

DEVELOPMENT AND VALIDATION A LC-MS/MS METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTITATION OF AMLODIPINE, PERINDOPRIL AND ITS ACTIVE METABOLITE PERINDOPRILAT IN HUMAN PLASMA

HOANG VAN DUC^{1,✉}, TRAN HOANG¹, NGUYEN THI CHAM¹, VU THI PHUONG THUY¹

¹National Institute of Drug Quality Control

✉Corresponding author: hoangducckh@gmail.com

Received November 08th, 2024

Accepted December 25th, 2024

Abstract: A fast, simple, high throughput and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for simultaneous quantitation of amlodipine, perindopril and its active metabolite perindoprilat in human plasma. The Sciex Qtrap 6500+ UHPLC-MS/MS was operated under the multi reaction-monitoring (MRM) mode using positive electrospray ionization technique. Amlodipine, perindopril, perindoprilat and internal standards were extracted from human plasma by protein precipitation technique using methanol. The samples were chromatographed on a C18 column (dimension 50 x 2,1 mm, particle 1,9 μ m) with a gradient elution at a flow rate of 0.3 ml/min using 0.1 % formic acid in water – methanol. The calibration curves were found to be linear in the range 0.15 to 15 ng/ml, 1.25 to 125 ng/ml and 0.2 to 20 ng/ml for amlodipine, perindopril and perindoprilat, respectively, with mean correlation coefficient of > 0.99 for all analysis. The accuracy was within 85 % - 115.0 % and the precision was less than 15 %. Total run time was 4.5 min. This method can be used for BA-BE studies of amlodipine and perindopril combination preparations.

Keywords: Amlodipine, Perindopril, Perindoprilat, LC-MS/MS, Human plasma

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI AMLODIPIN, PERINDOPRIL VÀ CHẤT CHUYỂN HÓA CÓ HOẠT TÍNH PERINDOPRILAT TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI

HOÀNG VĂN ĐỨC^{1,✉}, TRẦN HOÀNG¹, NGUYỄN THỊ CHÂM¹, VŨ THỊ PHƯƠNG THỦY¹

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

✉Tác giả liên hệ: hoangducckh@gmail.com

Nhận bài ngày 08 tháng 11 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 12 năm 2024

Tóm tắt: Một phương pháp phân tích nhanh, đơn giản, năng suất cao và có tính đặc hiệu, sử dụng thiết bị LC-MS/MS, đã được phát triển để định lượng đồng thời amlodipin, perindopril và chất chuyển hóa có hoạt tính perindoprilat trong huyết tương người. Thiết bị LC-MS/MS Sciex Qtrap 6500+ được vận hành dưới chế độ ion hóa dương, sử dụng kiểu định lượng theo dõi nhiều phản ứng (MRM). Amlodipin, perindopril, perindoprilat và các chuẩn nội tương ứng được chiết xuất từ mẫu huyết tương sử dụng kỹ thuật tủa protein với tác nhân tủa là methanol. Mẫu sau xử lý được phân tích sắc ký trên cột pha đảo C18, kích thước 50 x 2,1 mm, cỡ hạt 1,9 μ m

theo chương trình pha động gồm dung dịch acid formic 0,1 % và methanol tại tốc độ dòng 0,3 ml/phút. Đường chuẩn xây dựng cho từng chất phân tích amlodipin, perindopril và perindoprilat lần lượt là 0,15-15 ng/ml; 1,25-125 ng/ml và 0,2-20 ng/ml với hệ số $r > 0.99$. Độ đúng trong khoảng 85 %-115 % với độ chính xác < 15 %. Tổng thời gian phân tích cho mỗi mẫu là 4,5 phút. Phương pháp là phù hợp để áp dụng cho các nghiên cứu sinh khả dụng, tương đương sinh học của các chế phẩm cố định liều amlodipin và perindopril.

Từ khóa: Amlodipin, Perindopril, Perindoprilat, LC-MS/MS, huyết tương

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Amlodipin là dẫn chất dihydropyridin, có tác dụng chống tăng huyết áp, được chỉ định điều trị tăng huyết áp và đau thắt ngực [1]. Perindopril là thuốc ức chế men chuyển đổi angiotensin, tác dụng thông qua hoạt tính của chất chuyển hóa perindoprilat, được chỉ định điều trị tăng huyết áp, suy tim sung huyết và bệnh tim thiếu máu cục bộ mạn tính [1]. Chế phẩm kết hợp amlodipin và perindopril được chỉ định để điều trị tăng huyết áp và/hoặc bệnh động mạch vành ổn định [2], có thể dùng thay thế cho bệnh nhân đang sử dụng amlodipin và perindopril dưới dạng các viên riêng biệt.

