

Ứng dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng đồng thời ba hoạt chất levodopa, carbidopa và benserazide trong thuốc điều trị bệnh Parkinson

Nguyễn Thanh Đàm¹, Nguyễn Thị Minh Tâm¹, Trần Đỗ Quốc Huy², Nguyễn Mạnh Huy^{1*}, Dương Hồng Anh³, Phạm Hùng Việt^{1*}

¹Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Phân tích Phục vụ Kiểm định Môi trường và An toàn Thực phẩm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Hoá học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 19 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển Bền vững, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/9/2024; ngày chuyển phản biện 15/9/2024; ngày nhận phản biện 20/9/2024; ngày chấp nhận đăng 25/9/2024

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, một phương pháp phân tích mới đã được xây dựng và thẩm định để xác định đồng thời levodopa (LD), carbidopa (CD) và benserazide (BZ) trong các thuốc điều trị bệnh Parkinson bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector UV-Vis mảng diode (HPLC-DAD). Các điều kiện tối ưu được lựa chọn bao gồm pha động sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là hệ đệm 100 mM KH_2PO_4 - H_3PO_4 có pH=3,5 và bổ sung sodium 1-octanesulfonate (SOSF) 0,10 mM, mẫu được xử lý bằng cách hoà tan trong dung dịch H_3PO_4 100 mM. Ở các điều kiện này, giới hạn phát hiện của thiết bị (IDL) đối với LD, CD và BZ lần lượt là 0,76; 0,19 và 0,38 mg/l. Độ lặp lại trong ngày và giữa các ngày theo độ lệch chuẩn tương đối (RSD) đều dưới 4% đối với cả thời gian lưu và diện tích peak. Phương pháp này đã được sử dụng để xác định ba hoạt chất trong các loại thuốc thực tế, với hiệu suất thu hồi dao động từ 80 đến 100%. Sự khác biệt giữa kết quả thu được từ phương pháp HPLC-DAD đã phát triển và giá trị công bố trên nhãn sản phẩm là dưới 8%.

Từ khóa: benserazide, carbidopa, levodopa, Parkinson, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Chỉ số phân loại: 1.4, 2.4, 3.4

Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous quantification of levodopa, carbidopa, and benserazide in Parkinson's drugs

Thanh Dam Nguyen¹, Thi Minh Tam Nguyen¹, Do Quoc Huy Tran², Manh Huy Nguyen^{1*}, Hong Anh Duong³, Hung Viet Pham^{1*}

¹Key Laboratory of Analytical Technology for Environmental Quality and Food Safety Control (KLATEFOS), VNU University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Chemistry, VNU University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 19 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

³Research Centre of Environmental Technology and Sustainable Development (CETASD), VNU University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 13 September 2024; revised 20 September 2024; accepted 25 September 2024

Abstract:

In this study, an analytical method was developed and validated to simultaneously determine the contents of levodopa (LD), carbidopa (CD), and benserazide (BZ) in pharmaceutical formulations used for the treatment of Parkinson's disease by using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a diode array detector (DAD). The optimal chromatographic conditions were established using an HPLC mobile phase consisting of a 100 mM KH_2PO_4 - H_3PO_4 buffer solution with a pH of 3.5 and an addition of 0.10 mM sodium 1-octanesulfonate (SOSF). The drug samples were prepared by dissolving them in a 100 mM H_3PO_4 solution to ensure complete solubilisation and stable chromatographic signals of the active ingredients. Under these optimised conditions, good sensitivity was demonstrated, with instrumental limits of detection (IDL) for LD, CD, and BZ determined to be 0.76, 0.19 and 0.38 mg/l, respectively. Precision was evaluated through intra-day and inter-day repeatability studies, with the relative standard deviation (RSD) values for both retention time and peak area consistently remaining below 4%, indicating high reproducibility. The validated method was subsequently applied to the analysis of commercial pharmaceutical tablets with recovery rates for LD, CD, and BZ ranging from 80 to 100%. The difference between the actual content determined by the HPLC-DAD method and the labelled content of the product was found to be less than 8%.

Keywords: benserazide, carbidopa, high-performance liquid chromatography, levodopa, Parkinson.

Classification numbers: 1.4, 2.4, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: manhhuydhkhtn@gmail.com; vietph@vnu.edu.vn/phamhungviet@hus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Bệnh Parkinson là một loại bệnh lý liên quan tới sự tích tụ α -synuclein, dẫn tới các hội chứng rối loạn vận động [1]. Bệnh Parkinson liên quan trực tiếp tới sự suy giảm dopamine, một chất dẫn truyền thần kinh trong não [2] và do vậy thường được điều trị bằng cách bổ sung levodopa (LD, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine), một tiền chất của dopamine [3]. Tuy nhiên, levodopa thường bị phân hủy trước khi đi qua vỏ màng não, vì vậy, các chất ức chế như carbidopa (CD, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydrazineyl-2-methylpropanoic acid) hay benserazide (BZ, 2-amino-3-hydroxy-N'-(2,3,4-trihydroxybenzyl)propanehydrazide) thường được bổ sung với tỷ lệ 1:10-1:4 (w/w) so với levodopa trong thành phần thuốc để nâng cao hiệu quả sử dụng [4].

