

DETERMINATION OF SOLIFENACIN IN HUMAN PLASMA BY LC-MS/MS METHOD

LE THI LA^{1,✉}, CAO NGOC CUONG¹, PHAN THI NGHIA¹,
NGUYEN THI HOAI THUONG², NGUYEN THI CHAM¹, TRUONG THI THUY¹

¹National Institute of Drug Quality Control

²VNU University of Medicine and Pharmacy

✉Corresponding author: la.tdsh@gmail.com

Received October 10th, 2025
Accepted November 18th, 2025

Abstract: A high and specific method using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of solifenacin in human plasma was developed. Solifenacin-d5 were utilized as internal standard. Analytes were extracted from plasma by liquid-liquid extraction method using tert-butyl methyl ether. Liquid chromatography was performed on Hypersil Gold C18; 50 x 2.1 mm; 1.9 μ m column with of 5 mM ammonium acetate, with 0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phase at flow rate of 0.2 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 0.1 to 25.0 ng/mL. The method's precision and accuracy are within acceptable limit. The validated method has been used successfully to determine solifenacin concentration in healthy adult volunteers and demonstrate its applicability to bioavailability/bioequivalence studies of solifenacin preparations.

Keywords: solifenacin, plasma, LC-MS/MS.

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG SOLIFENACIN TRONG HUYẾT TƯƠNG NGƯỜI BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS

LÊ THỊ LA^{1,✉}, CAO NGỌC CƯỜNG¹, PHAN THỊ NGHĨA¹,
NGUYỄN THỊ HOÀI THƯƠNG², NGUYỄN THỊ CHÂM¹, TRƯƠNG THỊ THỦY¹

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

²Trường đại học y dược, Đại học quốc gia Hà Nội

✉Tác giả liên hệ: la.tdsh@gmail.com

Nhận bài ngày 10 tháng 10 năm 2025
Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 11 năm 2025

Tóm tắt: Nghiên cứu phát triển một phương pháp định lượng solifenacin trong mẫu huyết tương người bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ (LC/MS-MS), trong đó solifenacin-d5 được sử dụng làm chuẩn nội. Các chất phân tích được chiết tách từ huyết tương bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng sử dụng tert-butyl methyl ether. Chương trình sắc ký được thực hiện trên cột Hypersil Gold C18; 50 x 2,1 mm; 1,9 μ m với thành phần pha động là amoni acetat 5 mM chứa acid formic 0,1% và acetonitril, tốc độ dòng 0,2 mL/phút. Phương pháp có thời gian phân tích ngắn, có giá trị LLOQ thấp, khoảng tuyến tính rộng từ 0,1 đến 25,0 ng/mL, có độ đúng và độ chính xác đáp ứng yêu cầu. Phương pháp đã được ứng dụng

đề định lượng nồng độ 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 solifenacin.

Từ khóa: solifenacin, huyết tương, LC-MS/MS.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Solifenacin (SLF) là một thuốc đối kháng thụ thể muscarinic (M3), chủ yếu được sử dụng để điều trị hội chứng bàng quang tăng hoạt. Bàng quang được chi phối bởi các dây thần kinh cholinergic phó giao cảm. Acetylcholine cơ thắt cơ trơn detrusor thông qua các thụ thể muscarinic mà phân nhóm M3 chủ yếu tham gia. Các nghiên cứu dược lý trong ống nghiệm và trong cơ thể sống chỉ ra rằng solifenacin là chất ức chế cạnh tranh của thụ thể phân nhóm muscarinic M3. Ngoài ra, solifenacin cho thấy là chất đối kháng đặc hiệu với các thụ thể muscarinic bằng cách thể hiện ái lực thấp hoặc không có đối với nhiều thụ thể và kênh ion khác nhau đã được thử nghiệm [1].

