

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. The Committee on JP (2021), *The Japanese Pharmacopoeia XVIII: L-Carbocysteine monograph; L-Carbocysteine tablets; Salbutamol sulfate monograph*.
2. Council of Europe, *British Pharmacopoeia 2025*.
3. United States Pharmacopoeial Convention (2025), *The United States Pharmacopoeia 2025*.
4. Dương Đình Chung, Nguyễn Hữu Khánh Quan, Trương Thị Thu Thảo, Nguyễn Thị Ngọc Yến, Phương pháp Rp-HPLC định lượng đồng thời Salbutamol và Bromhexin trong si-rô thuốc, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Số 9* (2020), 6-9.
5. P N S Pai, G K Rao, M S Murthy, A Agarwal, S Puranik, Simultaneous Determination of Salbutamol Sulphate and Bromhexine Hydrochloride in Tablets by Reverse Phase Liquid Chromatography, *Indian J Pharm Sci.* (2009); 71(1): 53–55. doi: 10.4103/0250-474X.51957.
6. Sravani Ratnam Arji, Sarma SRS Eranki, Anitha Kadimi, Prakash Nathaniel Kumar Sarella and Vinny Therissa Mangam, Development and validation of an HPLC method for the simultaneous estimation of salbutamol, theophylline and ambroxol in tablet dosage form, *International Journal of Science and Research Archive*, (2023), 10(02), 634–645.
7. Bộ Y tế (2022), *Thông tư 08/2022/TT-BYT, Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc*.
8. ICH (2023), *Q2(R2) Validation of analytical procedures*.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TELMISARTAN AND HYDROCHLOROTHIAZIDE IN HUMAN PLASMA BY LC-MS/MS METHOD

NGUYEN THI CHAM¹, DOAN CAO SON¹,
VU ANH TUAN², HOANG VAN DUC¹, LE THI LA¹, ✉

¹National Institute of Drug Quality Control

²Faculty of Chemistry, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

✉Corresponding author: la.tdsh@gmail.com

Received October 10th, 2025; Accepted November 19th, 2025

Abstract: A high and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma was developed. Telmisartan-d3 and hydrochlorothiazide-13C,d2 were utilized as internal standards. Analytes were extracted from plasma by protein precipitation using acetonitrile combined with sample freezing. Liquid chromatography was performed on Luna C18(2)-HST; (50 x 3 mm; 2.5µm) column with mixture of methanol and 5 mM ammonium acetate, with 0.1% acetic (80 : 20, tt/tt) as mobile phase at flow rate of 0.3 mL per minute. The method has a rapid analysis time and LLOQ value and standard curves were found to be linear in the wide range 1 to 1000 ng/mL for TEL and 1 to 400 ng/mL for HCT. The method's precision and accuracy are within acceptable limit. The validated method has been used successfully to determine telmisartan and hydrochlorothiazide concentrations in healthy adult volunteers and demonstrate its applicability to bioavailability/bioequivalence studies of telmisartan and hydrochlorothiazide combination preparations.

Keywords: telmisartan, hydrochlorothiazide, plasma, LC-MS/MS.

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI TELMISARTAN VÀ HYDROCHLOROTHIAZID TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

NGUYỄN THỊ CHÂM¹, ĐOÀN CAO SƠN¹,
VŨ ANH TUẤN², HOÀNG VĂN ĐỨC¹, LÊ THỊ LA¹✉

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

²Khoa Hóa học, Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách Khoa Hà Nội

✉Tác giả liên hệ: la.tdsh@gmail.com

Nhận bài ngày 10 tháng 10 năm 2025

Chấp nhận đăng ngày 19 tháng 11 năm 2026

Tóm tắt: Nghiên cứu phát triển một phương pháp định lượng đồng thời 2 dược chất telmisartan và hydrochlorothiazid trong mẫu huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS-MS), trong đó telmisartan-d3 và hydrochlorothiazid-13C₂d₂ được sử dụng làm chuẩn nội tương ứng. Các chất phân tích được chiết tách từ huyết tương bằng phương pháp tủa protein sử dụng acetonitril có kết hợp đông lạnh mẫu. Chương trình sắc ký được thực hiện trên cột Luna C18(2)-HST; (50 x 3 mm; 2,5µm) với chương trình gồm hai thành phần pha động là methanol và amoni acetat 5 mM chứa acid acetic 0,1% (80 : 20, tt/tt), tốc độ dòng 0,3 mL/phút. Phương pháp có thời gian phân tích ngắn, có giá trị LLOQ thấp, khoảng tuyến tính rộng từ 1 đến 1000 ng/mL cho TEL; 1 đến 400 ng/mL cho HCT, có độ đúng và độ chính xác đáp ứng yêu cầu. Phương pháp đã được ứng dụng để định lượng nồng độ 2 hoạt chất nghiên cứu trong mẫu huyết tương người tình nguyện cho thấy phù hợp để sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học của các chế phẩm chứa đồng thời telmisartan và hydrochlorothiazid.