Trong nhóm bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh Parkinson xếp thứ hai về số người mắc, chỉ sau bệnh Alzheimer. Theo thống kê năm 2016, ở Việt Nam có khoảng 65.000 người mắc bệnh và trên toàn thế giới là 6,1 triệu người; con số này đã tăng gấp gần 2,5 lần từ 2,5 triệu người mắc năm 1990 [5]. Sự gia tăng nhanh chóng về số lượng người mắc đã đặt ra nhu cầu lớn trong việc sử dụng thuốc để điều trị, kéo theo đó là yêu cầu cấp thiết trong việc kiểm định chất lượng thuốc, mà cụ thể là phân tích định lượng LD, CD và BZ.

Trong lĩnh vực phân tích dược phẩm, sắc ký lỏng (LC) là phương pháp tách chất mạnh mẽ và được sử dụng rất rộng rãi. HPLC sử dụng detector UV là phương pháp tiêu chuẩn được quy định để phân tích các thuốc chứa LD và CD trong dược điển của nhiều quốc gia như Việt Nam hay Mỹ. Phương pháp này cũng thường được sử dụng trong các nghiên cứu phân tích các hoạt chất chính hoặc tạp chất trong thuốc [6], phân tích các mẫu y sinh như huyết tương [7] hay huyết thanh [8] của người bệnh sử dụng thuốc điều trị Parkinson. Để nâng cao giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp HPLC, các detector có độ nhạy cao hơn như huỳnh quang (FL) hay khối phổ (MS) thường được sử dụng [9-13]. Một số phương pháp khác cũng được đã được sử dụng để phân tích thuốc điều trị Parkinson như phương pháp quang phổ kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến [14-18]; phương pháp điện hóa [19-23]; phương pháp điện di mao quản [24-26]. Trong các nghiên cứu trên, chỉ 1 nghiên cứu phân tích đồng thời ba hoạt chất LD, CD và BZ, các nghiên cứu còn lại chỉ xác định đồng thời LD với CD hoặc LD với BZ với đối tượng mẫu là mẫu thuốc hoặc mẫu y sinh [19].

Tại Việt Nam, hiện chưa có công bố về hướng nghiên cứu định lượng ba hoạt chất nói trên trong thuốc điều trị bệnh Parkinson, ngoại trừ một nghiên cứu về CE-C⁴D của chính các tác giả [27]. Thiết bị được sử dụng trong nghiên

cứu này là hệ CE-C⁴D tự chế tạo vận hành bằng tay, do vậy khó có thể đáp ứng được các yêu cầu vận hành ổn định, lâu dài với số lượng mẫu lớn. Các hệ thống HPLC với ưu điểm độ ổn định cao là giải pháp phù hợp hơn với những phân tích số lượng lớn. Mặc dù vậy, Dược điển Việt Nam cũng chưa có phương pháp tương ứng để xác định BZ. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phát triển một quy trình phân tích trên HPLC sử dụng detector UV-Vis mảng diode (DAD) để xác định đồng thời LD, CD và BZ trong thuốc điều trị bệnh Parkinson.

2. Thực nghiệm

2.1. Hoá chất

Benserazide hydrochloride, levodopa và carbidopa monohydrate được đặt mua từ Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Nhật Bản). Các hoá chất được sử dụng để chuẩn bị pha động, bao gồm potassium dihydrogen phosphate rắn (99%), dung dịch phosphoric acid 85%, được mua từ Merck KGaA (Darmstadt, Đức). Các hoá chất khác được sử dụng để chuẩn bị mẫu (dung dịch HCl 37% (w/w)) được mua từ Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Đức).

Dung dịch chuẩn gốc của LD, CD và BZ với nồng độ 1000 mg/l mỗi chất được chuẩn bị bằng cách hoà tan một lượng chính xác mỗi chất trong dung dịch H₃PO₄ 100 mM. Các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ khác nhau thu được bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng nước deion với các hệ số pha loãng thích hợp. Dung dịch chuẩn gốc được pha mới hàng tháng trong khi các dung dịch chuẩn làm việc được chuẩn bị mới hàng ngày. Các dung dịch đều được bảo quản lạnh ở 4°C trước khi sử dụng.

2.2. Thiết bị

Các thí nghiệm được tiến hành trên hệ thống HPLC-DAD 20A của Shimadzu (Nhật Bản) với cột tách pha đảo C18 Shim-pack VP-ODS (kích thước cột 4,6 x 25 mm và đường kính hạt nhỏ 5 μ m) và detector DAD SPD-M20A. Thể tích mẫu bơm là 50 μ l. Detector DAD được cài đặt để đo phổ trong dải 200-800 nm và các sắc ký đồ được ghi ở 282 nm.

