

Xây dựng phương pháp định lượng levetiracetam trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Thị Như Ngọc*, Bạch Ngọc Toàn
Khoa Dược, Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Levetiracetam là thuốc chống co giật. Phương pháp định lượng levetiracetam trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao đã được thực hiện nhưng không sử dụng chuẩn nội hoặc có sử dụng chuẩn nội nhưng chưa thực sự phù hợp. **Mục tiêu:** Xây dựng phương pháp định lượng và thẩm định phương pháp đã xây dựng. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Huyết tương chứa levetiracetam. Sau khi xây dựng quy trình xử lý mẫu và khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký, phương pháp được thẩm định theo US - FDA và EMA. **Kết quả:** Protein trong mẫu huyết tương chứa levetiracetam và chuẩn nội piracetam được rửa bằng ZnSO_4 và NaOH. Điều kiện sắc ký: Cột C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ cột 25 °C, thể tích tiêm 100 μl , bước sóng phát hiện 205 nm, pha động là hỗn hợp dung dịch acid phosphoric pH 2,5 và methanol với chương trình gradient. Phương pháp được thẩm định đạt yêu cầu theo US - FDA và EMA. **Kết luận:** Phương pháp có thể được áp dụng trong nghiên cứu tương đương sinh học chế phẩm thuốc chứa levetiracetam.

Từ khóa: levetiracetam, huyết tương, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Method development for determination of levetiracetam in human plasma by high performance liquid chromatography

Nguyễn Thị Như Ngọc*, Bạch Ngọc Toàn
Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Abstract

Background: Levetiracetam is an anticonvulsant. Quantitative methods for determining levetiracetam in human plasma using high-performance liquid chromatography (HPLC) have previously been performed either without internal standards or with unsuitable internal standards. Objectives: developing method for determination of levetiracetam in human plasma by high performance liquid chromatography and validating the developed method. **Materials and methods:** Human plasma samples contain levetiracetam. After developing the sample treatment procedure and chromatographic conditions, the method was validated according to US-FDA and EMA. **Results:** Proteins in plasma samples containing levetiracetam and piracetam (as internal standard) were precipitated using ZnSO_4 and NaOH. The optimal chromatographic conditions: C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μm), flow rate 1 ml/min, column temperature 25 °C, injection volume 100 μl , detection wavelength at 205 nm, mobile phase consisted of mixture of phosphoric acid solution of pH 2.5 and methanol in gradient program. The method met the requirements of US - FDA and EMA guidelines. **Conclusion:** The method can be applied for bioequivalence studies of pharmaceutical preparations containing levetiracetam.

Keywords: levetiracetam, plasma, high performance liquid chromatography.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Levetiracetam (LEV) là dẫn xuất pyrrolidin, là một thuốc chống co giật. Thuốc ngăn ngừa có chọn lọc tính đồng bộ quá mức của sự bùng phát dạng động kinh và sự lan truyền của cơn động kinh [1]. Việc kiểm soát nồng độ thuốc trong huyết tương nhằm có được liều sử dụng hợp lý cho các đối tượng bệnh

nhân, đồng thời đánh giá tương đương sinh học giúp kiểm tra chất lượng của thuốc là việc cần thiết cho các loại thuốc. Hiện nay đã có một số công bố về phương pháp định lượng LEV đơn lẻ hoặc đồng thời với một số hoạt chất khác trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Tuy nhiên những phương pháp đó không sử dụng chuẩn nội (IS) như

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Ngọc, email: ntngoc@huemed-univ.edu.vn
Ngày nhận bài: 12/12/2024; Ngày đồng ý đăng: 16/07/2025; Ngày xuất bản: 25/12/2025