Sau khi uống liều đơn chế phẩm amlodipin/perindopril tert-butylamin hàm lượng 10mg/10mg, nồng độ cực đại trong huyết tương của amlodipin, perindopril và chất chuyển hóa có hoạt tính perindoprilat rất thấp, nhỏ hơn 100 ng/ml đối với perindopril và nhỏ hơn 10 ng/mL đối với amlodipin, perindoprilat. Để đáp ứng yêu cầu đánh giá tương đương sinh học cho các chế phẩm kết hợp amlodipin/perindopril cần thiết phải có phương pháp phân tích định lượng đồng thời cả ba hoạt chất trên. Tuy nhiên, tham khảo các tài liệu cho thấy, hiện ở Việt Nam chưa có công bố cho phương pháp định lượng đồng thời ba hoạt chất trên trong huyết tương người.

Vì vậy, dựa trên các kỹ thuật phân tích hiện có, các phương pháp chiết tách và tham khảo tài liệu [3] [4] [5], chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng và thẩm định phương pháp LC-MS/MS có đủ độ nhạy, đặc hiệu, chính xác, định lượng được đồng thời amlodipin, perindopril và perindoprilat trong các mẫu huyết tương người.

2. THỰC NGHIỆM

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

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

Máy sắc ký lỏng khối phổ Sciex Qtrap 6500+ (Sciex – Mỹ); Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ nhạy $d = 0,001$ mg); Tủ lạnh sâu -35°C (Panasonic – 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; Bình định mức, micropipet, ống ly tâm. Các thiết bị, dụng

cụ phân tích được quản lý và hiệu chuẩn theo các quy định của ISO/IEC và GLP.

2.1.2. Dung môi, hóa chất

- Dung môi, hóa chất: Đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC và LC/MS.

- Huyết tương (HT) trắng chứa chất chống đông Na_2EDTA : Không có amlodipin, perindopril, perindoprilat của Bệnh viện Trung ương quân đội 108.

- Chất chuẩn:

+ Amlodipin besilat (AML) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: C0521213, hàm lượng 100,3 % tính theo nguyên trạng.

+ Perindopril tert-butylamin (PRD) - chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, SKS: 0418253.02, hàm lượng 99,41 % tính theo nguyên trạng.

+ Perindoprilat (PRL) - chuẩn của TLC, SKS: 4326-001A3, hàm lượng 99,8 % tính theo nguyên trạng.

+ Amlodipin-d4 (AML-d4) - chuẩn của Toronto research chemicals, SKS: 9-RIT-58-3, độ tinh khiết 98 %. Amlodipin-d4 được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của AML trong phương pháp phân tích.

+ Perindopril-d4 (PRD-d4) – chuẩn của Toronto research chemicals, SKS: 12-NOT-191-1, độ tinh khiết 98 %. Perindopril-d4 được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của PRD trong phương pháp phân tích.

+ Perindoprilat-d4 (PRL-d4) – chuẩn của Toronto research chemicals, SKS: 12-NOT-196-2, độ tinh khiết 98 %. Perindoprilat-d4 được sử dụng làm chất nội chuẩn (IS) của PRL trong phương pháp phân tích.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu huyết tương trắng: chứa chất chống đông Na_2EDTA

- Mẫu huyết tương tự tạo: là các mẫu huyết tương trắng có chứa chuẩn amlodipin, perindopril và perindoprilat bằng cách hòa tan các chuẩn này trong huyết tương trắng với các nồng độ khác nhau.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Điều kiện sắc ký

Bảng 1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký: Hypersil gold C18; 50 x 2,1 mm; 1,9 µm		Bảo vệ cột: C18	
Tốc độ dòng: 0,3 ml/phút		Nhiệt độ cột: 40 °C	
Pha động (chương trình gradient):	Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
	0	20	80
	0,4	20	80
	0,5	90	10
	2,2	90	10
	2,3	20	80
	4,0	20	80
- Pha động A: methanol			
- Pha động B: dung dịch acid formic 0,05 % trong nước			
Thể tích tiêm: 10 µL		Nhiệt độ autosampler: nhiệt độ phòng	