Từ khóa: telmisartan, hydrochlorothiazid, huyết tương, LC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Telmisartan (TEL) là chất đối kháng thụ thể angiotensin II, có tác dụng ngăn chặn Angiotensin II gây co mạch và các tác dụng khác liên quan đến tăng huyết áp. Hydrochlorothiazid (HCT) làm tăng bài tiết ion natri, clorid và kéo theo nước, có tác dụng hạ huyết áp. Tuy nhiên tác dụng hạ huyết áp của HCT thể hiện chậm sau 1 – 2 tuần, còn tác dụng lợi tiểu xảy ra nhanh, có thể thấy ngay sau vài giờ. HCT làm tăng tác dụng của các thuốc hạ huyết áp khác [1, 2].

Hiện nay, sự kết hợp giữa thuốc đối kháng thụ thể angiotensin II, telmisartan và thuốc lợi tiểu, hydrochlorothiazid đã được chứng minh là có hiệu quả trong điều trị tăng huyết áp, có tác dụng chống tăng huyết áp cộng lực làm giảm huyết áp ở mức độ lớn hơn so với chỉ dùng mỗi thành phần đơn lẻ [1, 2]. Sau khi uống liều đơn chế phẩm telmisartan/hydrochlorothiazid hàm lượng 40 mg/12,5 mg, nồng độ cực đại trong huyết tương của TEL và HCT rất thấp, TEL khoảng 140 – 170 ng/mL và HCT khoảng 60 – 80 ng/mL nên việc xác định nồng độ TEL, HCT trong các mẫu huyết tương người đòi hỏi

phải có phương pháp chiết tách phù hợp và phương pháp phân tích có độ nhạy cao như LC-MS/MS [5, 6, 12, 13]. Hơn nữa, hiện nay ở Việt Nam vẫn chưa có công bố cho phương pháp định lượng đồng thời hai dược chất trên trong huyết tương người.

Vi vậy, để đáp ứng yêu cầu đánh giá tương đương sinh học cho các chế phẩm kết hợp telmisartan / hydrochlorothiazid và dựa vào trang thiết bị hiện có, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng đồng thời TEL và HCT trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ (LC-MS/MS).

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị và dụng cụ được quản lý và hiệu chuẩn theo quy định của ISO/IEC 17025 và GLP gồm: Máy sắc ký lỏng khối phổ TSQ vantage (Thermo – Mỹ); cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác d = 0,01 mg); tủ lạnh sâu -35°C (Panasonic – Nhật Bản); tủ lạnh

sâu -70°C (PHCBI, Nhật Bản); máy ly tâm lạnh (Sigma 4-16KS – Đức); máy cô bay hơi dung môi dùng khí nitơ, máy lắc xoay, máy lọc nước, ...

Các dụng cụ: Bình định mức, ống chiết thủy tinh, pipet thủy tinh, ống ly tâm 2 mL... đạt tiêu chuẩn loại A.

2.1.2. Hóa chất, chất chuẩn

Chất chuẩn gồm telmisartan của Viện Kiểm nghiệm thuốc TW, SKS: C0219329.02, hàm lượng 100,5% tính theo nguyên trạng; hydrochlorothiazid của Viện Kiểm nghiệm thuốc TW, SKS: C0219308.02, hàm lượng 99,8% tính theo nguyên trạng.

Các chất chuẩn nội gồm: telmisartan-d3 (TEL-d3) của Toronto Research Chemicals, SKS: 1-TEK-100-2, hàm lượng 97% tính theo nguyên trạng; hydrochlorothiazid-13C,d2 (HCT-13C,d2) của Toronto Research Chemicals, SKS: 1-MJA-136-2, hàm lượng 98% tính theo nguyên trạng.

Dung môi, hóa chất: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích hoặc sắc ký HPLC và LCMS.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu huyết tương trắng: chứa chất chống đông Na₂EDTA; không có TEL và HCT. Mẫu huyết tương tự tạo: là các mẫu huyết tương trắng cho thêm chuẩn TEL và HCT.

Mẫu huyết tương của người tình nguyện uống viên nén telmisartan/hydrochlorothiazid (40 mg/12,5 mg) trong nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Xây dựng phương pháp

* Lựa chọn chuẩn nội

Trong phương pháp phân tích bằng sắc ký lỏng khối phổ, chất nội chuẩn được ưu tiên lựa chọn là các chất đồng vị ổn định. Các chất đồng vị này có ưu điểm nổi bật là tính chất hóa lý gần như tương tự chất phân tích nên giảm được sai số trong cả quá trình xử lý mẫu và phân tích mẫu trên thiết bị phân tích. Vì vậy, tiến hành lựa chọn TEL-d3 là chuẩn nội cho TEL và HCT-13C,d2 là chuẩn nội cho HCT.

* Khảo sát điều kiện khối phổ

Đưa vào thiết bị khối phổ dung dịch chuẩn có nồng độ TEL và HCT cùng mức là 500 ng/mL trong hỗn hợp methanol – nước (1 : 1) để xác định thông số khối phổ cho từng chất. Khảo sát và tối ưu hóa các điều kiện khối phổ như: chế độ ion hóa (ESI +/-), xác định mảnh ion mẹ, tối ưu hóa các thông số của nguồn ion hóa như điện thế ion hóa, nhiệt độ đầu phun; lưu lượng dòng khí nitơ cung cấp cho nguồn ion để bay hơi dung môi, điện thế của bộ phận

hội tụ dòng ion, ... để thu được lượng ion mẹ đi vào bộ phận phân tích khối có cường độ tín hiệu (vạch phổ) cao và ổn định.

