

Xây dựng phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản

Nguyễn Hồng Ánh¹, Trần Lê Trường An¹, Nguyễn Thị Như Ngọc^{1*}
(1) Khoa Dược, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Amlodipin là thuốc chẹn kênh canxi làm hạ huyết áp được sử dụng phổ biến. Ở Việt Nam chưa có phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản. Đề tài được thực hiện với hai mục tiêu: Xây dựng phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản; Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn US-FDA và EMA. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu huyết tương chứa amlodipin. Sau khi xây dựng phương pháp xử lý mẫu và khảo sát lựa chọn điều kiện điện di, phương pháp được thẩm định theo US – FDA và EMA. **Kết quả:** Amlodipin và chất chuẩn nội nifedipin trong mẫu huyết tương được kiểm hóa và chiết lỏng – lỏng bằng ethyl acetat. Điều kiện điện di: Cột mao quản silica (Chiều dài hiệu dụng: 48,5 cm – Chiều dài tổng: 57,5 cm – Đường kính ngoài: 360 µm – Đường kính trong: 75 µm), nhiệt độ cassette: 25 ± 1 °C, điện thế nguồn: +25 kV, cường độ dòng: 300 µA, bước sóng phát hiện: 237 nm, tiêm mẫu: 35 mBar – 7 giây, dung dịch điện ly nền: Đệm borat 50 mM pH 8,6 chứa SDS 20 mM. Phương pháp được thẩm định đạt các yêu cầu theo US – FDA và EMA. **Kết luận:** Phương pháp có thể làm cơ sở trong các nghiên cứu tương đương sinh học chế phẩm thuốc chứa amlodipin.

Từ khóa: Amlodipin, huyết tương, điện di mao quản.

Abstract

Development of capillary electrophoresis method for determination of amlodipine in human plasma

Nguyen Hong Anh¹, Tran Le Truong An¹, Nguyen Thi Nhu Ngoc^{1*}
(1) Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: Amlodipine, a calcium channel blocker, is commonly prescribed to treat high blood pressure. In Vietnam, there is no method of quantifying amlodipine in plasma by capillary electrophoresis. Therefore, the thesis was carried out with the objective: Developing and validating a method for quantifying amlodipine in human plasma by capillary electrophoresis. **Materials and methods:** Human plasma samples contain amlodipine. After optimizing the process, the method was validated according to the guidelines for validation of bioanalytical methods of US-FDA and EMA. **Results:** Amlodipine and nifedipine as internal standard (IS) were alkalized with sodium hydroxide and extracted from human plasma by liquid - liquid extraction technique with ethyl acetate. Electrophoresis conditions: Fused-silica capillary column (effective column length: 48.5 cm, total column length 57.5 cm, outside diameter: 75 µm, internal diameter: 75 µm), background electrolyte: 50 mM borate buffer at pH 8.6 containing 20 mM sodium dodecyl sulfate, voltage: +25 kV, current: 300 µA, column temperature: 25 ± 1 °C, sample injection: 35 mBar - 7s, detection at 237 nm. The method was validated and met US-FDA and EMA requirements. **Conclusion:** The method can serve as a basis in bioequivalence studies of medicinal products containing amlodipine.

Key words: Amlodipin, human plasma, capillary electrophoresis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Amlodipin (AML) là dẫn chất của dihydropyridin có tác dụng chẹn calci qua màng tế bào trên cơ trơn mạch máu qua đó làm giảm sức cản mạch máu ngoại biên và hạ huyết áp [1]. Việc kiểm soát nồng độ amlodipin trong huyết tương nhằm có được liều sử

dụng hợp lý cho các đối tượng bệnh nhân, đồng thời đánh giá tương đương sinh học giúp kiểm tra chất lượng của thuốc. Ngoài ra, amlodipin thuộc danh mục các dược chất yêu cầu báo cáo số liệu nghiên cứu tương đương sinh học khi đăng ký thuốc ban hành kèm theo thông tư số 08/2010/TT-BYT ngày

26/4/2010 về hướng dẫn báo cáo số liệu nghiên cứu sinh khả dụng/tương đương sinh học trong đăng ký thuốc. Hiện nay, ở Việt Nam việc ứng dụng phương pháp điện di mao quản chưa nhiều, đặc biệt chưa có phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản. Do đó, đề tài “*Xây dựng phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản*” được thực hiện với hai mục tiêu: Xây dựng phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản; Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn US – FDA [2] và EMA [3].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

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

Chất đối chiếu: Amlodipin – Số kiểm soát 0418213.03, hàm lượng 99,81%, Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Nifedipin – Số kiểm soát C0319200.03, hàm lượng 99,68% (nguyên trạng), Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Felodipin – Số kiểm soát QT370011121, hàm lượng 99,90% (nguyên trạng), Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Nicardipin – Số kiểm soát MFCD00057327, hàm lượng 98,00%, Sigma – Aldrich.