2.2.2.2. Điều kiện khối phổ

Kiểu đo mảnh phổ khối hai lần (theo dõi nhiều phản ứng, MRM), nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện AML, PRD, PRL và các chất chuẩn nội (IS) tương ứng được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Các thông số của đầu dò khối phổ dùng để định lượng AML, PRD, PRL và chuẩn nội

Hoạt chất	Amlodipin	Amlodipin-d4	Perindopril	Perindopril-d4	Perindoprilat	Perindoprilat-d4
Thông số						
Chế độ ion hóa	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)	ESI(+)
Điện thế ion hóa (IS) (V)	5500	5500	5500	5500	5500	5500
Khí phun sương (GAS1) (psi)	45	45	45	45	45	45
Khí tăng cường (GAS2) (psi)	45	45	45	45	45	45
Nhiệt độ hóa hơi (TEM) (°C)	250	250	250	250	250	250
Điện thế chọn lọc ion (DP) (V)	56	56	56	56	10	10
Khí thổi ngược (CUR) (psi)	30	30	30	30	30	30
Điện thế phân mảnh (CE) (V)	17	17	25	25	31	31
Điện thế hội tụ ion (CXP) (V)	28	28	10	10	10	10
Ion ban đầu (parent ion)	409	413	369,1	373,1	341,1	345,1
Ion tạo thành (product ion)	238	238	172,2	176,2	170,1	170,1

2.2.2.3. Phương pháp chuẩn bị mẫu

- Dung dịch chuẩn gốc: chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc AML, PRD, PRL trong methanol có nồng độ lần lượt khoảng 250 µg/ml, 500 µg/ml, 400 µg/ml và các dung dịch chuẩn nội gốc AML-d4, PRD-d4, PRL-d4 có nồng độ tương tự dung dịch chuẩn gốc tương ứng.

- Dung dịch chuẩn nội làm việc: từ các dung dịch chuẩn nội gốc chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc trong hỗn hợp methanol-nước (1:1) có nồng độ AML-d4, PRD-d4, PRL-d4 lần lượt tương ứng là 60 ng/ml, 500,0 ng/ml và 80 ng/ml.

- Dung dịch chuẩn làm việc trong dung môi: từ các dung dịch chuẩn gốc AML, PRD, PRL chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc trong methanol-nước (1:1) có nồng độ chuẩn bằng 20 lần nồng độ mẫu huyết tương tương ứng.

- Từ các dung dịch chuẩn làm việc trong dung môi, chuẩn bị các mẫu bằng cách pha loãng với huyết tương trắng để thu được các mẫu trong đường chuẩn chứa AML có nồng độ từ 0,15 ng/ml đến 15 ng/ml, PRD có nồng độ từ 1,25 ng/ml đến 125 ng/ml và PRL có nồng độ từ 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml và các mẫu LLOQ, LQC, SQC, MQC và HQC chứa AML có nồng độ tương ứng là 0,15; 0,45; 6,0; 11,25 ng/ml, PRD có nồng độ tương ứng là 1,25; 3,75; 50,0; 93,75 ng/ml và PRL có nồng độ tương ứng là 0,2; 0,6; 8,0; 15,0 ng/ml.

2.2.2.4. Phương pháp xử lý mẫu

- Mẫu HT bảo quản ở nhiệt độ -35°C được để rã đông ở nhiệt độ phòng trước khi xử lý

- Hút 200 µl HT vào ống nhựa 2 ml. Thêm 20µl dung dịch chuẩn nội làm việc. Thêm 600 µl methanol. Lắc xoay 5 phút. Ly tâm 13528g trong 5 phút. Hút lớp dịch nổi, tiêm sắc ký.

2.2.2.5. Phương pháp tính kết quả

Xác định nồng độ AML, PRD, PRL có trong các mẫu thử (chưa biết nồng độ) dựa vào tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/AML-d4; PRD/PRD-d4; PRL/PRL-d4 thu được từ sắc đồ của mẫu thử và đường chuẩn tương ứng phân tích trong cùng điều kiện.