Tiến hành nghiên cứu quá trình phân mảnh mẹ ở tứ cực thứ 2 của thiết bị để xác định các ion con cho từng chất phân tích và mức năng lượng tối ưu của quá trình phân mảnh.

* Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Dựa trên tính chất lý hóa của chất phân tích, các tài liệu tham khảo [3, 4] và điều kiện thực tiễn, tiến hành khảo sát với các điều kiện sắc ký khác nhau, bao gồm sử dụng cột Hypersil Gold C18 (50 x 2,1 mm, 1,9 μm); cột Luna C18(2)-HST (50 x 3 mm, 2,5 μm); cột Acquity C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μm) trên các hệ pha động khác nhau bao gồm dung môi hữu cơ (methanol hoặc acetonitril) phối hợp với các dung dịch đệm (acid formic 0,1%, amoni acetat 5 mM, amoni bicarbonat 7,5 mM) theo các tỷ lệ khác nhau với mục tiêu thu được pic TEL và HCT có đáp ứng cao nhất, cân đối và thời gian phân tích ngắn.

* Khảo sát và lựa chọn quy trình xử lý mẫu huyết tương

Xem xét tính chất lý hoá của các chất phân tích nhận thấy: giá trị logP của TEL là 7,7 [8], của HCT là -0,07 [9] hai chất phân tích có tính chất khác nhau. Ta cần tiến hành khảo sát trên các mẫu huyết tương trắng và huyết tương tự tạo chứa chuẩn TEL và HCT ở nồng độ giới hạn định lượng dưới (LLOQ) bằng nhiều phương pháp xử lý mẫu khác nhau như: tủa protein bằng methanol (MeOH) hoặc acetonitril (MeCN), chiết lỏng-lỏng bằng diethyl ether – cloroform (8 : 2) và tủa protein kết hợp với đông lạnh mẫu huyết tương với mục tiêu thu được pic TEL và HCT có hình dáng pic cân đối và đáp ứng cao nhất.

2.2.2.2. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng đồng thời TEL và HCT trong huyết tương người theo các hướng dẫn của US-FDA [7], EMA [8] và ICH [9] về thẩm định phương pháp LC-MS/MS phân tích thuốc trong dịch sinh học gồm những chỉ tiêu sau: độ đặc hiệu, chọn lọc; đường chuẩn và khoảng tuyến tính; giới hạn định lượng dưới; độ đúng – độ chính xác trong ngày, khác ngày; ảnh hưởng của nền mẫu; độ nhiễm chéo; ảnh hưởng của tan huyết và mỡ máu; tỷ lệ thu hồi dược chất và chuẩn nội; độ ổn định dược chất trong huyết tương.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện khối phổ

Tiến hành như mục 2.2.2.1, kết quả thu được như sau: TEL và TEL-d3 cho cường độ tín hiệu mảnh phổ cao hơn ở chế độ ion dương dưới dạng [M+H]⁺ có m/z lần lượt là

515,2 và 518,2 còn HCT và HCT-13C,d2 có cường độ tín hiệu cao hơn ở chế độ ion âm dưới dạng [M-H]⁻ có m/z lần lượt là 295,9 và 298,9. Tiếp tục phân mảnh các ion mẹ đã lựa chọn, xác định được các ion con có tín hiệu cao, ổn định sử dụng để định lượng có số khối lần lượt là 276,1; 279,1; 205,1 và 206,1 tương ứng với TEL; TEL-d3; HCT và HCT-13C,d2. Kết quả được tóm tắt ở Bảng 1.

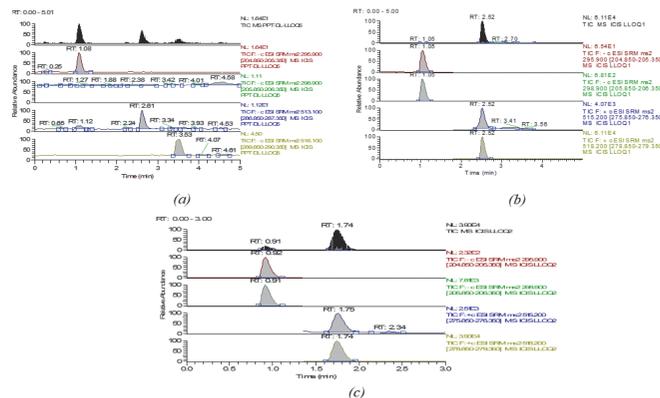
3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

- *Khảo sát pha động:* Tiến hành khảo sát trên các hệ pha động khác nhau như mục 2.2.2.1, kết quả cho thấy sử dụng pha động methanol – dung dịch amoni acetat 5 mM chứa acid acetic 0,1% cho đáp ứng của TEL và HCT cao và ổn định, hình dáng pic cân đối hơn các hệ còn lại.

