Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển phương pháp định lượng leuprolid trong huyết thanh chó sau khi tiêm bắp với mức liều 3,75 mg leuprolid acetat, với nồng độ C_{max} khoảng 25 ng/ml (2), nồng độ leuprolid trong huyết thanh phần lớn rất thấp (nhỏ hơn 1 ng/ml), vì vậy, ngoài việc định lượng mẫu bằng phương pháp LC-MS/MS, các công bố chủ yếu chiết mẫu huyết thanh bằng phương pháp chiết pha rắn (2), (3), (4), (8), tuy nhiên, đây là phương pháp chi phí tốn kém, người thực hiện chiết tách cũng phải có kinh nghiệm để thực hiện, do đó, xử lý mẫu huyết thanh bằng phương pháp chiết pha rắn chưa phổ biến, phù hợp với thực tế ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chiết mẫu bằng phương pháp tủa kết hợp với chiết lỏng - lỏng, là một phương pháp chiết tách đơn giản, dễ thực hiện, chi phí thấp.

Phương pháp đã xây dựng có điều kiện sắc ký với pha động đơn giản, chạy đẳng dòng. Trong khi một số nghiên cứu để rửa giải dược chất cần chạy gradient phức tạp (2), (9) hoặc sử dụng pha động phức tạp, nhiều thành phần (8). Các phương pháp đã công bố, điều kiện khối phổ của mỗi thiết bị, mỗi phương pháp có thể khác nhau nhưng đều là điều kiện khối phổ tối ưu của mỗi thiết bị để cho tín hiệu của chất chuẩn LA cao và ổn định nhất (2), (4), (8), (9).

Nghiên cứu đã khảo sát để giới hạn định



lượng giới đạt được thấp nhất có thể, mà vẫn đảm bảo các yêu cầu của một phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học. Mặc dù chiết mẫu bằng phương pháp tủa kết hợp chiết lỏng - lỏng, nhưng giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp đã xây dựng và thẩm định là 0,05 ng/ml nhỏ hơn một số nghiên cứu đã công bố (2), (9). Khoảng đường chuẩn 0,05 - 50 ng/ml, với giới hạn định lượng trên của đường chuẩn (ULOQ) 50 ng/ml bằng khoảng 2 lần giá trị C_{max} để đảm bảo bao phủ khoảng nồng độ trong huyết thanh chó khi sử dụng mức liều 3,75 mg leuprolid acetat.

Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ, đáp ứng các yêu cầu của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA (5) và EMA (6).

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng leuprolid trong huyết thanh chó bằng LC-MS/MS với giá trị giới hạn định lượng dưới thấp (0,05 ng/ml), khoảng tuyến tính rộng (từ 0,05 đến 50 ng/ml), độ đúng, độ lặp lại cao, phương pháp xử lý mẫu nhanh, đơn giản, chi phí thấp và thời gian phân tích ngắn (3 phút cho mỗi mẫu). Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu sinh khả dụng các chế phẩm thuốc chứa dược chất leuprolid.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu cảm ơn Bộ Y tế Việt Nam đã tài trợ cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, Dược thư quốc gia Việt Nam, nhà xuất bản Y học. 2018.
2. Xiong D, Wen S, Chen H, Bao X, Ye L. Determination of Leuprolide in Beagle Dogs' Serum by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Study on Bioequivalence. *Asian Journal of Chemistry*. 2014;26(8):2321.
3. Park S, Kim D-H, Kim Y, Park JH, Lee M, Song I-S, et al. Comparative in vitro release and clinical pharmacokinetics of leuprolide from Luphere 3M Depot, a 3-month release formulation of leuprolide acetate. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(3):441-7.
4. Zhan Y, Chen X, Zhao X, Zhong D. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of leuprolide in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(27):3194-200.
5. Food and Drug Administration-United States, Guidance for industry-Bioanalytical method validation. 2018.
6. European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation. 2012.
7. LUPRON DEPOT - leuprolide acetate injection p, lyophilized, for suspension (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020708s030lbl.pdf).
8. Skiba M, Fatmi S, Elkasri N, Karrout Y, Lahiani-Skiba M. Development, validation and method stability study of a LC-MS method to quantify leuprolide (Hormone analog) in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2020;1160:122345.
9. Seong G-S, Seo S-W, Cho JY, Lee B-J, Yoon I-S, et al. Determination of Leuprolide-Fatty Acid Conjugate in Rat Plasma Using LC-MS/MS and Its Pharmacokinetics after Subcutaneous Administration in Rats. *Molecules*. 2022;27(24):8716.