DOI: 10.34071/jmp.2025.7.4

ngiên cứu của Farhan AS và cộng sự [2] hoặc của Jens ML và cộng sự [3] sẽ khó kiểm soát được sai số trong quá trình chiết suất. Hoặc có sử dụng chuẩn nội (antipyrin, paracetamol) nhưng chưa thực sự phù hợp riêng cho LEV do có cấu trúc chưa tương đồng dẫn đến chưa tương đồng tính chất lý hóa gây ra chênh lệch tỷ lệ thu hồi giữa LEV và chuẩn nội do khác hiệu suất chiết làm giảm độ chính xác, tin cậy. Nghiên cứu sử dụng antipyrin chưa công bố rõ hiệu suất chiết của chuẩn nội và hoạt chất [4]. Nghiên cứu sử dụng paracetamol làm chuẩn nội có tỷ lệ thu hồi của LEV là 53,40 - 56,60% và paracetamol là 12,00% hoặc 5,6% [5], [6]. Với những lý do trên, đề tài “Xây dựng phương pháp định lượng levetiracetam trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao” được thực hiện với hai mục tiêu: Xây dựng phương pháp định lượng levetiracetam trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn US - FDA 2018 [7] và EMA 2011 [8].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Huyết tương trắng: từ người tình nguyện khỏe mạnh (Trung tâm Huyết học và Truyền máu khu vực Huế).

Mẫu thử giả lập: Levetiracetam trong nền huyết tương trắng.

2.2. Hóa chất, dung môi, trang thiết bị

Chất chuẩn: Levetiracetam - Số kiểm soát QT183 050820, hàm lượng 99,6% (nguyên trạng), Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Piracetam - Số kiểm soát 02177291.02, hàm lượng 100,15% (nguyên trạng), Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

Dung môi - hóa chất: acetonitril (ACN), methanol (MeOH), acid phosphoric (H_3PO_4) từ Merck (Đức); trifluoroacetic acid (TFA), kẽm sulfat ($ZnSO_4$), amoni sulfat ($(NH_4)_2SO_4$), natri hydroxid (NaOH) từ Sigma Aldrich (Mỹ).

Trang thiết bị: máy sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU đầu dò PDA (Nhật); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức); cân phân tích A&D (Hàn Quốc); máy đo pH Sension⁺ pH3 Hach (Mỹ); máy lắc xoay Vortex, micropipet Labnet (Mỹ) và các dụng cụ thủy tinh chính xác.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc: hòa tan riêng các chất chuẩn levetiracetam, piracetam (IS) trong MeOH để thu được các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Các mẫu kiểm tra (QC): từ các dung dịch chuẩn

gốc và mẫu huyết tương trắng, chuẩn bị các mẫu huyết tương trắng có chứa LEV từ 0,0625 - 25 $\mu\text{g/ml}$ và IS 25 $\mu\text{g/ml}$. Trong đó mẫu nồng độ thấp (LQC), trung bình (MQC) và cao (HQC) chứa LEV có nồng độ tương ứng là 0,75 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ và 20 $\mu\text{g/ml}$.

2.3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Lấy 1 ml huyết tương có chứa LEV, thêm 25 μl dung dịch IS, lắc xoay 30 giây. Tiếp tục xử lý với các quy trình:

- Quy trình 1 (tủa protein bằng TFA): thêm 1 ml TFA 1% trong MeOH, lắc xoay 30 giây, ly tâm 7400 vòng/phút trong 10 phút, lấy phần dịch, lọc qua màng 0,45 μm .

- Quy trình 2 (tủa protein bằng MeOH): thêm 1 ml MeOH, lắc xoay 5 phút, ly tâm 10 000 vòng/phút trong 10 phút, lấy hết phần dịch, lọc qua màng 0,45 μm .

- Quy trình 3 (tủa protein bằng $ZnSO_4$ và NaOH): thêm 0,5 ml $ZnSO_4$ 20%, lắc xoay 20 giây, thêm 0,5 ml NaOH 1 M, lắc xoay 20 giây, để yên 20 phút, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, hút lấy phần dịch phía trên, lọc qua màng 0,45 μm .

- Quy trình 4 (tủa protein bằng $(NH_4)_2SO_4$): thêm 3 ml $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa, lắc xoay 20 giây, để yên 20 phút, ly tâm 3000 vòng/phút 10 phút, lấy phần dịch, lọc qua màng 0,45 μm .

Quy trình xử lý mẫu được lựa chọn dựa trên khả năng loại được những tạp gây ảnh hưởng đến pic LEV và pic IS.

2.3.3. Khảo sát điều kiện sắc ký

Sử dụng cột sắc ký Innersertain C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ cột 25 °C, thể tích tiêm 100 μl , bước sóng phát hiện 205 nm. Tiến hành khảo sát các hệ dung môi dùng cho pha động gồm ACN hoặc MeOH kết hợp với hệ đệm với các chương trình gradient và isocratic để tách tốt pic LEV và IS ra khỏi các pic khác.