Tiểu không tự chủ là tình trạng phổ biến mà nhiều người gặp phải, gây ảnh hưởng rất lớn đến sinh hoạt, tâm lý và chất lượng cuộc sống nói chung. Vấn đề này xuất phát từ nhiều nguyên nhân khác nhau, có thể cải thiện hiệu quả nếu được chẩn đoán và điều trị sớm. Tuy nhiên, trong trường hợp ngược lại, tình trạng có thể tiến triển thành nhiều biến chứng nghiêm trọng. Trên thị trường đã có nhiều chế phẩm chứa solifenacin để điều trị hội chứng bàng quang tăng hoạt (OAB - Overactive Bladder). Sau khi uống liều đơn chế phẩm solifenacin hàm lượng 5 mg – 10 mg, nồng độ cực đại trong huyết tương của SLF rất thấp [2 – 5], nên việc xác định nồng độ SLF 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. Hiện nay, nhiều phương pháp phân tích đã được sử dụng để định lượng SLF như quang phổ UV-Vis, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và sắc ký lỏng kết nối với detector khối phổ (LC-MS/MS) [4 – 6]. Trong đó, LC-MS/MS được xem là phương pháp tối ưu do độ nhạy cao, khả năng phân tích nhanh và khả năng phát hiện nồng độ rất thấp của thuốc trong mẫu sinh học.

Vì vậy, để đáp ứng yêu cầu đánh giá tương đương sinh học cho các chế phẩm solifenacin và dựa vào trang thiết bị hiện có, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng SLF trong huyết tương người bằng phương pháp 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 Waters Xevo TQD (Waters - Mỹ); cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ, độ chính xác $d = 0,01$ 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.

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 solifenacin succinat của USP, Mỹ, SKS: R082W0, hàm lượng 0,999 mg/mg tính theo nguyên trạng. Hệ số quy đổi: *Solifenacin / Solifenacin succinat*: 362,5 / 480,55.

Chất chuẩn nội: solifenacin-d5 hydroclorid của Toronto Research Chemicals, Canada, SKS: 10-SBK-115-4, hàm lượng 98% tính theo nguyên trạng. Hệ số quy đổi: *Solifenacin-d5 (SLF-d5) / Solifenacin-d5 hydroclorid*: 367,5 / 403,96.

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 Na_2EDTA ; không có SLF do Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 cung cấp. Mẫu huyết tương tự tạo: là các mẫu huyết tương trắng cho thêm chuẩn SLF.

Mẫu huyết tương của người tình nguyện uống viên nén bao phim solifenacin succinat 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 SLF-d5 là chuẩn nội cho SLF.

* Khảo sát điều kiện khối phổ

Đưa vào thiết bị khối phổ dung dịch chuẩn có nồng độ SLF 200 ng/mL trong hỗn hợp methanol – nước (1 : 1) để xác định thông số khối phổ. Khảo sát và tối ưu hóa các điều kiện về 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 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 – 6] 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 μ m; cột Thermo C18, 50 x 3 mm; 2,1 μ m; cột Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,9 μ m) 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) theo các tỷ lệ khác nhau với mục tiêu thu được pic SLF 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 SLF là 3,96 [9] không phù hợp với phương pháp tủa protein nên có thể sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng. Tiến hành khảo sát trên các mẫu huyết tương trắng và huyết tương tự tạo chứa chuẩn SLF ở nồng độ giới hạn định lượng dưới (LLOQ) bằng các phương pháp xử lý mẫu khác nhau như: chiết lỏng-lỏng bằng diethyl ether, tert-butyl methyl ether hoặc hỗn hợp diethyl ether – cloroform (8 : 2) với mục tiêu thu được pic SLF 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 SLF trong huyết tương người theo các hướng dẫn của US-FDA

[6], EMA [7] và ICH [8] 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 nhiễu 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: SLF cho cường độ tín hiệu mảnh phổ cao hơn ở chế độ ion dương dưới dạng $[M+H]^+$ có m/z 363,2. Tiếp tục phân mảnh các ion mẹ đã lựa chọn, xác định được ion con có tín hiệu cao, ổn định sử dụng để định lượng có số khối là 110,0. Tiến hành tương tự để xác định thông số khối phổ cho chất chuẩn nội tương ứng: SLF-d5 có m/z 368,2 và ion con có số khối là 110,0. Kết quả được tóm tắt ở Bảng 1.