Huyết tương trắng: có nguồn gốc từ Trung tâm huyết học và truyền máu khu vực Huế – Số kiểm soát 201031887.

Trang thiết bị: Máy điện di mao quản Agilent 7100 đầu dò PDA (Mỹ); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức); cân phân tích A&D (Hàn Quốc); máy đo pH Sension⁺ pH3 Hach (Mỹ); máy lắc xoay Vortex, bình khí nitơ, micropipet Labnet (Mỹ) và các dụng cụ thủy tinh chính xác.

Dung môi - hóa chất: Acetonitril (ACN), methanol (MeOH), CH_3COOH , CH_3COONa , NaH_2PO_4 , natri tetraborat decahydrat, acid boric, acid phosphoric, natri dodecyl sulfat (SDS) có nguồn gốc từ Merck (Đức); NaOH, nước deion có nguồn gốc từ Agilent (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan riêng các chất chuẩn nifedipin, nicardipin, felodipin, amlodipin trong MeOH để thu được các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Dung dịch chuẩn làm việc: Từ dung dịch chuẩn gốc các chất chuẩn nifedipin, nicardipin, felodipin, amlodipin, tiến hành pha loãng bằng MeOH thành các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ chính xác khoảng 1000 ng/ml .

Các mẫu kiểm tra (QC): Từ các dung dịch chuẩn làm việc và mẫu huyết tương trắng chuẩn bị các

mẫu huyết tương trắng có chứa amlodipin từ 1,47 – 17,64 ng/ml . Trong đó mẫu nồng độ thấp (LQC); trung bình (MQC) và cao (HQC) chứa amlodipin có nồng độ tương ứng là 4,41 ng/ml ; 8,82 ng/ml ; 14,70 ng/ml . Mẫu trắng: huyết tương trắng.

Xây dựng phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản

Khảo sát lựa chọn chuẩn nội: Dựa trên tính chất cấu trúc tương tự, hằng số phân bố log P, khả năng tách của các chất trên điện di để tiến hành khảo sát lựa chọn các chất nifedipin ($\log P=2,49$), nicardipin ($\log P=4,34$), felodipin ($\log P=4,36$) để làm chuẩn nội (IS) cho amlodipin ($\log P=3,0$).

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu: Dựa trên tính chất hóa lý, độ tan và đặc điểm của mẫu huyết tương tiến hành phương pháp xử lý mẫu để chiết tách được chất và chuẩn nội từ mẫu huyết tương với 02 phương pháp: chiết lỏng – lỏng và rửa protein. Tối ưu hóa quy trình xử lý mẫu bằng phần mềm JMP16 (JMP là một phần mềm được phát triển bởi nhà sáng lập John Sall của Viện nghiên cứu SAS – Statistical Analysis System của North Carolina State University).

Khảo sát điều kiện điện di: Khảo sát các loại dung dịch điện di nền, điện thế nguồn, nhiệt độ cassette, áp suất tiêm, thời gian tiêm mẫu để tách amlodipin ra khỏi các chất trong nền mẫu huyết tương và tách hoàn toàn ra khỏi chuẩn nội.

Thẩm định phương pháp: Tính đặc hiệu, ảnh hưởng của nền mẫu, tính phù hợp hệ thống, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày, tỷ lệ thu hồi hoạt chất, độ ổn định theo hướng dẫn US – FDA và EMA.

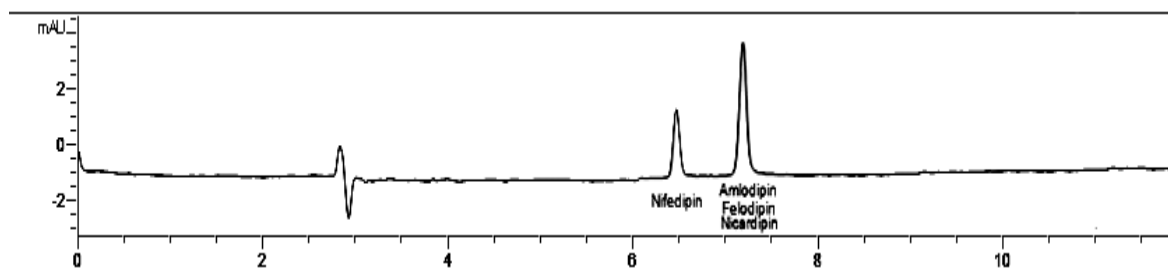
2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê và tính toán dựa vào phần mềm Microsoft Excel 2013; phần mềm tối ưu hóa JMP16.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát điều kiện định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản

Khảo sát lựa chọn chuẩn nội: Tiến hành phân tích mẫu huyết tương trắng có chứa đồng thời các chất nifedipin, nicardipin, felodipin, amlodipin theo quy trình. Trên điện di đồ (Hình 1) cho thấy nifedipin tách hoàn toàn ra khỏi các pic khác; các pic nicardipin, felodipin, amlodipin rửa giải cùng thời gian di chuyển. Do đó, nifedipin được lựa chọn làm chuẩn nội cho phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương do tách hoàn toàn ra khỏi amlodipin, có cấu trúc tương tự và độ phân cực ($\log P$) không chênh lệch nhiều nên thuận tiện trong quá trình chiết xuất.