2.3.4. Thẩm định phương pháp

Phương pháp được thẩm định theo hướng dẫn US - FDA 2018 [7] và EMA 2011 [8]. Mẫu được xử lý và phân tích theo điều kiện sắc ký đã chọn được sau khi khảo sát.

Tính phù hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần mẫu huyết tương trắng chứa LEV nồng độ 12,5 $\mu\text{g/ml}$ có thêm IS nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$. Ghi nhận gian lưu (t_R) - phút, diện tích pic (S) - mAu.s, hệ số đối xứng (A_s) và độ phân giải (R_s).

Độ đặc hiệu - chọn lọc

Phân tích mẫu huyết tương trắng; mẫu huyết tương trắng chứa chất IS nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$; mẫu huyết tương trắng chứa LEV ở nồng độ 12,5 $\mu\text{g/ml}$, mẫu huyết tương trắng có IS nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$ và

LEV nồng độ 12,5 µg/ml theo quy trình đã chọn. Ghi lại sắc ký đồ với các thông số của pic.

Ảnh hưởng của nền mẫu

Chuẩn bị các mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau. Chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong các nền huyết tương trắng tương ứng. Song song chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong dung môi MeOH. Đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu thông qua tỷ số MF_{LEV}/MF_{IS} , trong đó MF_{LEV} , MF_{IS} được xác định bằng cách so sánh diện tích pic của LEV và IS của các mẫu trong nền huyết tương trắng so với diện tích pic của các mẫu pha trong dung môi.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Tiến hành pha các mẫu huyết tương trắng chứa IS nồng độ 25 µg/ml và LEV lần lượt ở các nồng độ 0,0625 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 17,5 µg/ml và 25 µg/ml. Phân tích theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan tuyến tính giữa tỷ lệ diện tích pic LEV/IS (y) và nồng độ LEV (x).

Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Tiến hành phân tích 06 mẫu huyết tương trắng, 06 mẫu huyết tương trắng có chứa LEV 0,0625 µg/ml và IS. Xử lý và phân tích các mẫu theo quy trình. Ghi lại sắc ký đồ và đáp ứng pic. Xác định nồng độ LEV có trong các mẫu, độ đúng, độ chính xác từ đường chuẩn tiến hành song song trong cùng điều kiện.

Độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ chính xác trên 03 lô mẫu LQC, MQC và HQC. Xác định hàm lượng LEV trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ chính xác được biểu thị bằng giá trị %RSD.

Tỷ lệ thu hồi

Xác định tỷ lệ thu hồi LEV và IS bằng cách so sánh diện tích pic LEV và IS trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong dung môi), ở mỗi nồng độ thực hiện 06 mẫu. Xác định tỷ lệ thu hồi của LEV ở 03 nồng độ LQC, MQC và HQC.

Hệ số pha loãng

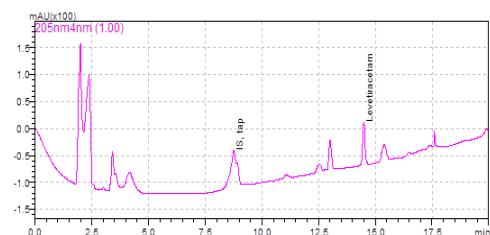
Chuẩn bị mẫu huyết tương chứa LEV ở nồng độ gấp 02 lần HQC, sau đó pha loãng mẫu này 02 lần bằng huyết tương trắng. Phân tích lặp lại 06 mẫu. Xác định độ đúng và độ lặp lại của các mẫu.

Độ ổn định

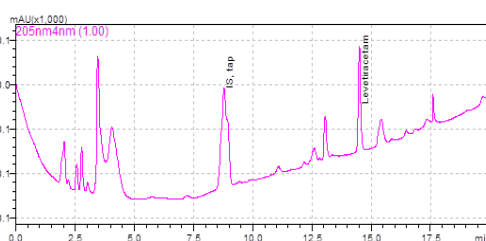
Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của các mẫu huyết tương trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của các mẫu huyết tương bằng cách so sánh nồng độ LEV có trong các mẫu xử lý ngay và các mẫu được bảo quản 03 chu kỳ đông - rã (mẫu bảo quản đông lạnh, lấy ra rã đông hoàn toàn ở nhiệt độ phòng rồi để đông lạnh lại trong 12 - 24 giờ và lặp lại thêm 02 chu kỳ nữa), độ ổn định dài ngày (mẫu bảo quản ở -35 °C trong 30 ngày), độ ổn định ngắn ngày (mẫu bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