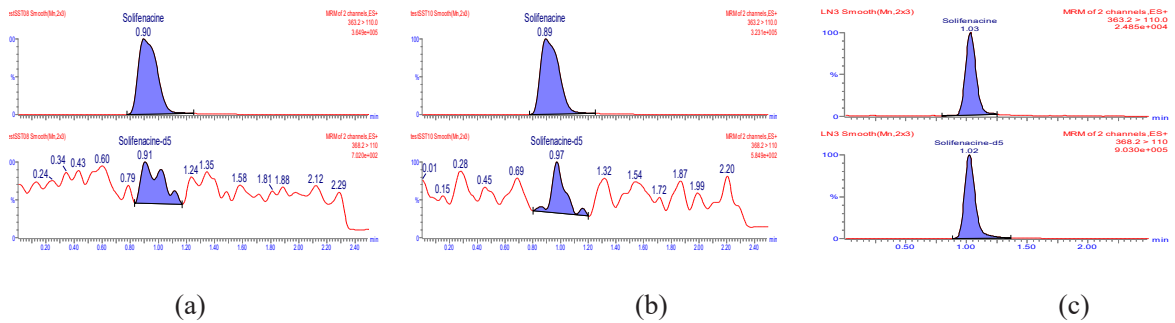
3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện sắc ký

- *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 acetonitril – dung dịch amoni acetat 5 mM chứa acid formic 0,1% cho đáp ứng của SLF 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 chế độ (ESI+) cường độ tín hiệu của SLF ổn định.

Tiến hành khảo sát trên các cột sắc ký khác nhau, kết quả cho thấy cho thấy khi phân tích trên cột Acquity BEH C18, 100 x 2,1 mm; 1,9 μ m; Cột Thermo C18, 50 x 3 mm; 2,1 μ m pic bị tù và doãng, đáp ứng thấp hơn. Khi sử dụng cột Hypersil Gold C18; 50 x 2,1 mm; 1,9 μ m với bảo vệ cột C18, 4 x 3 mm thì đáp ứng pic cao, hình dáng pic cân đối. Vì vậy, lựa chọn cột tối ưu nhất là Hypersil gold C18, 50 x 2,1 mm; 1,9 μ m để tiếp tục khảo sát.



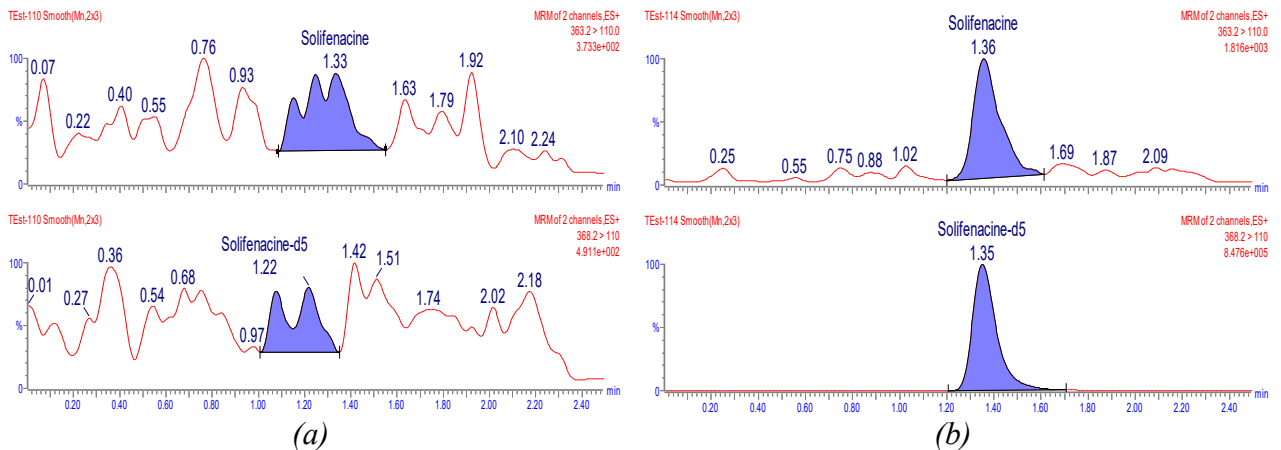
Hình 1. SKĐ mẫu chuẩn SLF: trên cột Acquity BEH C18, 100 x 2,1 mm, 1,9 μ m (a), trên cột Thermo C18, 50 x 3 mm, 2,1 μ m (b) và trên cột Hypersil Gold C18; 50 x 2,1 mm; 1,9 μ m (c)

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 hoặc MeCN có quy trình xử lý mẫu nhanh tuy nhiên không xuất hiện đáp ứng pic của SLF.