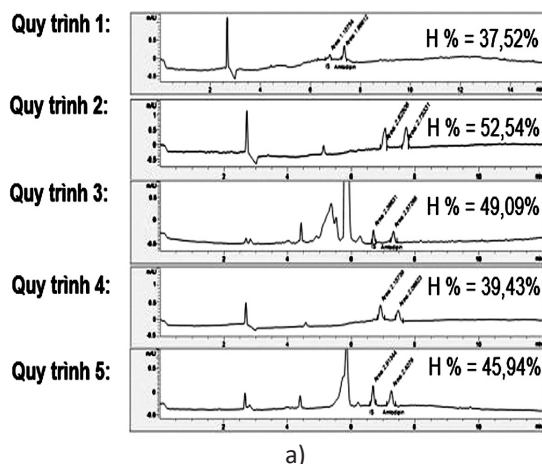
Hình 1. Điện di đồ khảo sát lựa chọn chuẩn nội

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu: Tiến hành 02 phương pháp xử lý mẫu: *chiết lỏng – lỏng* dựa trên nguyên tắc kiềm hóa bằng NaOH rồi chiết bằng dung môi hữu cơ (quy trình 1: dùng diethyl acetat và ethyl acetat; quy trình 2: dùng ethyl acetat) và *tủa protein* (quy trình 3: tủa protein bằng acid perchloric 10%; quy trình 4: tủa protein bằng acetonitril; quy trình 5: tủa protein bằng NaCl bão hòa và acetonitril). Kết quả cho thấy (Hình 2a), với hiệu suất chiết cao nhất và ít tạp hơn nên quy trình 2 được lựa chọn: Hút 17 ml mẫu huyết tương, thêm vào 400 μ l dung dịch chuẩn nội nifedipin 1000 ng/ml, lắc xoáy 10 giây. Thêm 5 ml NaOH 0,1 M và 17 ml ethyl acetat, lắc xoáy trong 5 phút. Sau đó ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút. Tách lấy lớp chất lỏng phía trên, lọc qua màng 0,45 μ m, chuyển sang ống khác, bốc hơi dưới dòng khí nitơ. Hòa tan cần trong 5,0 μ l MeOH và 45 μ l dung dịch điện di nền, tiêm vào hệ thống điện di.

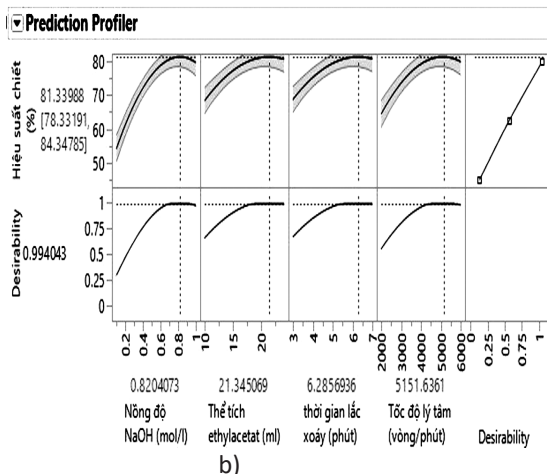
Sử dụng phần mềm JMP16 với mô hình Box –

Behnken để tối ưu hóa quy trình 2 trên 04 yếu tố khảo sát, mỗi yếu tố gồm 3 mức (mức dưới – mức giữa – mức trên): X_1 = nồng độ NaOH (mol/l) (0,1 – 0,55 – 1); X_2 = thể tích ethyl acetat (ml) (10 – 17 – 24); X_3 = thời gian lắc xoáy (phút) (3 – 5 – 7); X_4 = tốc độ ly tâm (vòng/phút) (2000 – 4000 – 6000). Phần mềm sẽ thiết kế ma trận gồm 27 thí nghiệm và tiến hành bằng thực nghiệm để thu được hiệu suất quy trình chiết tương ứng. Sử dụng công cụ dự đoán (Prediction Profiler) trong phần mềm JMP16 (Hình 2b) để có điều kiện tối ưu (X_1 = 0,82 (mol/l) – X_2 = 21,36 (ml) – X_3 = 6,29 (phút) – X_4 = 5151,64 (vòng/phút)) và hiệu suất toàn quy trình chiết xuất amlodipin %H = 81,34%.