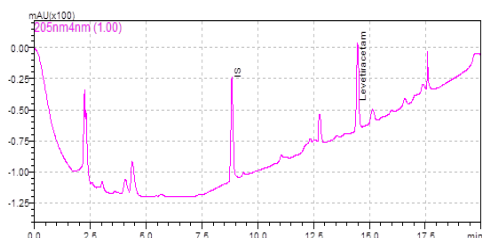
3.1. Khảo sát và lựa chọn quy trình xử lý mẫu



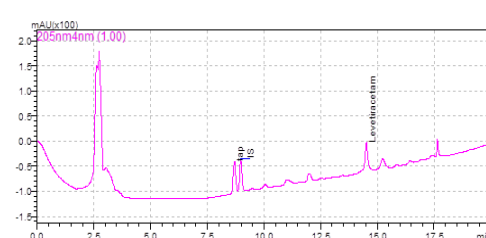
a) Quy trình 1



b) Quy trình 2



c) Quy trình 3



d) Quy trình 4

Hình 1. Kết quả khảo sát quy trình xử lý mẫu

Dựa vào kết quả cho thấy: quy trình 1, 2 và 4 có pic IS bị trùng hoặc chưa tách hẳn ra khỏi pic tạp trong nền mẫu, quy trình 3 có các pic tách tốt, cân đối và sắc nhọn. Vậy quy trình 3 được lựa chọn: lấy 1 ml huyết tương có chứa LEV, thêm 25 μ l dung dịch IS, lắc xoáy 30 giây, thêm 0,5 ml ZnSO_4 20%, lắc xoáy 20 giây, thêm 0,5 ml NaOH 1 M, lắc xoáy 20 giây, để yên 20 phút, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, hút phần dịch phía trên, lọc qua màng 0,45 μ m.

3.3. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn US - FDA và EMA

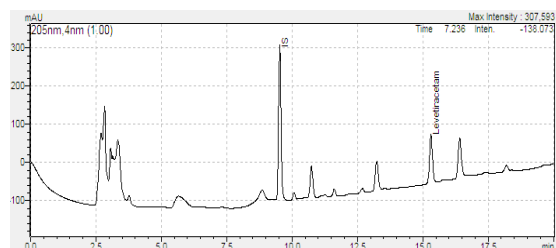
Tính phù hợp hệ thống

Bảng 1. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống

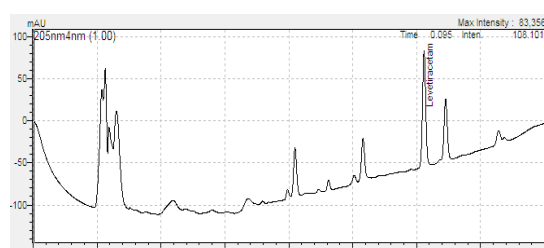
	IS			LEV				
	t_R	S	As	t_R	S	As	Rs	S_{LEV}/S_{IS}
TB	9,532	2633707,2	1,2	15,316	1010165,5	1,1	28,0	2,6
% RSD	0,06	0,1	0,2	0,03	0,4	0,2	0,2	0,4

Độ lệch chuẩn tương đối của thời gian lưu và diện tích pic của LEV, IS và S_{LEV}/S_{IS} đều có %RSD $\leq$ 2%. Hệ số đối xứng của hai chất nằm trong khoảng $0,8 \leq As \leq 1,5$ và độ phân giải giữa các pic $Rs \geq 1,5$. Do vậy phương pháp đạt yêu cầu về tính phù hợp hệ thống.