Phương pháp chiết lỏng-lỏng bằng hỗn hợp diethyl ether – cloroform (8 : 2) nền mẫu sạch tuy nhiên đáp ứng thấp. Khi chiết lỏng-lỏng bằng tert-butyl methyl ether nền sạch, pic có hình dáng cân đối, đáp ứng cao hơn.



Hình 2. SKĐ mẫu huyết tương tủa bằng MeCN (a) và SKĐ mẫu huyết tương được chiết lỏng-lỏng bằng tert-butyl methyl ether (b)

* **Tóm lại:** Từ các kết quả khảo sát trên, đã xây dựng phương pháp định lượng solifenacin 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 SLF và chuẩn nội

| Thông số \ Hoạt chất | Solifenacin | Solifenacin-d5 (IS) |
|------------------------------|-------------|---------------------|
| Chế độ ion hóa | ESI (+) | ESI (+) |
| Capillary voltage (kVolt) | 3,2 | 1,0 |
| Cone voltage (Volt) | 60 | 60 |
| Desolvation temperature (°C) | 400 | 400 |
| Desolvation gas (lít/giờ) | 800 | 800 |
| Cone gas (lít/giờ) | 100 | 100 |
| Collision energy (Volt) | 28 | 28 |
| Ion ban đầu (m/z) | 363,2 | 368,2 |
| Ion tạo thành (m/z) | 110,0 | 110,0 |

- Điều kiện sắc ký:

- + Cột Acquity BEH C18; 100 x 2,1 mm; 1,9 µm.
- + Pha động: Acetonitril - dung dịch amoni acetat 5 mM chứa acid formic 0,1% (70 : 30)
- + Tốc độ dòng: 0,2 mL/phút
- + Thể tích tiêm mẫu: 10 µL
- + Nhiệt độ autosampler (buồng tiêm mẫu): nhiệt độ phòng
- Phương pháp chuẩn bị mẫu:
 - + Dung dịch chuẩn gốc: chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc và chuẩn nội gốc riêng biệt trong methanol có nồng độ SLF, SLF-d5 là 200 µg/mL.
 - + Dung dịch chuẩn nội làm việc: từ dung dịch chuẩn nội gốc SLF-d5 chuẩn bị dung dịch chuẩn nội làm việc trong hỗn hợp methanol - nước tỷ lệ 1 : 1 (tt/tt) có nồng độ SLF-d5 là 100 ng/mL.
 - + Đường chuẩn và mẫu kiểm tra trong huyết tương: Chuẩn bị dãy đường chuẩn trong huyết tương chứa dược chất SLF có nồng độ là 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0; 12,5; 21,25; 25,0 ng/mL. Mẫu kiểm tra được chuẩn bị độc lập ở 4 mức nồng độ: LQC (0,3 ng/mL); SQC (3,0 ng/mL); MQC (10,0 ng/mL); HQC (20,0 ng/mL).
- Quy trình xử lý mẫu:
 - Lấy 0,2 mL mẫu huyết tương, thêm 20 µL dung dịch

chuẩn nội làm việc, thêm 800 µL dung môi tert-butyl methyl ether, lắc xoáy 2000 vòng/phút trong 3 phút. Ly tâm 9000 vòng/phút (RCF: 9056 g) trong 5 phút. Hút 480 µL 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 acetonitril – dung dịch amoni acetat 5 mM chứa acid formic 0,1% (70 : 30) (tt/tt), chuyển vào lọ tiêm sắc ký.