- Khảo sát lựa chọn cột:

Trên hệ pha động đã lựa chọn tiến hành khảo sát các điều kiện nhận thấy: khi vận hành đồng thời 2 chế độ (ESI+) và (ESI-) cường độ tín hiệu của TEL và HCT không có sự ổn định như khi vận hành riêng lẻ từng chế độ. Vì vậy cần chia quá trình phân tích thành 2 phân đoạn, phân đoạn vận hành với chế độ (ESI-) cho HCT và phân đoạn vận hành với chế độ (ESI+) cho TEL. Do đó, cần xây dựng điều kiện để tách được pic HCT và TEL.

Tiến hành khảo sát trên các cột sắc ký khác nhau. Trong đó, Cột Luna C18(2)-HST (50 x 3 mm, 2,5 μm) cho pic của HCT và TEL tách nhau rõ ràng, hình dáng pic cân đối và đáp ứng cao hơn các loại cột còn lại khi phân tích trên mẫu cùng ở nồng độ LLOQ.



Hình 1. SKĐ mẫu chuẩn TEL, HCT ở nồng độ LLOQ: trên cột Hypersil Gold C18 50 x 2,1 mm, 1,9 μm (a), trên cột Acquity C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μm) (b) và trên cột Luna C18(2)-HST (50 x 3 mm, 2,5 μm) (c)

3.1.4. Lựa chọn phương pháp xử lý mẫu

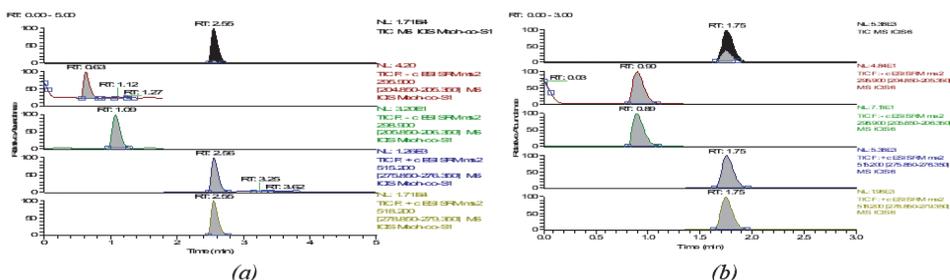
Khảo sát các phương pháp tủa protein như mục 2.2.2.1 nhận thấy:

Phương pháp tủa protein đơn thuần bằng MeOH có quy trình xử lý mẫu nhanh tuy nhiên đáp ứng pic của HCT và TEL đều thấp.

Phương pháp tủa protein đơn thuần bằng MeCN có quy trình xử lý mẫu nhanh nhưng nền mẫu blank không ổn định.

Phương pháp tủa protein kết hợp chiết lỏng-lỏng bằng diethyl ether – chloroform (8 : 2): đáp ứng pic của TEL và HCT rất thấp.

Phương pháp tủa protein bằng MeCN kết hợp với đông lạnh mẫu, sau đó hút lớp dung môi phía trên, bốc hơi dưới dòng khí nitơ thu cặn, hòa tan cặn trong dung môi pha mẫu cho đáp ứng pic của cả 2 dược chất cao hơn, pic có hình dáng cân đối, ổn định.



Hình 2. SKĐ mẫu huyết tương tủa bằng MeOH (a) và SKĐ mẫu huyết tương được tủa bằng MeCN kết hợp đông lạnh mẫu (b)

***Tóm lại:** Từ các kết quả khảo sát trên, đã xây dựng được quy trình xây dựng phương pháp định lượng đồng thời telmisartan và hydrochlorothiazid trong huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép nối đầu dò khối phổ (LC-MS/MS) như sau:

- Điều kiện khối phổ:

Bảng 1. Các thông số của detector khối phổ dùng để định lượng TEL, HCT và các chuẩn nội

Thông số	Hoạt chất	HCT	HCT-13C,d2	TEL	TEL-d3
Chế độ ion hóa		ESI(-)	ESI(-)	ESI(+)	ESI(+)
Thế ion hóa (Volt)		3000	3000	3000	3000
Nhiệt độ nguồn phun (°C)		300	300	300	300
Áp suất khí mang (psi)		30	30	30	30
Áp suất khí hỗ trợ (psi)		10	10	10	10
Áp suất khí quét (psi)		2,0	2,0	2	2
Nhiệt độ mao quản (°C)		300	300	300	300
Thế thấu kính hội tụ (Volt)		119	119	132	132
Năng lượng bắn phá (Volt)		23	23	48	48
Mảnh ion mẹ (m/z)		295,9	298,9	515,2	518,2
Mảnh ion con (m/z)		205,1	206,1	276,1	279,1
Thời gian ghi dữ liệu		0 – 1,35 phút		1,35 – 3 phút	

- Điều kiện sắc ký:

Thông số	Mô tả
Cột sắc ký	Luna C18(2)-HST; 50 x 3 mm; 2,5 µm
Bảo vệ cột	C18; 4 x 3 mm
Nhiệt độ cột	40°C
Pha động	Methanol – Dung dịch amoni acetat 5 mM chứa acid acetic 0,1% (80 : 20)
Tốc độ dòng	0,3 mL/phút
Thể tích tiêm	5 µL
Nhiệt độ autosampler	Nhiệt độ phòng

- Quy trình xử lý mẫu:

Lấy 0,3 mL mẫu huyết tương, thêm 20 µL dung dịch chuẩn nội làm việc, thêm 1 mL acetonitril, lắc xoáy 1700 vòng/phút trong 1 phút. Ly tâm 9000 vòng/phút (RCF: 9056 g) trong 5 phút. Cho mẫu vào tủ âm sâu -70°C. Sau 15 phút, lấy mẫu ra khỏi tủ âm sâu và rửa đông ở nhiệt độ phòng. Hút 0,5 mL lớp dịch trong phía trên sang ống chiết đã ghi nhãn. Bốc hơi dung môi dưới dòng khí nitơ thu cần. Hòa tan cần trong 0,5 mL hỗn hợp methanol – dung dịch amoni acetat 5 mM chứa acid acetic 0,1% theo tỉ lệ 80 : 20 (tt/tt), chuyển lọ tiêm sắc ký.

- Phương pháp tính kết quả

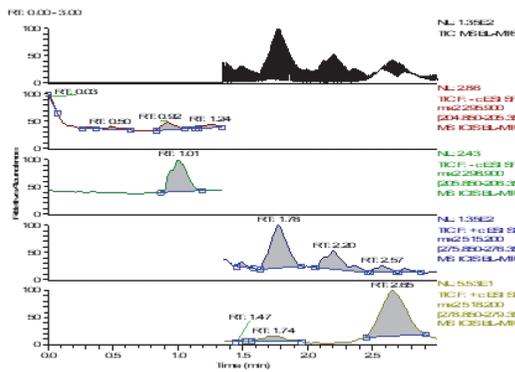
Xác định nồng độ TEL và HCT có trong các mẫu thử dựa vào tỷ lệ diện tích pic TEL/TEL-d3 và HCT/HCT-13C,d2 thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn tương ứng phân tích trong cùng điều kiện.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

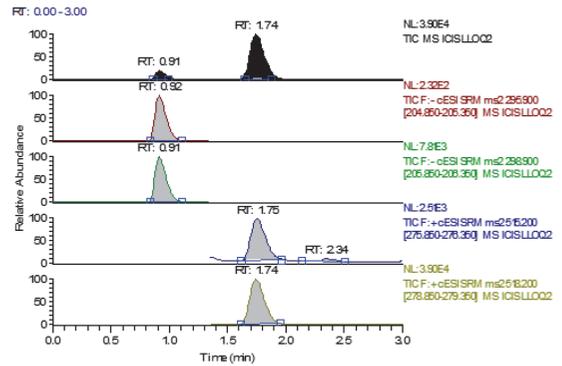
3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

Phân tích các mẫu huyết tương (HT) trắng bao gồm: 06 lô HT trắng khác nhau, mẫu HT trắng tan huyết, mẫu HT trắng tăng lipid và các mẫu HT tự tạo chứa chuẩn nội và TEL và HCT với cùng mức nồng độ là 1,0 ng/mL (mẫu LLOQ) theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu HT trắng (Hình 3), không xuất hiện các pic tại thời điểm 0,9 phút (trùng với thời gian lưu của HCT, HCT-13C,d2); 1,75 phút (trùng với thời gian lưu của TEL và TEL-d3) như trên SKĐ mẫu HT tự tạo (Hình 4). Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu – chọn lọc với TEL và HCT và các chất chuẩn nội theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.



Hình 3. SKĐ mẫu HT trắng



Hình 4. SKĐ mẫu HT tự tạo chứa chuẩn TEL (1,0 ng/mL), HCT (1,0 ng/mL) và chuẩn nội

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn TEL có nồng độ khoảng từ 1 ng/mL đến 1000 ng/mL, chuẩn HCT có nồng độ khoảng từ 1 ng/mL đến 400 ng/mL và chuẩn nội tương ứng theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa

nồng độ TEL và HCT có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng TEL/ TEL-d3; HCT/HCT-13C,d2 bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng (1/nồng độ²). Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỷ lệ diện tích pic được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

Hoạt chất	Khoảng nồng độ (ng/mL)	Đường chuẩn	Độ đúng (%) Min - max	Phương trình hồi quy ($y = b + ax$) Hệ số tương quan (r)
TEL	1 – 1000	1	95,5 – 104,7	$y = 0,0179009 + 0,0704004x$; $r = 0,999300$
		2	93,4 – 109,0*	$y = 0,0239882 + 0,0708194x$; $r = 0,997948$
		3	93,9 – 109,3	$y = 0,0156371 + 0,075832x$; $r = 0,997848$
		4	94,1 – 108,1	$y = 0,0184653 + 0,0761057x$; $r = 0,998799$
		5	87,8 – 113,7	$y = 0,0172735 + 0,0763712x$; $r = 0,995239$
HCT	1 – 400	1	94,6 – 103,8	$y = 0,00602325 + 0,0399052x$; $r = 0,999500$
		2	95,4 – 105,5	$y = 0,00615886 + 0,0410023x$; $r = 0,999350$
		3	96,6 – 105,0	$y = 0,000577927 + 0,042953x$; $r = 0,999350$
		4	94,5 – 104,5	$y = 0,0012019 + 0,0432143x$; $r = 0,999450$
		5	94,1 – 106,8	$y = 0,00317297 + 0,0429818x$; $r = 0,998949$