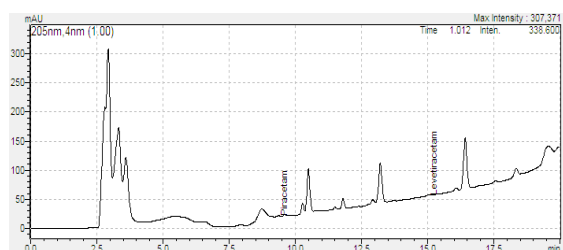
Độ đặc hiệu - chọn lọc



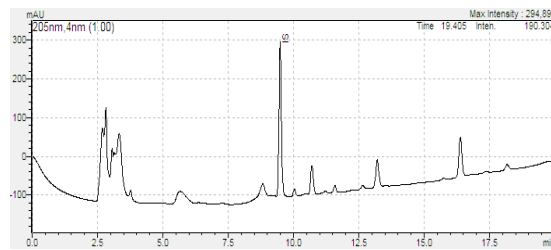
a) Huyết tương trắng chứa IS và LEV



b) Huyết tương trắng chứa LEV



c) Huyết tương trắng



d) Huyết tương trắng chứa IS

Hình 2. Sắc ký đồ thẩm định độ đặc hiệu

Từ các sắc ký đồ cho thấy tại thời gian lưu khoảng 9,532 phút và 15,316 phút (tương ứng với thời gian lưu của các pic IS và LEV) không xuất hiện các pic lạ trên mẫu huyết tương trắng. Do vậy phương pháp có độ đặc hiệu tốt.

Ảnh hưởng của nền mẫu

Bảng 2. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu

STT	MF _{IS}		MF _{LEV}		MF _{LEV} /MF _{IS}	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
1	0,95	0,97	1,13	1,03	1,19	1,06
2	0,96	0,98	1,13	1,05	1,18	1,07
3	0,95	0,98	1,06	1,05	1,11	1,07
4	0,96	0,95	1,03	1,02	1,08	1,07
5	0,97	1,01	1,05	1,07	1,08	1,06
6	0,95	1,00	1,08	1,06	1,14	1,06
TB	0,96	0,98	1,08	1,05	1,13	1,06
% RSD	0,48	1,82	3,54	1,60	3,73	0,41

Kết quả thẩm định cho thấy sự sai khác giữa các nền mẫu khác nhau nằm trong giới hạn cho phép (%RSD < 15%). Phương pháp xử lý mẫu là phù hợp và phương pháp phân tích không bị ảnh hưởng bởi nền mẫu.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ 0,0625 - 25 µg/ml có mối tương quan tuyến tính giữa tỷ lệ diện tích pic LEV/IS (y) và nồng độ LEV (x) theo phương trình $y = 0,0353x - 0,0002$ với hệ số $r^2 = 0,999$. Độ đúng so với giá trị thực tại các nồng độ từ 93,31 - 103,61% (đạt so với yêu cầu từ 85 - 115%).

Độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày

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

	Mẫu QC (µg/ml)	Nồng độ tìm thấy TB (µg/ml)	Độ đúng TB (%)	Độ chính xác TB (%RSD)
Trong ngày (n = 6)	LQC	0,75	0,78	1,90
	MQC	12,5	11,93	1,60
	HQC	20	19,72	0,13
Khác ngày (n = 6)	LQC	0,75	0,76	2,16
	MQC	12,5	12,16	1,55
	HQC	20	20,30	2,15

Kết quả cho thấy độ đúng của từng lô mẫu (n = 6) nằm trong khoảng 95,43 - 103,68%, đạt trong khoảng cho phép 85 - 115%. Độ chính xác trong ngày và khác ngày của mỗi lô (n = 6) tại mỗi nồng độ với %RSD từ 0,13 - 2,16%, đạt so với yêu cầu %RSD ≤ 15%. Như vậy, độ đúng và độ chính xác đạt theo yêu cầu của phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

Tỷ lệ thu hồi

Tỷ lệ thu hồi của LEV trung bình ở 03 nồng độ LQC, MQC và HQC tương ứng là 107,92%, 104,63% và 103,54%. Kết quả cho thấy phương pháp có hiệu suất chiết hoạt chất ổn định và khác nhau không quá

Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Tiến hành phân tích 06 mẫu huyết tương trắng, 06 mẫu huyết tương trắng có chứa LEV 0,0625 µg/ml và IS. Kết quả cho thấy độ đúng của 06 mẫu nằm trong khoảng 97,73 - 118,65% (đạt so với yêu cầu từ 80 - 120%), độ chính xác đạt với %RSD = 7,46% (%RSD ≤ 20%). Tại thời điểm trùng thời gian lưu của LEV, đáp ứng pic LEV trong mẫu LLOQ gấp ít nhất 5 lần trong mẫu trắng. Như vậy, mẫu huyết tương trắng chứa LEV ở nồng độ 0,0625 µg/ml đáp ứng yêu cầu LLOQ về độ đúng, độ chính xác. Vậy LLOQ là 0,0625 µg/ml.