- Phương pháp tính kết quả

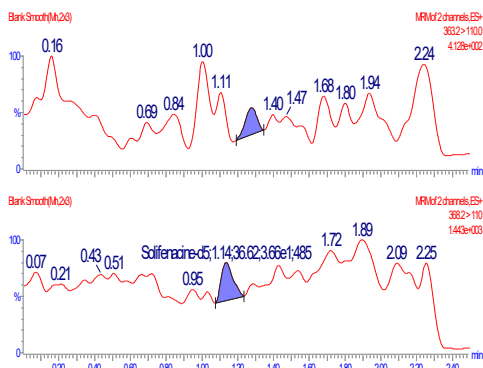
Xác định nồng độ SLF có trong các mẫu thử dựa vào tỷ lệ diện tích pic SLF/SLF-d5 thu được từ sắc ký đồ của mẫu thử và đường chuẩn tương ứng phân tích trong cùng điều kiện.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

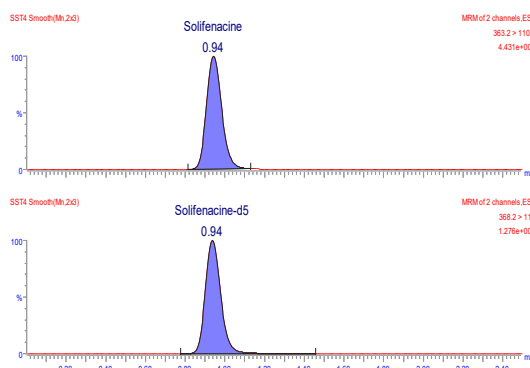
3.2.1. Độ đặc hiệu – chọn lọc của phương pháp

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 SLF với nồng độ là 0,1 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 0,94 phút (trùng với thời gian lưu của SLF, SLF-d5 như trên SKĐ mẫu HT tự tạo (Hình 4).



Hình 3. SKĐ mẫu HT trắng



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

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

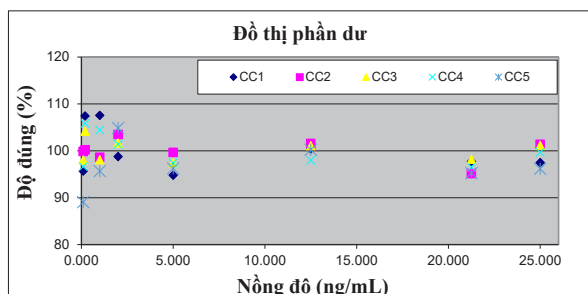
3.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Phân tích các mẫu HT chứa chuẩn SLF có nồng độ khoảng từ 0,1 ng/mL đến 25,0 ng/mL và chuẩn nội theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ SLF có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic SLF/SLF-d5 bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng ($1/\text{nồng độ}^2$). Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và tỷ lệ diện tích pic được trình bày trong Bảng 2 và đồ thị phần dư của các đường chuẩn được trình bày ở Hình 5.

Bảng 2. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính của phương pháp

| Khoảng nồng độ (ng/mL) | Đường chuẩn | Độ đúng (%) Min - max | Phương trình hồi quy ($y = ax+b$) Hệ số tương quan (r) |
|------------------------|-------------|--------------------------|---|
| 0,1 – 25,0 | 1 | 94,8 – 107,6 | $y = 0,0938132x + 0,000638624$; $r = 0,998506$ |
| | 2 | 95,2 – 103,5 | $y = 0,0908704x + 0,000971303$; $r = 0,999636$ |
| | 3 | 97,5 – 104,2 | $y = 0,0924301x + 0,00145055$; $r = 0,999653$ |
| | 4 | 96,5 – 105,9 | $y = 0,0945697x + 0,000604707$; $r = 0,999216$ |
| | 5* | 96,9 – 107,1 | $y = 0,0932711x + 0,000202835$; $r = 0,999324$ |

(*): Loại bỏ điểm chuẩn S2 có độ đúng nằm ngoài khoảng 85% -115%



Hình 5. Đồ thị phần dư của các đường chuẩn thực nghiệm theo mô hình weighting $1/x^2$

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ 0,1 – 25,0 ng/mL có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ SLF với tỷ lệ diện tích pic SLF/SLF-d5 với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ SLF xác định từ đường chuẩn so với nồng độ pha thực tế 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 SLF với nồng độ là 0,1 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 3.