2.2.3. Thẩm định phương pháp

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng đồng thời amlodipin, perindopril, perindoprilat trong HT người bằng kỹ thuật LC-MS/MS theo qui định của US-FDA [7] và EMA [6] về thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học. Các chỉ tiêu cần thẩm định bao gồm: độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp; giới hạn định lượng

dưới; đường chuẩn - khoảng tuyến tính; ảnh hưởng của nền mẫu; độ nhiễm chéo; độ đúng - độ chính xác trong ngày, khác ngày; tỉ lệ thu hồi và độ ổn định của hoạt chất trong quá trình xử lý, phân tích và bảo quản mẫu dài ngày.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng qui trình phân tích

- Khảo sát xác định điều kiện khối phổ: lần lượt đưa vào thiết bị khối phổ các dung dịch chuẩn có nồng độ các chất phân tích khoảng 100 ng/ml để xác định thông số khối phổ cho từng chất. Phù hợp với cấu trúc hóa học của các chất phân tích, AML, PRD, PRL được ion hóa mang điện tích dương với số khối (m/z) tương ứng là: 409; 369,1; 341,1. Tiếp tục phân mảnh các ion lựa chọn, xác định mảnh ion con tương ứng với AML, PRD, PRL có số khối lần lượt là: 238; 172,2; 170,1. Tiến hành tối ưu, các thông số điện thế ion hóa, điện thế chọn lọc ion, điện thế phân mảnh, nhiệt độ hóa hơi, tốc độ khí hóa hơi... được xác định cho từng chất phân tích. Tiến hành tương tự để xác định thông số khối phổ cho các chất chuẩn nội tương ứng.

- Khảo sát xác định điều kiện sắc ký: do tính chất hóa lý khác nhau 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 nền mẫu. Quá trình khảo sát trên các hệ pha động và cột sắc ký khác nhau, lựa chọn pha động gồm methanol và nước chứa 0,1 % acid formic theo chương trình gradient và sử dụng cột sắc ký Hypersil gold C18 (50 x 2,1 mm; 1,9 µm) cho thấy các pic AML, PRD, PRL cân đối, đáp ứng cao và ổn định.

- Khảo sát xác định điều kiện xử lý mẫu: dựa trên tính chất của các chất phân tích và điều kiện sẵn có, tiến hành khảo sát qui trình xử lý mẫu bằng kỹ thuật tủa protein và chiết lỏng - lỏng. Với kỹ thuật chiết lỏng - lỏng, do tính chất hóa lý khác nhau của các chất phân tích, amlodipin dễ dàng chiết bằng dung môi hữu cơ do có hệ số logD > 0 tại cả môi trường acid đến kiềm, perindopril với logD > 0 tại môi trường acid và logD < 0 tại môi trường trung tính đến kiềm, trong khi đó perindoprilat có logD < 0 trong cả môi trường acid đến kiềm. Như vậy rất khó để chiết đồng thời cả ba chất phân tích dùng kỹ thuật chiết lỏng - lỏng. Với kỹ thuật tủa protein, có đặc điểm không phụ thuộc hệ số phân bố của các chất phân tích, nên có thể áp dụng với hầu hết các chất phân tích khác nhau, tuy nhiên tín hiệu chất phân tích thu được thấp do pha loãng mẫu, mẫu thường chứa nhiều tạp (protein, phospholipid...) nên đòi hỏi phương pháp sắc ký phải thích hợp để tách các chất khỏi tạp nền mẫu. Khảo sát tủa protein sử dụng các tác nhân tủa khác nhau (acetonitril, methanol, acid perchloric,

trichloroacetic acid) nhận thấy sử dụng các tác nhân của acid không phù hợp cho thiết bị khối phổ, nguồn ion hóa nhanh bắn. Trong khi acetonitril mạnh hơn methanol, tuy nhiên acetonitril không tương thích với chương trình sắc ký, nếu sử dụng cần có bay hơi để chuyển sang dung môi pha mẫu khác dẫn đến tăng đáng kể thời gian và qui trình thao tác. Vì vậy lựa chọn kỹ thuật của protein sử dụng tác nhân là methanol.