Để kiểm chứng quy trình chiết amlodipin, tiến hành thực nghiệm 06 lần với điều kiện tối ưu dự đoán. Kết quả thu được hiệu suất chiết trung bình %H_{tb} = 80,91% – %RSD = 0,68% – Khoảng tin cậy: 80,91 $\pm$ 3,48%.



a)



b)

Hình 2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu (a) và kết quả dự đoán điều kiện tối ưu trên phần mềm JMP16 (b)

Khảo sát điều kiện điện di

Thay đổi các thông số của điều kiện điện di như dung dịch điện di nền, điện thế nguồn, nhiệt độ cassette, áp suất tiêm, thời gian tiêm mẫu để tách amlodipin ra khỏi chuẩn nội và các chất khác trong nền mẫu, pic cân đối và thời gian di chuyển ngắn, tín hiệu đáp ứng pic tốt. Kết quả điều kiện điện di

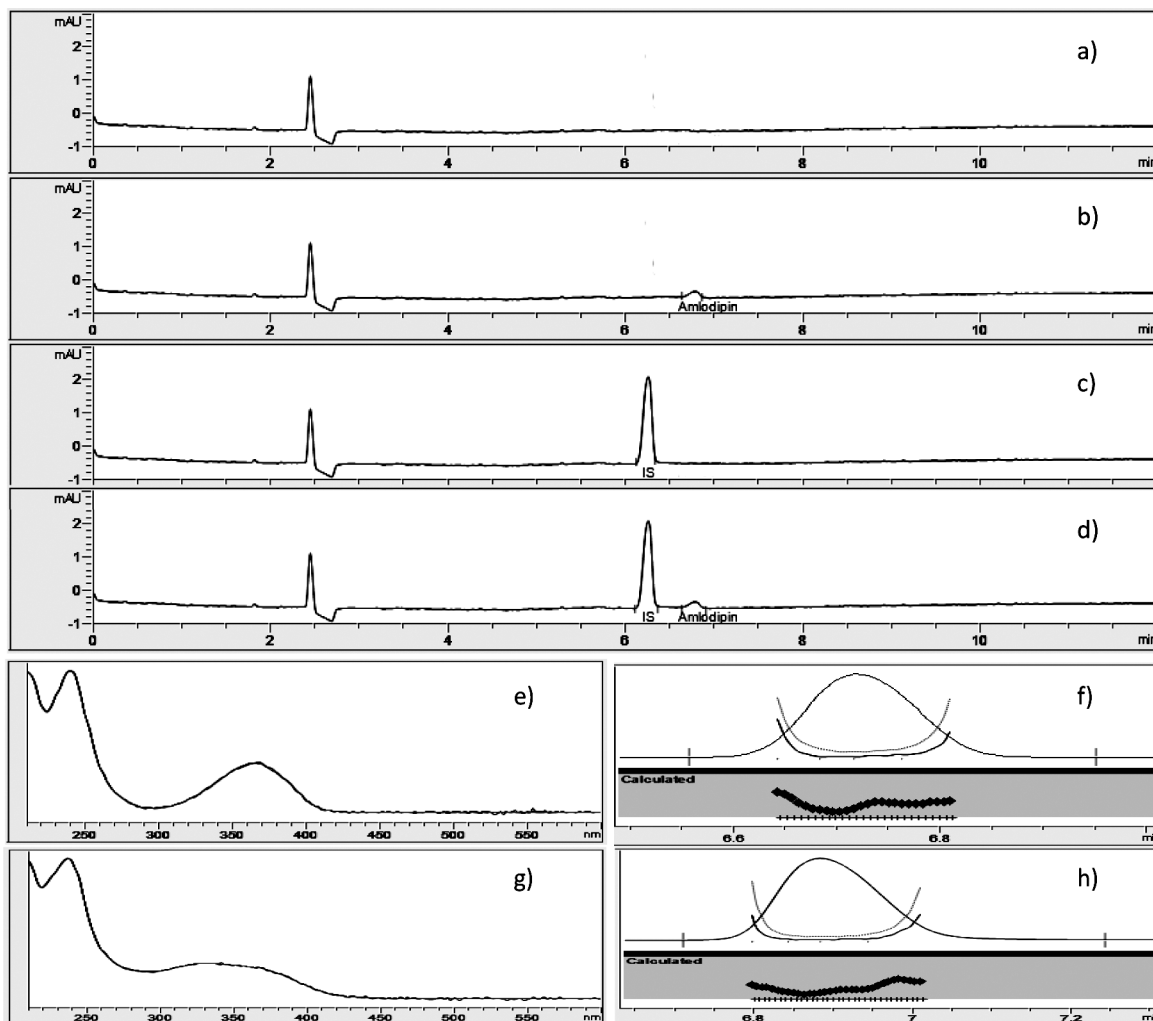
như sau: Cột mao quản silica (Chiều dài hiệu dụng: 48,5 cm – Chiều dài tổng: 57,5 cm – Đường kính ngoài: 360 μ m – Đường kính trong: 75 μ m), nhiệt độ cassette: 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, điện thế nguồn: +25 kV, cường độ dòng: 300 μ A, bước sóng phát hiện: 237 nm, tiêm mẫu: 35 mBar – 7 giây, dung dịch điện ly nền (BGE): Đệm borat 50 mM pH 8,6 chứa SDS 20 mM.