Bảng 3. Kết quả xác định giá trị LLOQ

| Chất phân tích | SLF | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| | Lô 1 | Lô 2 | Lô 3 |
| Lô | | | |
| Diện tích mẫu zero (n=1) | 92 | 117 | 117 |
| Diện tích trung bình mẫu LLOQ (n=6) | 1217 | 1219 | 1184 |
| Tỷ lệ LLOQ/Zero | 13,2 | 10,4 | 10,1 |
| Độ đúng (%) (n = 6) | 111,8 | 104,4 | 111,7 |
| CV (%) (n = 6) | 5,7 | 2,2 | 9,9 |
| Độ đúng (%) (n = 18) | 109,3 | | |
| CV (%) (n = 18) | 7,2 | | |

Kết quả thẩm định cho thấy, tại thời điểm trùng với thời gian lưu của SLF 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 pha thực tế; 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 (0,1 ng/mL), LQC (0,3 ng/mL), SQC (3,0 ng/mL), MQC (10,0 ng/mL) và HQC (20,0 ng/mL), mỗi mức nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Thực hiện trên 3 ngày khác nhau. Xác định nồng độ SLF 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 4.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày, khác ngày

| STT | Độ đúng (%) | | | | | CV (%) | | | | |
|--------------------|-------------|-------|------|-------|-------|--------|-----|-----|-----|-----|
| | LLOQ | LQC | SQC | MQC | HQC | LLOQ | LQC | SQC | MQC | HQC |
| Ngày 1 (n = 6) | 111,8 | 107,3 | 96,5 | 101,1 | 100,0 | 5,7 | 3,0 | 1,5 | 1,1 | 0,8 |
| Ngày 2 (n = 6) | 104,4 | 107,5 | 96,0 | 100,1 | 98,9 | 2,2 | 2,3 | 1,4 | 0,7 | 1,5 |
| Ngày 3 (n = 6) | 111,7 | 109,0 | 97,8 | 102,2 | 101,9 | 9,9 | 2,5 | 1,2 | 1,1 | 1,2 |
| Khác ngày (n = 18) | 109,3 | 107,9 | 96,8 | 101,2 | 100,3 | 7,2 | 2,6 | 1,5 | 1,3 | 1,7 |

Kết quả thẩm định cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp 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 chính xác 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 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 chất phân tích. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả ảnh hưởng nền mẫu

| Mức nồng độ | SLF | |
|-------------|--------------------|--------|
| | MF_{SLF}/MF_{IS} | CV (%) |
| LQC (n = 6) | 0,974 | 2,3 |
| HQC (n = 6) | 0,946 | 1,3 |

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 SLF tại bốn 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 SLF trong huyết tương được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả tỷ lệ thu hồi SLF trong huyết tương

| Mức nồng độ | % thu hồi | CV (%) | |
|-------------|-----------|--------------------|--------------------------|
| | | Mẫu qua chiết tách | Mẫu không qua chiết tách |
| LQC (n = 6) | 100,6 | 2,8 | 5,1 |
| SQC (n = 6) | 101,2 | 3,1 | 3,7 |
| MQC (n = 6) | 96,0 | 7,6 | 4,4 |
| HQC (n = 6) | 105,7 | 5,2 | 3,8 |

Kết quả thẩm định cho thấy tỷ lệ thu hồi của dược chất ở bốn mức nồng độ 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 triglycerid 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 7.

Bảng 7. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của mỡ máu, tan huyết

| Độ ổn định | Mẫu | % độ đúng | CV (%) |
|-------------------------|-----|-----------|--------|
| Ảnh hưởng của mỡ máu | LQC | 106,1 | 4,2 |
| | HQC | 98,8 | 2,1 |
| Ảnh hưởng của tan huyết | LQC | 101,3 | 2,2 |
| | HQC | 96,7 | 2,9 |