2.3. Quy trình phân tích

Pha động được sử dụng là dung dịch đệm phosphate KH₂PO₄-H₃PO₄ trong dung môi nước có bổ sung sodium 1-octanesulfonate (SOSF) và chạy ở chế độ đẳng dòng ở 1,0 ml/min. Trong quá trình tối ưu hóa điều kiện phân tích, nồng độ của hệ đệm phosphate được khảo sát trong khoảng 50-150 mM với pH được thay đổi từ 3,0 đến 4,0 và SOSF được thêm vào tới mức nồng độ 0,05-0,15 mM. Việc thẩm định quy trình phân tích và đo các mẫu thực tế được thực hiện

ở các điều kiện phân tích tối ưu được tìm thấy, bao gồm hệ đệm 100 mM KH_2PO_4 - H_3PO_4 với pH=3,5 và bổ sung SOSF nồng độ 0,1 mM. Các chất phân tích được phát hiện và định lượng ở bước sóng 282 nm.

2.4. Lấy mẫu và xử lý mẫu

Trong nghiên cứu này, hai loại thuốc điều trị bệnh Parkinson dạng viên là Madopar (chứa 200 mg LD và 50 mg BZ trong mỗi viên) được sản xuất bởi Delpharm Milano (Segrate, Ý) và Syndopa (chứa 250 mg LD và 25 mg CD mỗi viên) được sản xuất bởi Roche (Shanghai Branch, Trung Quốc) đã được thu thập tại các nhà thuốc ở Hà Nội. Năm viên thuốc được cân khối lượng, sau đó nghiền thành bột và khối lượng bột chính xác tương ứng với một viên thuốc được hoà tan trong 100 ml dung dịch H_3PO_4 100 mM và siêu âm trong vòng 20 phút. Dung dịch thu được sau đó được pha loãng bởi dung dịch H_3PO_4 100 mM tới nồng độ 100 mg/l LD, 25 mg/l BZ và 10 mg/l CD. Mẫu sau khi pha loãng được lọc qua màng lọc nylon với kích thước lỗ 0,45 μm trước khi được bơm vào hệ HPLC.

2.5. Xử lý thông kê

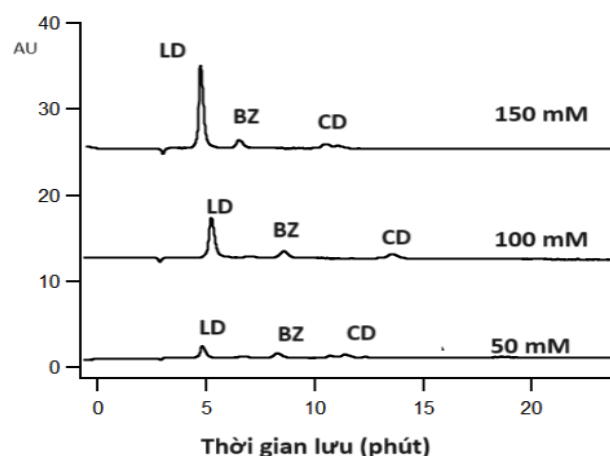
Sắc ký đồ và các thông tin của peak chất phân tích được ghi nhận và xử lý bởi phần mềm Shimadzu Lab Solution. Các xử lý thông kê được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel 365.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phát triển quy trình phân tích

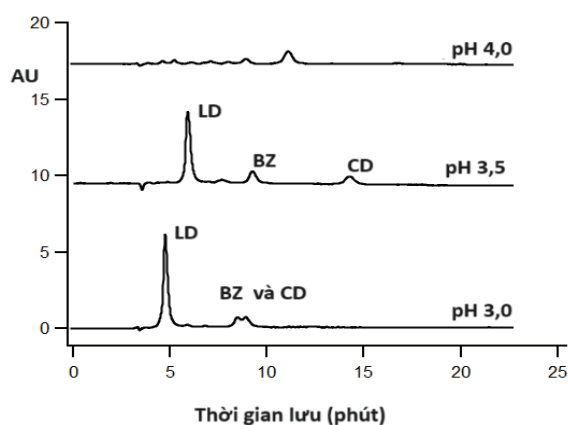
Dược điển của Việt Nam chỉ quy định phương pháp phân tích đồng thời LD và CD trong các mẫu được phẩm thay vì phân tích đồng thời cả ba hoạt chất này và chưa có phương pháp phân tích cho BZ. Vì vậy, bước đầu tiên là kiểm tra sự phù hợp của phương pháp hiện có này đối với nhu cầu phân tích đồng thời LD, CD và BZ. Pha động là hệ đệm 100 mM KH_2PO_4 - H_3PO_4 có pH=3,0, cột tách được sử dụng là cột C18, nhiệt độ cột được giữ không đổi ở 30°C và tốc độ dòng được cố định ở 1,0 ml/phút. Kết quả cho thấy, độ phân giải giữa hai peak LD và BZ đều khá thấp (nhỏ hơn 1,0), khẳng định rằng điều kiện này không thích hợp để phân tích đồng thời LD, CD và BZ và việc phát triển một quy trình phân tích mới là cần thiết. Bên cạnh đó, trong dược điển của Mỹ, pha động được sử dụng ngoài hệ đệm phosphate, còn có sự bổ sung của sodium 1-decanesulfonate nhằm tăng cường khả năng tách và độ nhạy của phương pháp. Do vậy, trong nghiên cứu này, thành phần pha động cũng được bổ sung SOSF với mục tiêu tương tự. Việc sử dụng SOSF thay thế cho sodium 1-decanesulfonate xuất phát từ hạn chế trong việc tiếp cận hoá chất này.