Xử lý cột: Hoạt hóa cột mao quản lần đầu: Nước 5 phút – NaOH 1 M 30 phút – NaOH 0,1 M 30 phút – Nước 5 phút – BGE 5 phút. Giữa các lần tiêm: NaOH 0,1 M 2 phút – Nước 2 phút – BGE 2 phút

3.2. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn US – FDA và EMA

Độ đặc hiệu – chọn lọc

Phân tích 06 mẫu huyết tương trắng; 06 mẫu huyết tương trắng chứa chất chuẩn nội nifedipin (IS) nồng độ 24 ng/ml; 06 mẫu huyết tương trắng chứa AML ở nồng độ LLOQ (1,47 ng/ml) và 06 mẫu huyết tương trắng có thêm IS nồng độ 24 ng/ml và AML nồng độ 1,47 ng/ml theo qui trình đã nêu trên. Ghi lại điện di đồ thông số pic và đáp ứng pic.



Hình 3. Điện di đồ tính đặc hiệu

a) Huyết tương trắng b) Huyết tương trắng chứa AML c) Huyết tương trắng chứa IS
d) Huyết tương trắng chứa AML và IS (e,f) Phổ UV – Vis và độ tinh khiết của AML và (g,h) của IS

Từ điện di đồ cho thấy tại thời điểm khoảng 6,2 phút và 6,8 phút (tương ứng với thời gian di chuyển của các pic IS và AML) không xuất hiện các pic lạ, các pic đạt độ tinh khiết cao, phổ UV-Vis mẫu chuẩn tương ứng với mẫu huyết tương (Hình 3). Kết quả phân tích cũng cho thấy đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian di chuyển của AML nhỏ hơn 20% đáp ứng pic của AML ở nồng độ 1,47 ng/ml (LLOQ – Giới hạn định lượng

dưới) và đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian di chuyển của IS không vượt quá 5% đáp ứng của IS. Do vậy phương pháp đặc hiệu và chọn lọc đối với AML.

Ảnh hưởng của nền mẫu

Chuẩn bị các lô huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau, tiến hành xử lý theo quy trình xử lý mẫu để thu được các dung dịch nền mẫu tương ứng. Chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC (4,41 ng/

ml) và HQC (14,70 ng/ml) trong các dung dịch nền mẫu tương ứng. Song song chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong hỗn hợp dung môi MeOH:BGE (1:9). Đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu thông qua tỷ số MF_{AML}/MF_{IS} , trong đó MF_{AML} ,

MF_{IS} được xác định bằng cách so sánh diện tích pic của AML và IS của các mẫu pha trong nền mẫu so với diện tích pic của các mẫu pha trong hỗn hợp dung môi. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu

Số thứ tự	MF_{AML}		MF_{IS}		MF_{AML}/MF_{IS}	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
1	0,84	0,80	0,99	0,95	0,85	0,84
2	0,74	0,86	0,98	0,98	0,76	0,88
3	0,83	0,85	0,94	0,94	0,88	0,90
4	0,76	0,77	0,90	0,90	0,85	0,85
5	0,82	0,87	0,96	0,94	0,86	0,93
6	0,79	0,81	0,91	0,91	0,86	0,89
Trung bình	0,80	0,83	0,95	0,94	0,84	0,88
RSD (%)	5,08	4,56	3,93	2,91	5,05	3,54

Kết quả thẩm định cho thấy không có sự sai khác giữa các nền mẫu khác nhau (%RSD<10%). Phương pháp xử lý mẫu là phù hợp và phương pháp phân tích không bị ảnh hưởng bởi nền mẫu.

Tính phù hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần mẫu huyết tương trắng AML nồng độ 8,82 ng/ml có thêm IS nồng độ 24 ng/ml theo qui trình nêu trên. Kết quả thu được: Độ lệch chuẩn của thời gian di chuyển và diện tích pic của AML và IS đều $\leq 3\%$. Hệ số đối xứng của hai chất nằm trong khoảng $0,8 \leq As \leq 1,5$ và độ phân giải giữa các pic $Rs \geq 1,5$. Do vậy phương pháp đạt yêu cầu về tính phù hợp hệ thống.