(*): Loại bỏ điểm chuẩn S3 có độ đúng nằm ngoài khoảng 85% – 115%

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ 1 – 1000 ng/mL đối với TEL và 1 – 400 ng/mL đối với HCT có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ TEL, HCT với tỷ lệ diện tích pic tương ứng TEL/TEL-d3 và HCT/HCT-13C,d2 với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ TEL, HCT xác định từ đường chuẩn so với giá trị 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 quy 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 zero (mẫu HT trắng chỉ chứa chuẩn nội) và mẫu HT chứa TEL và HCT với nồng độ tương ứng là 1 ng/mL (mẫu LLOQ) trên 3 lô mẫu, mỗi lô gồm 6 mẫu. Kết quả thẩm định giới hạn định lượng dưới của phương pháp được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định giá trị LLOQ

Chất phân tích	TEL			HCT		
	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
Lô	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
Diện tích mẫu zero (n = 1)	359	1230	1431	24	7	17
Diện tích trung bình mẫu LLOQ (n = 6)	8598	9068	12846	1313	792	709
Tỷ lệ LLOQ/Zero	23,9	7,4	9,0	54,7	113,2	41,7
Độ đúng (%) (n = 6)	101,9	100,8	101,3	98,5	103,0	112,2
CV (%) (n = 6)	3,4	1,5	6,9	5,0	3,1	6,0
Độ đúng (%) (n = 18)	101,3			104,6		
CV (%) (n = 18)	4,3			7,3		

Kết quả thẩm định cho thấy, tại thời điểm trùng với thời gian lưu của TEL và HCT đáp ứng pic trung bình của mẫu LLOQ đều gấp hơn 5 lần đáp ứng pic của mẫu zero. Độ đúng trung bình của từng lô và của 3 lô khác nhau đều nằm trong khoảng 80% – 120% so với nồng độ thực; độ chính xác của từng lô và của 3 lô khác nhau đều nhỏ hơn 20%, đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

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

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ chính xác trên 5 mức nồng độ LLOQ (TEL, HCT: 1 ng/mL), LQC (TEL, HCT: 3 ng/mL), SQC (TEL, HCT: 50 ng/mL), MQC (TEL: 350 ng/mL, HCT: 140 ng/mL) và HQC (TEL: 750 ng/mL, HCT: 300 ng/mL), mỗi mức nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Thực hiện trên 3 ngày khác nhau. Xác định nồng độ TEL và HCT có trong các mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác của phương pháp được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày, khác ngày

Chất phân tích		Độ đúng (%)					CV (%)				
		LLOQ	LQC	SQC	MQC	HQC	LLOQ	LQC	SQC	MQC	HQC
TEL	Ngày 1 (n = 6)	101,9	109,5	112,1	104,6	102,1	3,4	3,1	4,3	1,4	2,9
	Ngày 2 (n = 6)	100,8	105,8	111,0	103,5	100,8	1,5	1,4	4,2	1,5	1,7
	Ngày 3 (n = 6)	101,3	112,5	109,4	104,4	103,5	6,9	5,3	4,4	2,0	1,2
	Khác ngày	101,3	109,3	110,8	104,2	102,1	4,3	4,3	4,2	1,6	2,2
HCT	Ngày 1 (n = 6)	98,5	102,7	102,7	102,7	104,0	5,0	2,8	3,7	1,8	3,5
	Ngày 2 (n = 6)	103,0	97,8	101,5	101,3	101,0	3,1	2,6	4,2	2,5	2,0
	Ngày 3 (n = 6)	112,2	105,0	102,0	104,2	103,8	6,0	5,5	2,1	3,2	2,5
	Khác ngày	104,6	101,8	102,1	102,7	102,9	7,3	4,8	3,3	2,7	2,9

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ có độ đúng trung bình đều nằm trong khoảng 85 – 115% (ngoại trừ mẫu LLOQ nằm trong khoảng 80 – 120%), độ chính xác trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15% (ngoại trừ mẫu LLOQ với CV < 20%); 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.

3.2.5. Ảnh hưởng của nền mẫu

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu tại hai mức nồng độ LQC và HQC trong 6 lô huyết tương khác nhau. Xác định hệ số ảnh hưởng nền cho từng chất phân tích và chuẩn nội bằng cách xác định tỷ số giữa đáp ứng chất phân tích/IS trong các nền mẫu khác nhau và đáp ứng chất phân tích/IS trong dung môi. Xác định tỷ số của hệ số ảnh hưởng nền của chất phân tích đối với hệ số ảnh hưởng nền của chuẩn nội tương ứng cho từng nền mẫu. Đánh giá mức độ dao động

(CV%) của các tỷ số trên cho từng chất phân tích. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả ảnh hưởng nền mẫu

Mức nồng độ	TEL		HCT	
	MF _{TEL} /MF _{IS}	CV (%)	MF _{HCT} /MF _{IS}	CV (%)
LQC (n = 6)	1,256	3,7	1,344	3,5
HQC (n = 6)	1,023	4,3	1,051	5,0