Khảo sát nồng độ pha động: Các pha động với thành phần phosphoric acid hoặc hệ đệm phosphoric acid-muối dihydrogen phosphate đã được chứng minh là phù hợp để phân tích LD và CD và được sử dụng trong các Dược điển. Tuy nhiên, do bản chất cột C18 không thích hợp với những pha động có pH thấp <2. Do vậy, trong nghiên cứu này, pha động được sử dụng là hệ đệm H_3PO_4 - KH_2PO_4 với nồng độ của KH_2PO_4 nằm trong khoảng 50-150 mM và pH được giữ cố định ở 3,5, bổ sung 0,1 mM SOSF. Các sắc ký đồ được thể hiện trên hình 1 cho thấy khi tăng nồng độ pha động, diện tích peak có xu hướng tăng lên, đặc biệt là với peak LD. Ngược lại, sự biến đổi về thời gian lưu diễn ra phức tạp hơn, khi có xu hướng tăng từ nồng độ 50 mM tới 100 mM và giảm xuống ở nồng độ 150 mM. Điều kiện nồng độ KH_2PO_4 100 mM cho độ phân giải tốt hơn cả, và do vậy, được lựa chọn để sử dụng trong các khảo sát tiếp theo.

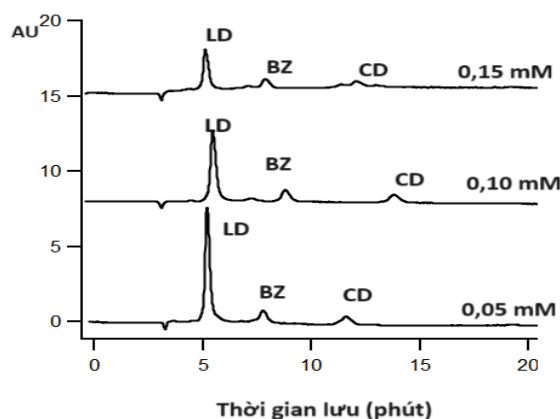


Hình 1. Sắc ký đồ phân tích đồng thời levodopa, carbidopa và benserazide bằng HPLC-DAD với pha động chứa nồng độ khác nhau của hệ đệm KH_2PO_4 - H_3PO_4 ở pH=3,5, bổ sung 0,1 mM SOSF. Nồng độ levodopa, carbidopa và benserazide lần lượt là 40, 10 và 20 mg/l.

Khảo sát pH của pha động: pH của pha động sau đó được thay đổi trong khoảng 3,0 tới 4,0, trong khi nồng độ KH_2PO_4 được giữ không đổi ở 100 mM và bổ sung 0,1 mM SOSF. Kết quả thu được trên hình 2 cho thấy, khi tăng pH, diện tích peak có xu hướng giảm dần và thời gian lưu tăng dần. Ở điều kiện pH=4,0, không thể xác định được các peak chất phân tích, trong khi ở pH=3,0, hai peak BZ và CD không thể tách ra khỏi nhau. Điều kiện pH=3,5 cho sự phân tách tốt nhất với cả ba chất phân tích khi độ phân giải giữa LD-BZ và BZ-CD đều lớn hơn 2,0. Do vậy, pH=3,5 tiếp tục được sử dụng trong các khảo sát kế tiếp.

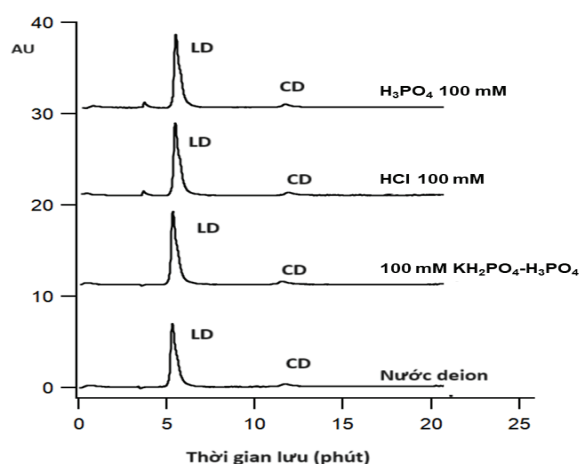


Hình 2. Sắc ký đồ phân tích đồng thời levodopa, carbidopa và benserazide bằng HPLC-DAD với pha động ở các pH khác nhau của hệ đệm 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$, bổ sung 0,1 mM SOSF. Nồng độ levodopa, carbidopa và benserazide lần lượt là 40, 10 và 20 mg/l.