Bảng 2. Kết quả tính phù hợp hệ thống

Số thứ tự	Amlodipin				Nifedipin (Chuẩn nội – IS)			S_{AML}/S_{IS}
	Thời gian di chuyển (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Hệ số đối xứng	Độ phân giải	Thời gian di chuyển (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Hệ số đối xứng	
1	6,878	5,76012	1,4	2,8	6,331	19,51689	1,5	0,29514
2	7,216	5,97694	1,4	3,0	6,619	21,10851	1,3	0,28315
3	6,879	6,09348	1,4	2,7	6,340	20,57323	1,4	0,29618
4	6,822	5,71375	1,3	2,7	6,248	20,46258	1,4	0,27923
5	6,792	6,04136	1,5	2,6	6,233	20,47874	1,4	0,29501
6	6,768	5,90309	1,5	2,6	6,216	20,33978	1,2	0,29022
Trung bình	6,893	5,9148	1,4	2,7	6,331	20,4133	1,4	0,28982
% RSD	2,39%	2,58%	5,31%	5,51%	2,37%	2,52%	7,56%	2,45%

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Tiến hành pha các mẫu huyết tương trắng chứa IS nồng độ 24 ng/ml và AML lần lượt ở các nồng độ 1,47; 2,94; 5,88; 7,35; 8,82; 11,76; 14,70 và 17,64 ng/ml. Phân tích theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ AML (x) và tỷ lệ diện tích pic AML/IS (y) bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 3.

Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp phân tích

Tiến hành phân tích 6 mẫu huyết tương trắng, 6 mẫu huyết tương trắng có chứa AML 1,47 ng/ml và IS. Xử lý và phân tích các mẫu theo quy trình xử lý mẫu. Ghi lại điện di đồ và đáp ứng pic. Xác định nồng độ AML có trong các mẫu, độ đúng, độ chính xác từ đường chuẩn tiến hành song song trong cùng điều kiện. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ lặp lại trên 3 lô mẫu LQC, MQC và HQC chứa AML có nồng độ tương ứng là 4,41 ng/ml; 8,82 ng/ml; 14,70 ng/ml. Xác định hàm lượng AML trong mẫu bằng đường chuẩn phân tích trong cùng điều kiện. Độ đúng của phương pháp là tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được so với nồng độ lý thuyết. Độ lặp lại của phương pháp được biểu thị bằng giá trị %RSD. Kết quả độ đúng, độ lặp lại của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.

Tỷ lệ thu hồi hoạt chất

Xác định tỷ lệ thu hồi AML và IS bằng cách so sánh diện tích pic AML và IS trong các lô mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong dung môi). Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi của AML ở 3 nồng độ LQC, MQC và HQC được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy phương pháp cho hiệu suất chiết hoạt chất ổn định với %RSD < 15%. Do đó phương pháp xử lý mẫu đã được xây dựng là phù hợp để chiết tách AML trong huyết tương.

Bảng 3. Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

Chỉ tiêu đáng giá	Yêu cầu	Kết quả
Khoảng tuyến tính	$r^2 \geq 0,98$	Đường chuẩn 1: $y = 0,0324x + 0,0063$ ($r^2 = 0,9979$) Đường chuẩn 2: $y = 0,0328x + 0,0068$ ($r^2 = 0,9982$)
	Độ đúng tại mỗi nồng độ	Đường chuẩn 3: $y = 0,0323x + 0,0108$ ($r^2 = 0,9987$) Đường chuẩn 4: $y = 0,0330x + 0,0033$ ($r^2 = 0,9967$)
	85 – 115%	Đường chuẩn 5: $y = 0,0323x + 0,0057$ ($r^2 = 0,9976$) Độ đúng tại mỗi nồng độ: 93,09 – 113,23%
	Độ đúng: 80 – 120%	Độ đúng từ 95,69 – 115,04%
	Độ chính xác: %RSD $\leq 20\%$ Giá trị S/N ≥ 5	Độ chính xác: %RSD = 8,43% S/N ≥ 5
Độ đúng, Độ chính xác	Độ đúng: 85 – 115%	Trong ngày LQC: 104,07% MQC: 99,61% HQC: 100,34%
		Khác ngày LQC: 102,65% MQC: 99,84% HQC: 98,65%
	Độ chính xác %RSD $\leq 15\%$	Trong ngày LQC: 2,66% MQC: 4,90% HQC: 2,08%
		Khác ngày LQC: 4,51% MQC: 3,67% HQC: 2,79%
Tỷ lệ thu hồi hoạt chất	Hiệu suất chiết hoạt chất (%H) ổn định với %RSD < 15%	LQC: %H=79,76% và %RSD=5,08% MQC: %H=82,18% và %RSD=5,02% HQC: %H=82,75% và %RSD=4,56%

Độ ổn định

Độ ổn định của mẫu huyết tương

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của các mẫu huyết tương trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của các mẫu huyết tương bằng cách so sánh nồng độ AML có trong các mẫu được bảo quản và các mẫu có nồng độ tương ứng ngay sau khi xử lý. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Độ ổn định của mẫu huyết tương