15%, độ lặp lại đạt với %RSD từ 1,33 - 3,88% (%RSD < 15%). Do đó phương pháp xử lý mẫu đã được xây dựng là phù hợp để chiết tách LEV trong huyết tương.

Hệ số pha loãng

Sau khi phân tích 06 mẫu huyết tương chứa LEV ở nồng độ gấp 02 lần HQC được pha loãng 02 lần bằng huyết tương trắng, thêm 25 µl dung dịch IS, phân tích theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả cho thấy độ đúng trung bình của 06 mẫu được pha loãng là 97,76% nằm trong giới hạn cho phép là 85 - 115%, hệ số pha loãng cho kết quả các mẫu có độ lặp lại cao với %RSD là 0,18% (%RSD ≤ 15%).

Độ ổn định**Bảng 4.** Độ ổn định của mẫu huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ TB mẫu xử lý ngay ($\mu\text{g/ml}$; $n = 6$)	Nồng độ TB sau bảo quản ($\mu\text{g/ml}$; $n = 6$)	% sai khác
3 chu kỳ đông - rã	LQC	0,78	0,86	10,26
	HQC	19,72	20,83	5,63
Độ ổn định ngắn hạn (6 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	0,78	0,72	-7,69
	HQC	19,72	20,52	4,06
Độ ổn định dài hạn (30 ngày/ -35°C)	LQC	0,78	0,73	-6,41
	HQC	19,72	17,56	-10,95

Kết quả cho thấy, nồng độ LEV trong các mẫu được xử lý sau khi bảo quản đều đạt yêu cầu về độ ổn định với % sai khác so với các mẫu xử lý ngay không quá $\pm 15\%$.

4. BÀN LUẬN

Đối với phân tích các thuốc trong huyết tương thường trải qua quá trình xử lý mẫu khá phức tạp nên thường sử dụng chất chuẩn nội để giảm sai số so với dùng chuẩn ngoại. Một số phương pháp không sử dụng chuẩn nội như nghiên cứu của Farhan AS và cộng sự [2] hoặc của Jens ML và cộng sự [3] sẽ khó kiểm soát được sai số trong quá trình chiết suất. Trong nghiên cứu này đã khảo sát lựa chọn piracetam là chất chuẩn nội phù hợp cho levetiracetam hơn do có cấu trúc tương tự [2] vì chúng đều là dẫn xuất pyrrolidon giúp bù trừ sai số tốt hơn, nhất là khi có thay đổi pH, dung môi, nhiệt độ... so với chuẩn nội đã dùng trong nghiên cứu khác như paracetamol, antipyrin [4, 5, 6]. Hiệu suất chiết IS tương đương với LEV nên tỷ lệ thu hồi của LEV và IS trong nghiên cứu này tương ứng là 103,54 - 107,92% và 95,69 - 99,59%. Trong khi đó, nghiên cứu của Cao Ngọc Cương và Tạ Mạnh Hùng cùng các cộng sự sử dụng paracetamol làm chuẩn nội có tỷ lệ thu hồi của LEV và paracetamol tương ứng là 53,40 - 56,60% và 12,00% hoặc 5,6% [5], [6] nên khi chiết lỏng - lỏng thì tính đồng nhất và độ chính xác giữa các mẫu dễ bị ảnh hưởng. Khi đó, tỷ lệ tín hiệu LEV/IS không ổn định, gây sai số cho định lượng. Tuy nhiên, nghiên cứu của Cao Ngọc Cương có ưu điểm là chuẩn nội paracetamol rất phổ biến, dễ kiếm nên phù hợp với nhiều phòng thí nghiệm, thể tích tiêm mẫu nhỏ hơn (50 μL) [6] giúp tiết kiệm mẫu. Tỷ lệ thu hồi của LEV trong nghiên cứu này cũng cao hơn so với nghiên cứu của Farhan AS và cộng sự là 96,80 - 99,84% [2], của Joana G và cộng sự là 72,866 - 99,276% [4] và của Jens ML và cộng sự là $98,6 \pm 0,56\%$ [3].