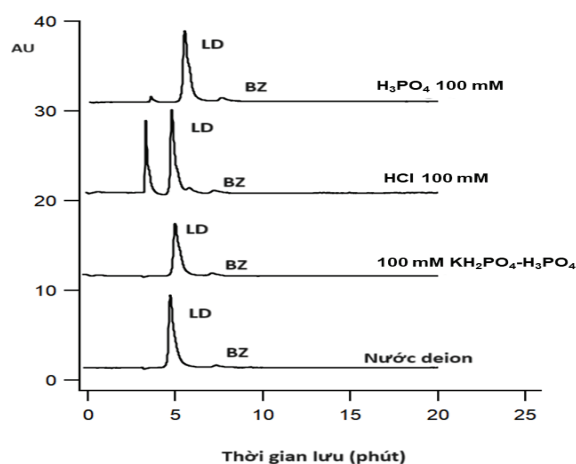


Hình 3. Sắc ký đồ phân tích đồng thời levodopa, carbidopa và benserazide bằng HPLC-DAD với pha động là hệ đệm 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ ở pH=3,5 chứa nồng độ khác nhau chất bổ trợ SOSF. Nồng độ levodopa, carbidopa và benserazide lần lượt là 40, 10 và 20 mg/l.

(A)



(B)



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC-DAD phân tích các mẫu thuốc được xử lý bằng các dung dịch khác nhau. (A) Mẫu thuốc chứa levodopa và carbidopa; (B) Mẫu thuốc chứa levodopa và benserazide.

Khảo sát nồng độ chất bổ trợ SOSF: Sau khi xác định được thành phần và pH của pha động (hệ đệm 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$, pH=3,5), nồng độ của chất bổ trợ SOSF tiếp tục được khảo sát trong khoảng 0,05-0,15 mM. Các sắc ký đồ thu được trên hình 3 cho thấy, khi tăng nồng độ chất bổ trợ, diện tích peak có xu hướng giảm dần và thời gian lưu tăng dần. Điều kiện nồng độ SOSF 0,05 mM cho tín hiệu chất phân tích lớn nhất, tuy nhiên, độ phân giải giữa LD và BZ lại là thấp nhất. Ngược lại, điều kiện SOSF 0,15 mM cho diện tích peak nhỏ nhất và độ phân giải lớn nhất. Để đảm bảo cả hai yếu tố diện tích peak và độ phân giải thu được đều tốt, điều kiện nồng độ 0,10 mM SOSF được lựa chọn.

Khảo sát điều kiện xử lý mẫu: Việc phân tích các thuốc điều trị bệnh Parkinson với thành phần LD, CD và BZ thường được thực hiện đơn giản bằng việc nghiền nhỏ và hoà tan viên thuốc trong dung môi nước. Trong nghiên cứu này, các dung dịch khác nhau trong dung môi nước đã được sử dụng để đánh giá khả năng áp dụng trong việc hoà tan thuốc, bao gồm: nước, dung dịch HCl 100 mM, dung dịch H_3PO_4 100 mM và dung dịch đệm 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ pH=3,5. Hai loại thuốc, bao gồm một mẫu chứa thành phần LD và CD và mẫu còn lại chứa LD và BZ, đã được sử dụng. Kết quả thu được trên hình 4 cho thấy, dung môi nước, dung dịch đệm $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ cho tín hiệu phân tích của BZ khá kém, trong khi dung dịch HCl 100 mM có ảnh hưởng của nền mẫu lớn khi xuất hiện một peak khá lớn bên cạnh peak LD. Việc sử dụng dung dịch H_3PO_4 100 mM đem lại kết quả tốt hơn cả và được lựa chọn để hòa tan mẫu thuốc.

3.2. Thẩm định quy trình phân tích

Sau khi xác định được các điều kiện phân tích và xử lý mẫu phù hợp, bao gồm pha động là hệ đệm 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ pH=3,5, bổ sung SOSF nồng độ 0,1 mM và hoà tan mẫu trong dung dịch H_3PO_4 100 mM, quy trình phân tích được đánh giá thông qua các thông số: giới hạn phát hiện của thiết bị và của phương pháp (IDL và MDL), giới hạn định lượng của thiết bị và của phương pháp (IQL và MQL), đường chuẩn, độ chụm và độ chính xác. Với phương pháp HPLC-DAD đã phát triển, IDL và IQL được xác định là nồng độ cho tỷ lệ tín hiệu/nhiều nền (S/N) bằng 3 và bằng 10 tương ứng; trong khi MDL và MQL được xác định dựa trên IDL và IQL, có tính đến quá trình xử lý mẫu. Các giá trị IDL thu được đối với ba chất phân tích từ 0,19 (với CD) tới 0,76 mg/l (với LD) và IQL đạt được từ 0,63 tới 2,50 mg/l. Với giả thiết các mẫu thuốc được phân tích có khối lượng 0,5 g, được hòa tan trong 100 ml dung dịch H_3PO_4 100 mM và sau đó pha loãng 10 lần, các giá trị MDL thu được đối với LD, CD và BZ lần lượt là 1,52; 0,38 và 0,76 mg/g và các giá trị MQL đạt được nằm trong khoảng 1,27 mg/g (với CD)-5,07 mg/g (với LD).