Kết quả thẩm định cho thấy, ảnh hưởng nền mẫu giữa các lô huyết tương khác nhau nằm trong giới hạn cho phép (CV% < 15%), như vậy phương pháp phân tích đáp ứng các yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.6. Tỷ lệ thu hồi

Tiến hành đánh giá tỷ lệ thu hồi của TEL và HCT tại

4 mức nồng độ LQC, SQC, MQC và HQC bằng cách so sánh tỷ lệ đáp ứng của chất phân tích/IS trong các mẫu có qua chiết tách với tỷ lệ đáp ứng tương ứng trong các mẫu không qua chiết tách. Kết quả đánh giá tỷ lệ thu hồi của TEL và HCT trong huyết tương được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả tỷ lệ thu hồi TEL và HCT trong huyết tương

Mức nồng độ	TEL			HCT		
	% thu hồi	CV (%)		% thu hồi	CV (%)	
		(*)	(**)		(*)	(**)
LQC (n = 6)	71,9	7,2	10,0	91,0	7,9	5,4
SQC (n = 6)	69,2	3,1	2,9	84,4	3,3	4,7
MQC (n = 6)	71,3	2,3	2,4	84,7	4,0	6,2
HQC (n = 6)	69,7	1,4	2,5	81,1	2,4	6,5

(*): Kết quả mẫu qua chiết tách; (**): Kết quả mẫu không qua chiết tách

Kết quả thẩm định cho thấy, tỷ lệ thu hồi của 2 dược chất đều nhỏ hơn 115% và sai khác giữa các mức nồng độ đều không quá ± 15%. Giá trị CV% giữa các đáp ứng của chất phân tích và IS trong các mẫu QC không qua chiết tách và có qua chiết tách ở mỗi nồng độ đều nhỏ hơn 15%. Như vậy phương pháp phân tích đáp ứng các yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.7. Ảnh hưởng của mỡ máu, tan huyết

Chuẩn bị lô huyết tương tan huyết 4%, lô huyết tương nhiễm mỡ (có nồng độ triglicerid khoảng 300 mg/dL). Chuẩn bị lô mẫu LQC và HQC trong huyết tương tan huyết và trong huyết tương nhiễm mỡ trên, mỗi nồng độ 06 mẫu. Xác định nồng độ và độ đúng các mẫu huyết tương tan huyết và nhiễm mỡ so với nồng độ pha thực tế. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của mỡ máu, tan huyết

Độ ổn định	Mẫu	% độ đúng		CV (%)	
		TEL	HCT	TEL	HCT
Ảnh hưởng của mỡ máu	LQC	86,1	97,3	3,0	4,5
	HQC	96,8	99,5	1,6	1,6
Ảnh hưởng của tan huyết	LQC	87,8	97,3	2,7	3,5
	HQC	96,3	98,6	1,9	1,5

3.2.8. Độ ổn định của dược chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của TEL và HCT trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của TEL và HCT trong HT bằng cách so sánh nồng độ TEL và HCT có trong mẫu được bảo quản ở những điều

kiện nhất định với nồng độ pha thực tế. Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của mẫu trong và sau quá trình xử lý bao gồm độ ổn định mẫu trong autosampler, độ ổn định của cần sau bốc hơi. Kết quả nghiên cứu độ ổn định được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả nghiên cứu độ ổn định

Độ ổn định	Mẫu	% độ ổn định		CV (%)	
		TEL	HCT	TEL	HCT
Sau 6 chu kỳ đông – rã đông	LQC	103,0	97,7	6,9	9,5
	HQC	94,8	92,1	3,0	5,5
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	102,9	102,2	2,9	3,2
	HQC	89,9	92,1	2,3	3,1
Độ ổn định thời gian dài (214 ngày; -35°C)	LQC	104,5	102,3	2,4	2,9
	HQC	94,2	99,0	5,7	5,3
Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu	LQC	104,6	95,2	2,0	3,8
	HQC	98,3	97,2	2,1	2,9
Độ ổn định cần sau bốc hơi (2 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	105,7	96,0	1,4	3,7
	HQC	99,9	97,0	1,8	2,4

Kết quả thẩm định cho thấy % độ ổn định của TEL và HCT trong huyết tương đều nằm trong khoảng 85 – 115% và các giá trị CV đều nhỏ hơn 15% ở các điều kiện bảo quản khác nhau, đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.3 Ứng dụng phương pháp đã xây dựng định lượng nồng độ telmisartan và hydrochlorothiazid trong mẫu huyết tương người tình nguyện (NTN).

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng đồng thời nồng độ TEL và HCT trong huyết tương của 03 NTN

sau khi uống 01 viên nén kết hợp 40 mg telmisartan và 12,5 mg hydrochlorothiazid trong tình trạng đói. Lấy mẫu máu tại các thời điểm: 0 giờ (trước khi uống thuốc) và 0,17 (10 phút), 0,33 (20 phút); 0,5 (30 phút); 0,75 (45 phút); 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 9; 12; 24; 36; 48 và 72 giờ sau khi uống thuốc. Đề cương đã được phê duyệt tại hội đồng đạo đức Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

Kết quả nồng độ TEL và HCT trong mẫu huyết tương của 03 NTN tại các thời điểm trước và sau khi dùng thuốc được trình bày trong Bảng 10.