Phương pháp xử lý mẫu được lựa chọn là kỹ thuật tủa protein bằng hỗn hợp ZnSO_4 và NaOH. Protein có tính chất là một phân tử lưỡng tính, trong

môi trường kiềm tạo bởi NaOH sẽ mang điện âm kết hợp với các ion kim loại Zn^{2+} mang điện dương sẽ tạo thành dạng muối kim loại - proteinat khó tan do ở dạng trung hòa về điện. Ngoài ra, sự kết hợp của ion OH^- với ion Zn^{2+} trong mạng lưới protein tạo thành tủa $\text{Zn}(\text{OH})_2$ sẽ làm tăng khối lượng của protein, giúp khả năng lắng protein trong quá trình ly tâm thuận lợi hơn [9]. Phương pháp này cho tỷ lệ thu hồi cả được chất LEV và IS đều khá cao, loại bỏ được tạp dính vào pic IS trên sắc ký đồ và đồng thời cũng hạn chế sử dụng dung môi hữu cơ độc hại khi chiết lỏng - lỏng bằng cloroform, NH_3 , K_2HPO_4 trong nghiên cứu của Cao Ngọc Cương [6].

Điều kiện sắc ký lựa chọn pha động hạn chế sử dụng muối nồng độ cao gây khó khăn cho quá trình bảo quản cột nhưng vẫn tách tốt các pic LEV và IS trong các nền mẫu huyết tương khác nhau, pic sắc nhọn, pic đối xứng tốt.

Trên lâm sàng, nồng độ đỉnh LEV trong huyết tương (C_{max}) khi sử dụng đơn liều viên nén 500 mg hoặc 02 viên nang 250 mg ở 24 người tình nguyện khỏe mạnh sau 48 giờ tương ứng là $15,74 \pm 3,93 \mu\text{g/ml}$ và $15,33 \pm 4,49 \mu\text{g/ml}$ [10]. Các giá trị C_{max} đều nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát từ 0,0625 - 25 $\mu\text{g/ml}$. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp LLOQ = 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ nhỏ hơn 1/20 giá trị C_{max} , đáp ứng yêu cầu của US - FDA và EMA và cũng nhỏ hơn so với giá trị LLOQ = 0,25 $\mu\text{g/ml}$ trong nghiên cứu của Cao Ngọc Cương và cộng sự [6], LLOQ = 2,5 $\mu\text{g/ml}$ trong nghiên cứu của Joana G và cộng sự [4]. Tuy nhiên, LLOQ của nghiên cứu này vẫn cao hơn so với nghiên cứu của Farhan AS và cộng sự là 8,7 ng/ml nhưng nghiên cứu này lại không sử dụng IS [2].

Phương pháp đã được thẩm định đạt các yêu cầu theo US - FDA 2018 và EMA 2011 có thể ứng dụng để định lượng levetiracetam trong huyết tương.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng levetiracetam trong huyết tương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao có độ chính xác cao, độ đúng tốt, khoảng tuyến tính phù hợp, tính đặc hiệu

- chọn lọc cao và các tiêu chí khác đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US - FDA 2018 và EMA 2011. Phương pháp có thể ứng dụng trong các nghiên cứu tương đương sinh học cho chế phẩm thuốc chứa levetiracetam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Manuela C, Susan M, Fiorenzo A, Roberto R, Agostino B. Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B*. 2008; 873:129-132.
2. Farhan AS, Nawab S, Nighat S, Alisha WS, Mansoor A, Mehjebeen et al. Development of New Method for Simultaneous Analysis of Piracetam and Levetiracetam in Pharmaceuticals and Biological Fluids: Application in Stability Studies. *BioMed Research International*. 2014; 2014:1-8.
3. Jens ML, Stefanie M. Bode-Böger. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. *Journal of Chromatography B*. 2005; 819:197-200.
4. Joana G, Gilberto A, Joana B, Amílcar F, Ana F. Development and full validation of an innovative HPLC-diode array detection technique to simultaneously quantify lacosamide, levetiracetam and zonisamide in human plasma. *Bioanalysis*. 2018 Apr;10(8):541-557.
5. Nguyễn Tường Vy, Tạ Mạnh Hùng. Nghiên cứu định lượng levetiracetam trong huyết tương người bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Luận văn tốt nghiệp dược sĩ. Trường Đại học Dược Hà Nội. 2016; 34-45.
6. Cao Ngọc Cương, Trần Hoàng, Tạ Mạnh Hùng. Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích levetiracetam trong huyết tương người bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, 2018; 16 (61):13-17.
7. U.S, Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry*. 2018;1-41.
8. European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency. 2011;1-23.
9. Cara P, Pratibha S, Bev I, Vanaja R, Russell G. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2003;785:263-275.
10. Patsalos PN. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000;85:77-85.