3.2.8. Độ ổn định của dược chất trong huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của SLF trong HT trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của SLF trong HT bằng cách so sánh nồng độ SLF có trong mẫu dược 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 căn sau bốc hơi. Kết quả nghiên cứu độ ổn định được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của SLF

| Độ ổn định | Mẫu | % độ ổn định | CV (%) |
|--|-----|--------------|--------|
| Sau 6 chu kỳ đông – rã đông | LQC | 99,7 | 4,3 |
| | HQC | 99,0 | 4,2 |
| Độ ổn định thời gian ngắn (6 giờ 00 phút; nhiệt độ phòng) | LQC | 95,7 | 5,3 |
| | HQC | 101,9 | 2,1 |
| Độ ổn định thời gian dài (118 ngày; -35°C) | LQC | 104,7 | 5,3 |
| | HQC | 101,6 | 1,1 |
| Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu (nhiệt độ phòng) | LQC | 108,2 | 0,9 |
| | HQC | 100,9 | 0,6 |
| Độ ổn định cần sau bốc hơi (2,5 giờ; nhiệt độ phòng) | LQC | 107,4 | 2,1 |
| | HQC | 100,3 | 1,1 |

Kết quả thẩm định cho thấy % độ ổn định của SLF trong HT 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 solifenacin trong mẫu huyết tương người tình nguyện (NTN).

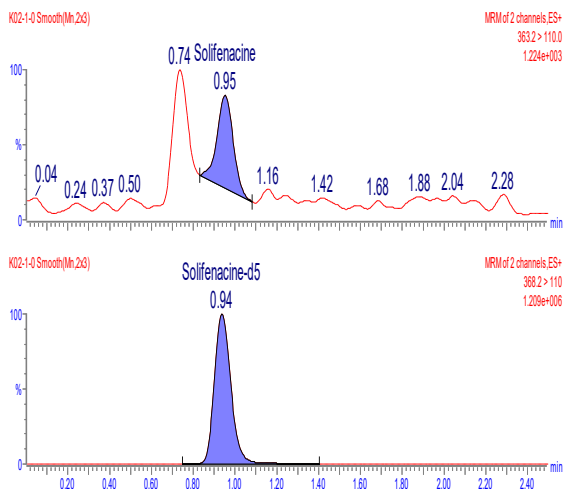
Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng nồng độ SLF trong huyết tương của 02 người tình nguyện (NTN) đại diện sau khi uống 01 viên nén bao phim solifenacin succinat 5 mg trong tình trạng đói. Lấy mẫu máu tại các thời điểm: 0 giờ (trước khi uống thuốc) và 1; 2; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9; 10; 12; 24; 36; 48; 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 SLF trong mẫu huyết tương của 02 người tình nguyện tại các thời điểm trước và sau khi dùng thuốc được trình bày trong Bảng 9. Sắc ký đồ đại diện cho mẫu trong huyết tương người tình nguyện được trình bày trong Hình 6, 7.

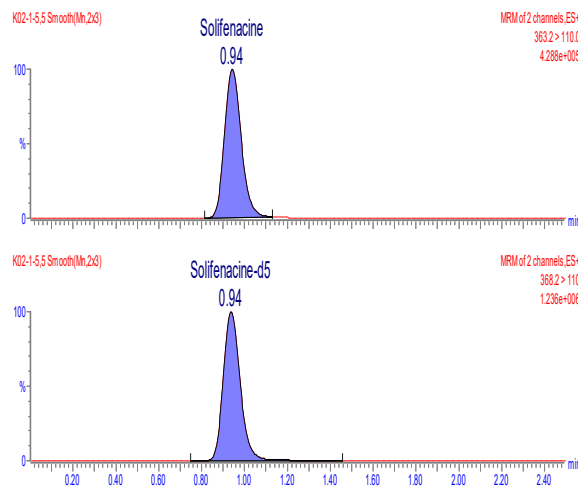
Bảng 9. Kết quả nồng độ SLF trong huyết tương của NTN và các thông số dược động học

| Thời gian (giờ) | Nồng độ (ng/mL) | |
|-----------------|-----------------|--------|
| | NTN 01 | NTN 02 |
| 0 | 0,000 | 0,000 |
| 1 | 0,433 | 1,012 |
| 2 | 3,840 | 5,925 |