Bảng 10. Kết quả nồng độ TEL và HCT trong huyết tương của NTN và các thông số dược động học

Thời gian (giờ)	TEL			HCT		
	NTN 01	NTN 02	NTN 03	NTN 01	NTN 02	NTN 03
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,17	5,859	0,000	3,625	0,000	0,000	0,000
0,33	21,083	14,456	29,314	8,019	4,738	13,543
0,5	35,329	26,642	31,294	31,987	11,044	36,601
0,75	46,362	46,120	36,587	59,953	39,047	66,088
1	53,732	59,992	46,420	75,512	55,285	94,939
1,25	58,961	81,879	48,494	74,412	69,221	94,019
1,5	55,358	95,896	48,782	70,311	77,286	81,428
2	49,798	94,443	46,910	72,044	73,712	82,659
2,5	42,895	78,297	45,361	62,291	67,109	66,007
3	46,209	82,069	46,642	61,768	67,252	61,881
3,5	44,401	75,656	39,459	63,800	60,614	55,319
4	39,362	72,672	37,241	66,289	54,437	48,802
5	22,900	56,056	24,671	44,890	44,142	34,621
6	20,766	51,113	21,119	38,749	36,459	28,014
9	12,962	47,288	19,698	20,245	18,665	17,861
12	13,061	38,232	13,380	13,345	11,77	10,324
24	11,297	22,513	7,830	5,650	5,306	4,717
36	3,792	14,779	2,944	2,079	2,136	1,598

48	1,585	8,723	2,301	0,000	0,000	0,000
72	0,000	2,894	1,057	0,000	0,000	0,000
t_{max} (giờ)	1,25	1,50	1,50	1,00	1,50	1,00
C_{max} (ng/mL)	58,961	95,896	48,782	75,512	77,286	94,939
AUC_{last} (giờ.ng/mL)	585,400	1536,787	590,038	629,989	585,950	561,568
AUC_{inf} (giờ.ng/mL)	604,769	1600,545	626,462	656,826	615,989	582,124
$t_{1/2}$ (giờ)	8,47	15,27	23,89	8,95	9,75	8,92

Kết quả phân tích trên NTN cho thấy:

Nồng độ đỉnh trong huyết tương (C_{max}) của 03 NTN nằm trong khoảng đường chuẩn đối với cả 2 dược chất. Có hai mẫu LQC, SQC nằm trong khoảng nồng độ phân tích mẫu NTN, Do đó, khoảng đường chuẩn đã xây dựng là phù hợp với cả TEL và HCT. Các thông số dược động học như C_{max} ; t_{max} của ba NTN tương tự với các tài liệu đã công bố [3 – 6].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời telmisartan và hydrochlorothiazid trong

huyết tương người bằng UPLC/MS-MS với thời gian phân tích ngắn (4,5 phút), có giá trị giới hạn định lượng dưới là 1 ng/mL; khoảng tuyến tính lần lượt là 1 ng/mL đến 1000 ng/mL (đối với TEL); 1 ng/mL đến 400 ng/mL (đối với HCT); độ đúng và độ chính xác đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US-FDA, EMA và ICH. Như vậy, với khoảng tuyến tính rộng và giới hạn định lượng dưới thấp, phương pháp có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học thuốc kết hợp telmisartan và hydrochlorothiazid ở các hàm lượng khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2023), Dược thư Quốc gia Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, tr. 866-867, 1530-1532.
- Boehringer Ingelheim, Micardis ® Plus 40/12,5 mg package insert.
- EMA (2013). Assessment report Actelsar HCT, Procedure No. EMEA/H/C/002676/0000.
- Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/actelsar-hct-epar-public-assessment-report_en.pdf
- EMA (2010). CHMP ASSESSMENT REPORT FOR Telmisartan teva, Procedure No.
- Procedure No. EMEA/H/C/001146. Available at:
- https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/telmisartan-teva-epar-public-assessment-report_en.pdf
- Jaivik V. Shah, Priyanka A. Shah, Priya V. Shah, Mallika Sanyal, Pranav S. Shrivastav (2017), “Fast and sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in human plasma”, Journal of Pharmaceutical Analysis, Volume 7, Issue 3, Pages 163-169
- Pengfei Li , Yingwu Wang, Yan Wang, Yunbiao Tang, J Paul Fawcett, Yimin Cui, Jingkai Gu; *Determination of telmisartan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; Journal of Chromatography B, 828 (2005) 126-129.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018), *Guidance for industry-Bioanalytical method validation*.
- European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012), *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*
- International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use (2022), “*Bioanalytical method validation and study sample analysis M10*”
- National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydrochlorothiazid>
- National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/telmisartan>
- Yana. T, Hao Li et al., Liquid chromatographic tandem mass spectroscopic method for the simultaneous quantitation of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma. J. Pharm Bio MED analysis 48; 2008; pg no: 1225-1229.
- Mathew George, Lincy Joseph, Arpit Kumar Jain, Anju V; Bioanalytical method development and validation of simultaneous analysis of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma using LC-MS/MS. International Journal of Bioassays 5.3 (2016): 4862-4869.