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ ban đầu (ng/ml; n=6)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n=6)	% sai khác
3 chu kỳ đông – rã	LQC	4,22	4,50	6,70
	HQC	13,89	13,43	-3,27
Độ ổn định ngắn hạn (5 giờ, nhiệt độ phòng)	LQC	4,22	4,36	3,25
	HQC	13,89	14,26	2,70

Độ ổn định trong autosampler (24 giờ/25 °C)	LQC	4,22	4,38	3,80
	HQC	13,89	14,41	3,77
Độ ổn định dài hạn (30 ngày/-20 °C)	LQC	4,22	4,47	6,02
	HQC	13,89	14,26	2,72

Kết quả cho thấy, nồng độ AML trong mẫu được xử lý sau 3 chu kỳ đông – rã, sau 5 giờ ở nhiệt độ phòng, sau khi bảo quản 24 giờ ở 25 °C trong autosampler và sau 30 ngày ở -20 °C đều đạt yêu cầu về độ ổn định với % sai khác so với các mẫu xử lý ngay không quá 15%.

Độ ổn định của các chất phân tích

- Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc AML và IS dài ngày

Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn gốc AML và IS

có nồng độ khoảng 1000 mg/ml trong MeOH khi mới pha và sau khi được bảo quản 14 ngày ở nhiệt độ 2 – 8 °C.

- Độ ổn định của dung dịch chuẩn AML và IS làm việc ngắn hạn ở nhiệt độ phòng

Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn làm việc AML và IS có nồng độ khoảng 1000 ng/ml trong MeOH khi mới pha và sau khi được bảo quản sau 8 giờ ở nhiệt độ phòng.

Tiến hành phân tích các mẫu AML và IS trên và ghi lại đáp ứng pic, kết quả thu được như sau:

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu độ ổn định dung dịch AML và IS

Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc AML và IS dài ngày				
Mẫu	Đáp ứng AML ban đầu (mAU.s)	Đáp ứng AML sau 14 ngày (mAU.s)	Đáp ứng IS ban đầu (mAU.s)	Đáp ứng IS sau 14 ngày (mAU.s)
1	1382,20	1403,19	1460,10	1483,08
2	1429,20	1434,05	1500,20	1520,17
3	1393,80	1397,63	1488,55	1523,80
Trung bình	1401,73	1411,62	1482,95	1509,02
RSD (%)	1,75	1,39	1,39	1,49
% sai khác	0,71		1,76	
Độ ổn định của dung dịch chuẩn AML và IS làm việc ngắn hạn ở nhiệt độ phòng				
Mẫu	Đáp ứng AML ban đầu (mAU.s)	Đáp ứng AML sau 8h (mAU.s)	Đáp ứng IS ban đầu (mAU.s)	Đáp ứng IS sau 8h (mAU.s)
1	4,03	3,97	4,24	4,12
2	4,11	4,11	4,28	4,22
3	4,09	3,99	4,21	4,25
Trung bình	4,08	4,02	4,24	4,20
RSD (%)	1,07	1,94	0,84	1,60
% sai khác	-1,37		-0,96	

Kết quả cho thấy, dung dịch chuẩn gốc AML và IS sau bảo quản 14 ngày ở nhiệt độ 2 – 8 °C đạt yêu cầu độ ổn định trong thời gian dài (sai khác với nồng độ dung dịch mới pha không quá 2%); dung dịch chuẩn làm việc AML và IS sau bảo quản 8 giờ ở nhiệt độ phòng đạt yêu cầu độ ổn định trong thời gian ngắn hạn (sai khác với nồng độ dung dịch mới pha không quá 2%).

4. BÀN LUẬN

Đối với phân tích các thuốc trong huyết tương thường trải qua quá trình xử lý mẫu khá phức tạp nên thường sử dụng chất chuẩn nội để giảm sai số so với dùng chuẩn ngoại. Trong nghiên cứu này đã khảo sát lựa chọn nifedipin là chất chuẩn nội thỏa mãn các yêu cầu của chất chuẩn nội hơn so với các chuẩn nội đã dùng trong một số nghiên cứu

khác như clenbuterol, eplerenon, diltiazem, axit bisoprolol fumaric.

Phương pháp xử lý mẫu được lựa chọn là kỹ thuật chiết lỏng – lỏng: AML là một chất có tính base (có nhóm chức $-NH_2$ và $-NH-$), mẫu huyết tương sẽ được kiềm hóa bằng NaOH để chuyển từ dạng muối amlodipin besilat sang dạng base kém phân cực, sau đó chiết bằng dung môi hữu cơ kém phân cực là ethyl acetat. Ethyl acetat có khả năng bay hơi nhanh nên giảm thời gian cô mẫu tới cần so với các quy trình sử dụng ACN. Quy trình này cho hiệu suất chiết cao, ít tạp, tiết kiệm thời gian phân tích. Đồng thời, kết hợp ứng dụng mô hình tối ưu hóa đáp ứng bề mặt Box – Behnken trên phần mềm JMP 16 nhằm tìm ra các điều kiện tối ưu khi xử lý mẫu, giúp tăng hiệu suất chiết AML trong huyết tương từ 52,54% lên 80,91% nhờ đó có thể tăng khả năng chiết chất phân tích ở nồng độ thấp.