Đường chuẩn được xây dựng với 6 điểm chuẩn trong khoảng 5,0-160 mg/l đối với LD, 1,25-40 mg/l đối với CD và 2,5-80 mg/l đối với BZ. Hệ số tương quan tuyến tính R^2 của ba đường chuẩn thu được đều lớn hơn 0,999 cho thấy mối tương quan cao giữa nồng độ và diện tích peak của các chất phân tích (bảng 1).

Bảng 1. Thông số giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, phương trình đường chuẩn và hệ số tương quan của phương pháp HPLC-DAD.

Chất phân tích	IDL (mg/l)	MDL* (mg/g)	IQL (mg/l)	MQL** (mg/g)	Phương trình đường chuẩn***	R^2
LD	0,76	1,38	2,50	5,07	$y=9385x+6605$	0,9997
BZ	0,38	0,76	1,25	2,53	$y=1984x-731$	0,9995
CD	0,19	0,38	0,63	1,27	$y=4537x+321$	0,9998

$$*MDL (mg/g) = IDL (mg/l) \times \frac{DF \times V (L)}{m (g)};$$

$$** MQL (mg/g) = IQL (mg/l) \times \frac{DF \times V (L)}{m (g)};$$

trong đó: DF là hệ số pha loãng, V là thể tích dung dịch H_3PO_4 dùng để hòa tan mẫu thuốc và m là khối lượng mẫu thuốc được phân tích. Các giá trị MDL và MQL trong bảng được xác định với DF=10, V=0,1 L và m=0,5 g.

*** y: diện tích peak (mAU.min), x: nồng độ chất phân tích (mg/l).

Độ chụm của phương pháp được đánh giá thông qua độ lặp lại trong ngày (n=5) và độ lặp lại giữa các ngày (n=3), thể hiện thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD) về thời gian lưu và diện tích peak. Các kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, các giá trị RSD thu được trong ngày nhỏ hơn 1% cho thời gian lưu và nhỏ hơn 2% đối với diện tích peak; trong khi các giá trị này trong đánh giá độ lặp lại giữ các ngày là 3 và 4% tương ứng. Các số liệu này cho thấy phương pháp HPLC-DAD có độ chụm tốt, đảm bảo việc phân tích thường xuyên, liên tục.

Bảng 2. Độ lệch chuẩn tương đối về thời gian lưu và diện tích peak trong các đánh giá độ lặp lại trong ngày và độ lặp lại giữa các ngày.

Chất phân tích	Độ lặp lại trong ngày (n=5)		Độ lặp lại giữa các ngày (n=3)	
	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)
LD	0,4	2,0	0,5	2,9
BZ	0,6	3,7	1,9	0,4
CD	0,5	2,6	1,5	1,3

*RSD^a: độ lệch chuẩn tương đối về thời gian lưu; RSD^b: độ lệch chuẩn tương đối về diện tích peak.

Độ đúng của phương pháp HPLC-DAD đã phát triển được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi bằng cách phân tích mẫu thêm chuẩn trên các nền mẫu thực (bảng 3). Mẫu thực được chuẩn bị như trong mục 2.4 và nền mẫu được tạo ra bằng cách pha loãng dung dịch mẫu thuốc với các hệ số khác nhau (0, 2 và 4 lần). Các chất phân tích được thêm vào để thu được nồng độ chất phân tích gấp hai lần nồng độ trong nền mẫu. Hiệu suất thu hồi đạt được với CD và BZ đều rất tốt, nằm trong khoảng 92-100%, trong khi giá trị thu được đối với LD thấp hơn, dao động từ 80-90%.

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi của phương pháp HPLC-DAD trên các nền mẫu khác nhau.

Nền mẫu thực	Thêm chuẩn để đạt được	Hiệu suất thu hồi (%)		
		Levodopa	Carbidopa	Benserazide
25% mẫu 1	50% mẫu 1	80,8	94,8	-
50% mẫu 1	100% mẫu 1	87,3	97,8	-
100% mẫu 1	200% mẫu 1	81,3	99,9	-
25% mẫu 3	50% mẫu 3	83,5	-	92,8
50% mẫu 3	100% mẫu 3	90,3	-	97,8
100% mẫu 3	200% mẫu 3	86,5	-	99,1

*Ký hiệu (-) thể hiện mẫu phân tích không chứa chất mục tiêu.

3.3. Phân tích mẫu thực

Bốn mẫu thực, trong đó mẫu 1 và mẫu 2 chứa LD và CD, mẫu 3 và mẫu 4 chứa LD và BZ, được phân tích theo quy trình HPLC-DAD đã phát triển. Các kết quả thu được được trình bày trên bảng 4 cho thấy, nồng độ đo được theo HPLC-DAD chỉ sai khác dưới 8% so với giá trị được công bố trên nhãn thuốc.