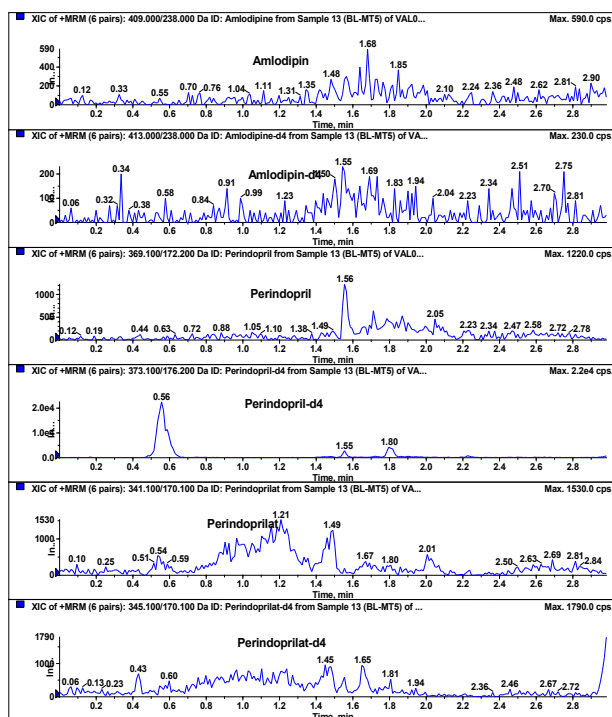
3.2. Thẩm định quy trình phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

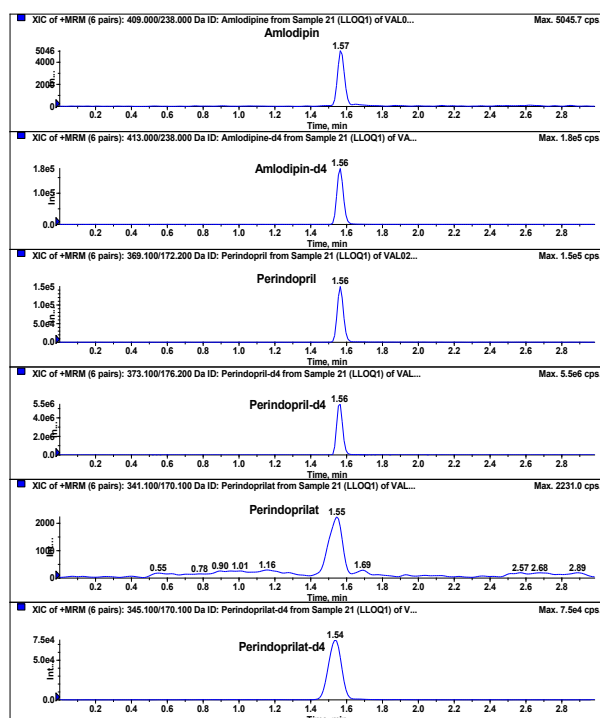
Phân tích các mẫu HT trắng (bao gồm 6 lô HT trắng khác nhau, mẫu huyết tương tan huyết và mẫu huyết tương

tăng lipid). Song song phân tích các mẫu HT tại nồng độ LLOQ chứa chuẩn nội và AML, PRD, PRL với nồng độ lần lượt khoảng 0,15 ng/ml; 1,25 ng/ml; 0,2 ng/ml (mẫu LLOQ) theo phương pháp đã được xây dựng.

Trên sắc ký đồ (SKĐ) của mẫu HT trắng (Hình 1), không xuất hiện pic tại thời điểm trùng với thời gian lưu của AML (1,67 phút), AML-d4 (1,68 phút); PRL (1,55 phút); PRL-d4 (1,54 phút) trên sắc ký đồ của LLOQ (Hình 2). Riêng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của PRD (1,68 phút); PRD-d4 (1,68 phút) xuất hiện pic có đáp ứng thu được nhỏ hơn 1 % đáp ứng thu được trên sắc ký đồ mẫu LLOQ.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu LLOQ

Kết quả thẩm định cho thấy, đáp ứng tại thời gian lưu các chất phân tích trong các mẫu HT trắng luôn nhỏ hơn 20 % đáp ứng các chất phân tích tương ứng trong mẫu LLOQ. Đáp ứng tại thời gian lưu các chất chuẩn nội trong các mẫu HT trắng luôn nhỏ hơn 5 % đáp ứng các chất chuẩn nội tương ứng trong mẫu LLOQ. Do vậy, phương pháp phân tích có độ đặc hiệu - chọn lọc với AML, PRD, PRL và IS theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học [6],[7].