Điều kiện điện di sử dụng dung dịch điện di nền là đệm borat 50 mM pH 8,6 chứa SDS 20 mM. AML và nifedipin trong môi trường kiềm sẽ ở dạng không mang điện nên sẽ rửa giải cùng thời gian di chuyển nếu sử dụng kỹ thuật điện di mao quản vùng. Khi thêm chất điện hoạt SDS nồng độ 20 mM lớn hơn nồng độ micell tới hạn (8,2 mM) để chuyển sang kỹ thuật sắc ký điện động mixen (micellar electrokinetic chromatography – MEKC), sẽ hình thành các hạt mixen vỏ mang điện âm và lõi kém phân cực gồm các dây 12 carbon. Tại pH 8,6 các phân tử AML và nifedipin không mang điện ở dạng kém phân cực sẽ tương tác với lõi mixen kém phân cực. Chất nào kém phân cực hơn sẽ tương tác mạnh với lõi mixen kém phân cực nên bị rửa giải muộn hơn. Dựa vào hệ số phân bố dầu nước qua giá trị logP của các chất: AML

(logP = 3,0) kém phân cực hơn so với nifedipin (logP = 2,49). Vì vậy AML rửa giải ra sau nifedipin.

Trên lâm sàng, nồng độ đỉnh AML trong huyết tương (C_{max}) khi sử dụng liều đơn 5 mg và 10 mg ở những người tình nguyện khỏe mạnh tương ứng là $4,042 \pm 1,147$ ng/mL sau 6 giờ [4] và $6,05 \pm 1,26$ ng/mL sau 5,42 $\pm$ 1,59 giờ [5]. Ở phụ nữ cho con bú, nồng độ AML đạt đỉnh trong huyết tương trong khoảng từ 4,4 đến 14,7 ng/ml sau khoảng 4 – 8 giờ sau khi uống liều đơn 5 mg/ngày [6]. Các giá trị C_{max} đều nằm trong khoảng tuyến tính đã khảo sát từ 1,47 – 17,64 ng/ml.

Phương pháp đã được thẩm định đạt các yêu cầu theo US – FDA và EMA. Phương pháp đạt độ tin cậy để định lượng thuốc trong huyết tương với khoảng tuyến tính từ 1,47 đến 17,64 ng/ml với tỷ lệ thu hồi hoạt chất từ 79,76 – 82,66%, cao hơn so với phương pháp đã công bố (từ 58,8 – 63,8%) [7].

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng amlodipin trong huyết tương bằng điện di mao quản có độ chính xác cao với độ chính xác trong ngày và khác ngày có %RSD nhỏ (2,08 – 4,90%), độ đúng tốt (98,65 – 104,07%), khoảng tuyến tính phù hợp (1,47 – 17,64 ng/ml), tính chọn lọc cao đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học của US – FDA và EMA. Phương pháp xử lý mẫu bằng cách kiềm hóa và chiết lỏng – lỏng với dung môi ethyl acetat thu được dịch chiết amlodipin tương đối ít tạp, tập trung được nồng độ chất phân tích, đơn giản và thời gian phân tích ngắn. Phương pháp có thể làm cơ sở trong các nghiên cứu tương đương sinh học cho chế phẩm thuốc chứa amlodipin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2018), Dược thư Quốc gia Việt Nam dùng cho tuyến cơ sở, Nhà xuất bản Y học 466-467.
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2018), “Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry”, US-FDA, pp.1-41.
3. European Medicines Agency (2011), “Guideline on bioanalytical method validation”, European Medicines Agency, pp.1-23.
4. Tongtong Wang, Yannan Wang, Sisi Lin, et al. (2020), “Evaluation of pharmacokinetics and safety with bioequivalence of Amlodipine in healthy Chinese volunteers: Bioequivalence Study Findings”, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **34** (6), pp. 1-10.
5. Hemanth Jangala, Poonam Vats, Arshad Hussain Khuroo, and Tausif Monif (2014), “Development and Validation of a LC - MS/MS Method for the Simultaneous Estimation of Amlodipine and Valsartan in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study”, *Scientia Pharmaceutica*, pp. 585 - 600.
6. Hiroaki Aoki và các cộng sự. (2018), “Low Levels of Amlodipine in Breast Milk and Plasma”, *Breastfeeding Medicine*, 20, tr. 1-5.
7. Kamon Panrat Anusak Sirikatitham1, Niwan Tanmanee (2008), “Determination of amlodipine in human plasma by electrospray ionization LC-MS/MS method: validation and its stability studies”, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, **30** (4), tr. 455 - 462.