| | | |
|--------------------------|---------|---------|
| 3 | 6,034 | 8,050 |
| 3,5 | 6,917 | 8,846 |
| 4 | 6,407 | 8,662 |
| 4,5 | 7,390 | 7,864 |
| 5 | 7,189 | 7,755 |
| 5,5 | 7,500 | 7,487 |
| 6 | 7,262 | 7,382 |
| 6,5 | 7,411 | 7,345 |
| 7 | 7,105 | 7,077 |
| 8 | 6,386 | 6,488 |
| 9 | 6,222 | 5,982 |
| 10 | 6,199 | 5,503 |
| 12 | 5,662 | 5,684 |
| 24 | 5,090 | 4,269 |
| 36 | 4,018 | 3,027 |
| 48 | 3,270 | 2,497 |
| 72 | 2,616 | 1,583 |
| t_{max} (giờ) | 5,5 | 4,0 |
| C_{max} (ng/mL) | 7,500 | 8,662 |
| AUC_{last} (giờ.ng/mL) | 299,906 | 257,714 |
| AUC_{inf} (giờ.ng/mL) | 481,703 | 336,551 |
| $t_{1/2}$ (giờ) | 48,17 | 34,52 |



Hình 6. SKĐ mẫu HT thời điểm trước khi uống thuốc của NTN 01



Hình 7. SKĐ mẫu HT thời điểm sau khi uống thuốc 5,5 giờ của NTN 01

Kết quả phân tích trên NTN cho thấy:

Trên sắc ký đồ mẫu huyết tương của người tình nguyện trước khi uống thuốc (Hình 6) đáp ứng tại thời điểm tương ứng với thời gian lưu của SLF đều không lớn hơn 20% đáp ứng mẫu LLOQ, vì vậy nền mẫu huyết tương không ảnh hưởng đến độ chọn lọc của phương pháp và phù hợp với kết quả thẩm định phương pháp.

Nồng độ đỉnh trong huyết tương (C_{max}) của 02 NTN nằm trong khoảng đường chuẩn không cần phải tiến hành pha loãng mẫu khi phân tích. Do đó, khoảng đường chuẩn đã xây dựng là phù hợp với SLF. Có hai mẫu LQC, SQC nằm trong khoảng nồng độ phân tích mẫu NTN, đảm bảo yêu cầu phân tích mẫu trong dịch sinh học. Các thông số được động học như C_{max} ; t_{max}

của 02 người tình nguyện tương tự với các tài liệu đã công bố [4 – 6].

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng solifenacin trong huyết tương người bằng UPLC/MS-MS với thời gian phân tích ngắn (3,5 phút), có giá trị giới hạn định lượng dưới là 0,1 ng/mL; khoảng tuyến tính từ 0,1 ng/mL đến 25,0 ng/mL; 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 solifenacin ở các hàm lượng khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Solifenacin 10 mg film-coated tablets - Summary of Product Characteristics (SmPC) (emc) | 10428. Accessed April <https://www.medicines.org.uk/emc/product/10428/smpc#gref>.
- European Medicines Agency (2009), Assessment report for irbesartan/ solifenacin Teva, Procedure No. EMEA/H/C/001112
- Faculty of Pharmacy and Medical Sciences, Al-Ahliyya Amman University, Jordan, “Quantitation of Solifenacin in Human Plasma using a Specific and Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Technique”, Tropical Journal of Pharmaceutical Research May 2015; Pages 845-851
- Srinivasa Babu Puttagunta, Rihana Parveen Shaik, Chandrasekhar Kothapalli Bannoth, Bala Sekhara Reddy Challa and Bahlul Zayed Sh Awen, “Bioanalytical method for quantification of Solifenacin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study”, Puttagunta et al. Journal of Analytical Science and Technology 2014.
- DoHwanKim, Myoung Jin Ho, ChanKyueJeong and MyungJooKang, “Novel Bioequivalent Tablet of Solifenacin Succinate Prepared Using Direct Compression Technique for Improved Chemical Stability”, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061723>.

6. Jan Macek, Pavel Ptáček, Josef Klíma, “Determination of solifenacin in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry”, *Journal Chromatography B*, Volume 878, Issue 31, Pages 3327 – 3330.
7. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018), *Guidance for industry-Bioanalytical method validation*.
8. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2012), *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*
9. International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use (2022), “*Bioanalytical method validation and study sample analysis M10*”
10. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/solifenacin>