3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn AML, PRD, PRL có khoảng nồng độ tương ứng lần lượt từ 0,15 ng/ml đến 15 ng/ml, từ 1,25 ng/ml đến 125 ng/ml và từ 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Tiến hành lặp lại trên 5 đường chuẩn riêng rẽ. Xác định sự tương quan giữa nồng độ AML, PRD, PRL có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/AML-d4; PRD/PRD-d4; PRL/PRL-d4 bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/\text{nồng độ}^2$). Tóm tắt kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính

STT	Phương trình hồi qui ($y=ax+b$)		
	AML	PRD	PRL
Đường chuẩn 1	$y = 0,148x - 0,00126$ $r = 0,9944$	$y = 0,0179x + 0,00087$ $r = 0,9997$	$y = 0,115x + 0,00267$ $r = 0,9989$
Đường chuẩn 2	$y = 0,145x + 0,00221$ $r = 0,9985$	$y = 0,0174x + 0,00158$ $r = 0,9995$	$y = 0,112x + 0,00329$ $r = 0,9994$
Đường chuẩn 3	$y = 0,151x + 0,000794$ $r = 0,9982$	$y = 0,0199x - 0,000451$ $r = 0,9982$	$y = 0,129x - 0,000501$ $r = 0,9995$
Đường chuẩn 4	$y = 0,149x + 0,00485$ $r = 0,9952$	$y = 0,0191x + 0,00352$ $r = 0,9988$	$y = 0,131x + 0,00669$ $r = 0,9986$
Đường chuẩn 5	$y = 0,155x + 0,000878$ $r = 0,9989$	$y = 0,0196x + 0,0026$ $r = 0,9976$	$y = 0,124x + 0,00752$ $r = 0,9987$

Kết quả thẩm định cho thấy, trong khoảng nồng độ từ 0,15 ng/ml đến 15 ng/ml đối với AML, từ 1,25 ng/ml đến 125 ng/ml đối với PRD và từ 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml đối với PRL có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ AML, PRD, PRL với tỷ lệ diện tích pic tương ứng AML/AML-d4; PRD/PRD-d4; PRL/PRL-d4 với hệ số tương quan $> 0,99$. Nồng độ AML, PRD, PRL 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. Xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại tại 4 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC, mỗi mức nồng độ tối thiểu 6 mẫu. Xác định nồng độ AML, PRD, PRL có trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Tiến hành trên 3 ngày khác nhau. Kết quả xác định độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 4,5,6.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày -AML

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (10 pg/ml)		Mẫu LQC (30 pg/ml)		Mẫu MQC (4000 pg/ml)		Mẫu HQC (8000 pg/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 %)
Ngày 1 (n = 6)	106,2	11,6	100,3	7,3	93,9	6,0	101,1	4,2
Ngày 2 (n = 6)	108,4	7,8	97,2	3,7	99,4	6,7	107,4	3,5
Ngày 3 (n = 6)	93,9	6,1	100,1	4,1	108,7	2,3	112,4	7,9
Khác ngày (n = 3)	102,8	10,6	99,2	5,2	100,7	7,9	107,0	6,9

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày -PRD

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (10 ng/ml)		Mẫu LQC (30 ng/ml)		Mẫu MQC (1000 ng/ml)		Mẫu HQC (2000 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 %)
Ngày 1 (n = 6)	101,5	7,1	98,2	4,4	97,7	4,1	95,5	3,9
Ngày 2 (n = 6)	98,1	7,0	100,7	4,3	104,6	3,8	101,6	2,7
Ngày 3 (n = 6)	102,1	3,2	110,2	2,9	110,1	3,4	108,4	5,5
Khác ngày (n = 3)	100,6	5,9	103,0	6,3	104,2	6,1	101,8	6,7

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày –PRL

Độ đúng, Độ lặp lại	Mẫu LLOQ (0,2 ng/ml)		Mẫu LQC (0,6 ng/ml)		Mẫu MQC (20 ng/ml)		Mẫu HQC (40 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 %)
Ngày 1 (n = 6)	106,8	5,7	100,9	4,2	100,6	5,3	96,4	4,7
Ngày 2 (n = 6)	88,2	13,3	104,6	3,0	107,3	5,5	105,6	2,5
Ngày 3 (n = 6)	84,2	9,5	87,9	5,2	96,1	1,9	96,2	3,7
Khác ngày (n = 3)	93,1	14,1	97,8	8,5	101,3	6,4	99,4	5,7

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 từ 85 % đến 115 % (ngoại trừ mẫu LLOQ từ 80 % đến 120 %); độ lặp lại trong ngày, khác ngày với giá trị CV < 15,0 % (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 và EMA.

3.2.4. 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 7.