Bảng 4. Kết quả phân tích các mẫu thuốc điều trị Parkinson bằng phương pháp HPLC-DAD.

		Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4
Nồng độ đo được (mg/l)	LD	20,55	21,21	19,61	19,76
	BZ	-	-	4,92	4,62
	CD	2,10	2,10	-	-
Hàm lượng đo được (mg/viên)	LD	256,9	265,1	196,1	197,6
	BZ	-	-	49,25	46,22
	CD	26,26	26,34	-	-
Hàm lượng trên nhãn (mg/viên)	LD	250	250	200	200
	BZ	0	0	50	50
	CD	25	25	0	0
Sai khác*	LD	-2,7%	-6,0%	2,0%	1,2%
	BZ	-	-	1,5%	7,6%
	CD	-5,0%	-5,4%	-	-

*Sai khác=(Hàm lượng trên nhãn-Hàm lượng đo được theo HPLC-DAD)/Hàm lượng đo được theo HPLC-DAD * 100 (%). Ký hiệu (-) thể hiện mẫu phân tích không chứa chất mục tiêu.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được một quy trình phân tích trên HPLC-DAD để định lượng đồng thời các hoạt chất LD, CD và BZ trong một số loại thuốc điều trị bệnh Parkinson. Các kết quả thu được cho thấy khả năng phân tích đã phát triển có giới hạn phát hiện phù hợp cho việc phân tích các dược phẩm với độ đúng và độ chính xác tốt. Kết quả đo mẫu thực tế cho thấy các mẫu được phân tích có hàm lượng sai khác không quá 8% so với nhãn sản phẩm. Những dữ liệu thu được chỉ ra rằng phương pháp HPLC-DAD đã xây dựng có thể được sử dụng cho nhu cầu kiểm soát chất lượng dược phẩm điều trị bệnh Parkinson.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.23.11 của Đại học Quốc gia Hà Nội. Nguyễn Thanh Đàm được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sỹ, tiến sỹ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.TS019. Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R.B. Postuma, D. Berg, C.H. Adler, et al. (2016), "The new definition and diagnostic criteria of Parkinson's disease", *Lancet Neurol.*, **15**(6), pp.546-548, DOI: 10.1016/S1474-4422(16)00116-2.
- [2] M. Jahangeer, M. Ashiq, A. Ghaffar, et al. (2021), "Dopamine in Parkinson's disease", *Clin. Chim. Acta.*, **522**, pp.114-126, DOI: 10.1016/j.cca.2021.08.009.
- [3] P.A. LeWitt, S. Fahn (2016), "Levodopa therapy for Parkinson disease", *Neurology*, **86**, pp.S3-S12, DOI:10.1212/WNL.0000000000002509.
- [4] N. Nishikawa, M. Nagai, T. Tsujii, et al. (2014), "Pharmacokinetics of levodopa/benserazide versus levodopa/carbidopa in healthy subjects and patients with Parkinson's disease", *Neurology and Clinical Neuroscience*, **3**(2), pp.68-73, DOI: 10.1111/ncn3.152.
- [5] G.B.D.P.S.D. Collaborators (2018), "Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: A systematic analysis for the global burden of disease study", *Lancet. Neurol.*, **17**(11), pp.939-953, DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30295-3.
- [6] A. Vemic, I. Stamenkovic, A. Malenovic, et al. (2013), "Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **77**, pp.9-15, DOI: 10.1016/j.jpba.2013.01.007.
- [7] H.L. Wu, Y.J. Yu, Y.N. Li, (2010), "Quantitative analysis of levodopa, carbidopa and methyl dopa in human plasma samples using HPLC-DAD combined with second-order calibration based on alternating trilinear decomposition algorithm", *Talanta*, **81**(3), pp.805-812, DOI: 10.1016/j.talanta.2010.01.019.
- [8] F. Ibrahim, Z.A. Sheribah, H. Alaa, et al. (2018), "Micellar HPLC-UV method for the simultaneous determination of levodopa, carbidopa and entacapone in pharmaceuticals and human plasma", *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1091**, pp.36-45, DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.05.030.
- [9] D. Wu, H. Xie, Q.L. Zhang, et al. (2017), "Simultaneous and sensitive determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical formulation and human serum by high performance liquid chromatography with on-line gold nanoparticles-catalyzed luminol chemiluminescence detection", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **45**(6), pp.e1726-e1733, DOI: 10.1016/S1872-2040(17)61021-1.
- [10] Y. Guo, Z. Li, J. Chen, et al. (2010), "Simultaneous determination of levodopa, benserazide and 3-O-Methyldopa in human serum by LC-MS-MS", *Chromatographia*, **72**(7-8), pp.627-633, DOI: 10.1365/s10337-010-1683-x.
- [11] V. Junnotula, H.L. Perez (2013), "Development and validation of a simple and sensitive method for quantification of levodopa and carbidopa in rat and monkey plasma using derivatization and UPLC-MS/MS", *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **926**, pp.47-53, DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.03.004.