Bảng 7. Kết quả ảnh hưởng của nền mẫu

Mức nồng độ	AML		PRD		PRL	
	MF _{AML} /MF _{IS}	CV %	MF _{PRD} /MF _{IS}	CV %	MF _{PRL} /MF _{IS}	CV %
LQC (n = 6)	1,169	8,1	1,114	5,1	1,231	11,6
HQC (n = 6)	1,116	9,3	1,066	4,8	1,095	8,1

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.

3.2.5. Tỷ lệ thu hồi

Tiến hành đánh giá tỷ lệ thu hồi của AML, PRD, PRL tại ba mức nồng độ LQC, 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 AML, PRD, PRL trong huyết tương được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả tỷ lệ thu hồi của AML, PRD, PRL trong huyết tương

Mức nồng độ	Tỷ lệ thu hồi (%)		
	AML	PRD	PRL
LQC (n = 6)	102,1	113,1	105,4
MQC (n = 6)	101,2	111,6	109,3
HQC (n = 6)	100,3	103,4	101,7
Trung bình	101,2	109,4	105,5
CV %	0,9	4,8	3,6

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao (~100%) và ổn định (CV % < 5 %) đối với cả ba hoạt chất với, đáp ứng các yêu cầu phân tích thuốc trong dịch sinh học.

3.2.6. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của AML, PRD, PRL trên các lô mẫu ở hai mức nồng độ LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của AML, PRD, PRL trong HT bằng cách

so sánh nồng độ AML, PRD, PRL 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 AML, PRD, PRL trong huyết tương được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của AML, PRD, PRL trong huyết tương

Độ ổn định		LQC (n = 6)			HQC (n = 6)		
		AML	PRD	PRL	AML	PRD	PRL
Sau 5 chu kỳ đông – rã đông	% độ ổn định	100,8	102,9	105,7	100,8	107,9	114,3
	CV %	8,0	3,5	6,4	4,7	8,9	4,4
Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ; nhiệt độ phòng)	% độ ổn định	103,0	100,6	102,8	108,4	104,4	106,2
	CV %	5,9	2,7	4,0	7,4	8,4	4,6
Độ ổn định thời gian dài (119 ngày; -35 °C)	% độ ổn định	95,9	108,2	97,6	99,7	111,3	92,5
	CV %	7,2	1,6	4,8	3,8	3,1	3,6

Kết quả thẩm định cho thấy, độ ổn định của AML, PRD, PRL trong huyết tương tại các điều kiện bảo quản khác nhau (sau 5 chu kỳ đông – rã đông; bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 6 giờ và bảo quản ở -35°C sau 119 ngày) đáp ứng các yêu cầu về độ ổn định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời amlodipin, perindopril và chất chuyển hóa có hoạt tính perindoprilat trong huyết tương người bằng LC/MS-MS với giá trị giới hạn định lượng dưới lần

lượt là 0,15 ng/ml, 1,25 ng/ml và 0,2 ng/ml; khoảng tuyến tính rộng, lần lượt từ 0,15 đến 15 ng/ml; 1,25 đến 125 ng/ml và 0,2 ng/ml đến 20 ng/ml, phù hợp với thông số được động học của các chất phân tích; độ đúng, độ lặp lại đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo qui định của EMA [6] và US-FDA [7]. Phương pháp có qui trình xử lý mẫu nhanh, đơn giản, chi phí thấp, thời gian phân tích ngắn (4,5 phút cho mỗi mẫu). Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học chế phẩm chứa đồng thời hoạt chất amlodipin và perindopril.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hội đồng Dược thư Quốc gia Việt Nam (2022), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, lần xuất bản thứ ba, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, tr. 203-204 và tr. 1293-1294.
- Cục Quản lý Dược, *Ngân hàng dữ liệu Ngành Dược*, <https://drugbank.vn/thuoc/Coveram-10mg--10mg&VN-18632-15>.
- Tao Y., Wang S., et al. (2018), Simultaneous determination of indapamide, perindopril and perindoprilat in human plasma or whole blood by UPLC-MS/MS and its pharmacokinetic application, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(5), doi: 10.1016/j.jpha.2018.05.004.
- Zheng X., Gao H., et al. (2021), Simultaneous determination of indapamide, perindopril and its active metabolite perindoprilat in human plasma using UPLC-MS/MS method, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122585.
- Rezk M.R., Badr K.A. (2020), Determination of amlodipine, indapamide and perindopril in human plasma by a novel LC-MS/MS method: Application to a bioequivalence study, *Biomedical Chromatography*, doi: 10.1002/bmc.5048.
- European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012), *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018), *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*.