- [12] F.L. Pontes, B.M. Marson, R.P.P. Ribeiro, et al. (2014), "A new HILIC-MS/MS method for the simultaneous analysis of carbidopa, levodopa, and its metabolites in human plasma", *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **967**, pp.41-49, DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.06.030.
- [13] J. Chi, Y. Ling, R. Jenkins, et al. (2017), "Quantitation of levodopa and carbidopa in rat plasma by LC-MS/MS: The key role of ion-pairing reversed-phase chromatography", *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1054**, pp.1-9, DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.04.001.
- [14] L.A. Hussein, M.F. Ayad, M.M. Youssef, "Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture", *Spectrochim Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **171**, pp.236-245, DOI: 10.1016/j.saa.2016.07.053.
- [15] W.H. Kim, M.M. Karim, S.H. Lee (2008), "Simultaneous determination of levodopa and carbidopa by synchronous fluorescence spectrometry using double scans", *Anal. Chim. Acta.*, **619(1)**, pp.2-7, DOI: 10.1016/j.aca.2008.01.006.
- [16] M. Chamsaz, A. Safavi, J. Fadaee (2007), "Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of carbidopa, levodopa and methyl dopa in the presence of citrate with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks", *Anal. Chim. Acta.*, **603(2)**, pp.140-146, DOI: 10.1016/j.aca.2007.09.006.
- [17] A. Safavi, M. Tohidi (2007), "Simultaneous kinetic determination of levodopa and carbidopa by H-point standard addition method", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44(1)**, pp.313-318, DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.020.
- [18] J. Tashkhourian, M.R.H. Nezhad, J. Khodaveisi (2011), "Application of silver nanoparticles and principal component-artificial neural network models for simultaneous determination of levodopa and benserazide hydrochloride by a kinetic spectrophotometric method", *Spectrochim Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **82(1)**, pp.25-30, DOI: 10.1016/j.saa.2011.06.014.
- [19] M.P. Ortiz, M. Bravo, A.C. Olivieri, et al. (2010), "Simultaneous voltammetric determination of levodopa, carbidopa and benserazide in pharmaceuticals using multivariate calibration", *Talanta*, **82(3)**, pp.962-968, DOI: 10.1016/j.talanta.2010.05.071.
- [20] M.M. Ardakani, A. Khoshroo (2013), "Nano composite system based on coumarin derivative-titanium dioxide nanoparticles and ionic liquid: Determination of levodopa and carbidopa in human serum and pharmaceutical formulations", *Anal. Chim. Acta.*, **798**, pp.25-32, DOI: 10.1016/j.aca.2013.08.045.
- [21] E.K. Savan, G. Erdoğdu (2017), "Simultaneous determination of levodopa and benserazide using poly(3-methylthiophene) and a multi-walled carbon nanotube sensor", *Journal of Solid State Electrochemistry*, **21(8)**, pp.2209-2217, DOI: 10.1007/s10008-017-3549-8.
- [22] M.S. Kalkhoran, F. Faridbod, M.R. Ganjali, et al. (2017), "Praseodymium molybdate nanoplates/reduced graphene oxide nanocomposite based electrode for simultaneous electrochemical determination of entacapone, levodopa and carbidopa", *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, **29(1)**, pp.20-31, DOI: 10.1007/s10854-017-7882-6.
- [23] M.A. Taher, S. Cheraghi, F. Karimi, et al. (2019), "Voltammetric amplified platform based on ionic liquid/NiO nanocomposite for determination of benserazide and levodopa", *Journal of Molecular Liquids*, **278**, pp.672-676, DOI: 10.1016/j.molliq.2019.01.081.
- [24] G. Chen, Q. Hu, Y. Fang (2001), "Separation and determination of levodopa and carbidopa in composite tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection", *Analytica Chimica Acta.*, **431(2)**, pp.287-292, DOI: 10.1016/S0003-2670(00)01327-1.
- [25] Y. Zhou, J. Liang, P.G. He, et al. (2005), "Determination of levodopa and benserazide hydrochloride in pharmaceutical formulations by cze with amperometric detection", *Chromatographia*, **61(5-6)**, pp.265-270, DOI: 10.1365/s10337-005-0515-x.
- [26] W.W. He, X.W. Zhou, J.Q. Lu (2006), "Simultaneous determination of benserazide and levodopa by capillary electrophoresis-chemiluminescence using an improved interface", *Journal of Chromatography A*, **1131(1)**, pp.289-292, DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.071.
- [27] M.T.N. Thi, T.D. Nguyen, M.H. Nguyen, et al. (2023), "A simple method for simultaneous determination of levodopa, carbidopa, and benserazide in parkinson's drugs by capillary electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection", *The 8th Analytica Vietnam Conference*, Vietnam National University Press, Hanoi.