

Xây dựng phương pháp phân tích irbesartan và hydrochlorothiazid trong huyết tương người

Lê Thị Đào

Khoa Kỹ thuật Xét nghiệm Y học, Đại học Nguyễn Tất Thành.
ltdao@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bài báo trình bày quá trình xây dựng và thẩm định một phân quy trình phân tích irbesartan (IRB) và hydrochlorothiazid (HCTZ) trong huyết tương người bằng kỹ thuật LC-MS/MS. Phương pháp phân tích đã sử dụng telmisartan làm chuẩn nội để xác định irbesartan và hydrochlorothiazid. Các chất phân tích và chất chuẩn nội được chiết bằng kỹ thuật chiết lỏng- lỏng với tert-butyl methyl ether, cột Gemini C18 (150 mm x 2 mm; 3 μ m), pha động methanol – dung dịch đệm amoniformat 5 mM, pH = 5 (80:20), tốc độ dòng 0,4 mL/min, thể tích tiêm mẫu 2 μ L. Irbesartan, telmisartan được phân tích ở chế độ ion hóa dương và hydrochlorothiazid ở chế độ ion hóa âm. Theo hướng dẫn của US-FDA và EMA về thẩm định phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học, kết quả thẩm định một phân quy trình phân tích cho thấy quy trình đạt được tính đặc hiệu, hiệu suất chiết trên 95 %, tính tuyến tính trong các khoảng nồng độ dự định, đạt độ đúng và độ chính xác trong ngày và giữa các ngày, giới hạn định lượng dưới của IRB và HCTZ lần lượt là 0,005 μ g/mL và 0,901 ng/mL.

Nhận 13.11.2021
Được duyệt 20.12.2021
Công bố 06.04.2022

Từ khóa
Chiết lỏng- lỏng,
Huyết tương người,
Hydrochlorothiazid,
Irbesartan, LC-MS/MS

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Tăng huyết áp là một vấn đề rất thường gặp trong cộng đồng, là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu và dẫn đến cái chết của hàng triệu người mỗi năm, đồng thời là nguyên nhân gây suy tim và đột quỵ não; là nguyên nhân hàng thứ hai gây nhồi máu cơ tim cấp. Tỷ lệ người bị tăng huyết áp ngày càng tăng và tuổi bị bệnh cũng ngày một trẻ hơn. Trong điều trị bệnh nhân tăng huyết áp, đơn trị chỉ kiểm soát được huyết áp không quá 60 % các trường hợp. Vì vậy, để đạt mục tiêu điều trị là kiểm soát huyết áp trở về chỉ số bình thường, các nhà nghiên cứu thường phải phối hợp nhiều thuốc. Theo Tạp chí Dược học châu Á năm 2014, có 4 phác đồ phối hợp thuốc là ức chế men chuyển/chen thụ thể angiotensin II và lợi tiểu thiazid, ức chế men chuyển/chen thụ thể angiotensin II và chen kênh canxi, ức chế men chuyển/chen thụ thể angiotensin II và chen beta, chen beta và chen kênh

canxi [1]. Trong đó phối hợp của irbesartan và hydrochlorothiazid được chỉ định trong điều trị phù nề và tăng huyết áp. Các nghiên cứu lâm sàng về irbesartan và hydrochlorothiazid cho rằng sự kết hợp này có hiệu quả lâm sàng [2-5].

Muốn kiểm soát tốt huyết áp trong điều trị thì cần phải theo dõi nồng độ thuốc trong huyết tương có đạt yêu cầu điều trị hay không để có thể điều chỉnh liều cho phù hợp. Vì thế, phương pháp phân tích irbesartan và hydrochlorothiazid trong huyết tương người được thực hiện để góp phần vào việc xây dựng các quy trình định lượng nồng độ của các chế phẩm chứa irbesartan và hydrochlorothiazid trong huyết tương người để phục vụ cho công tác điều trị bệnh.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

2.1.1 Dung môi, hóa chất và chất chuẩn



Dung môi, hóa chất: acetonitril và acid formic đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho LC/MS. Các dung môi, hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

Chất chuẩn:

- Irbesartan - chuẩn Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh (Tp. HCM); số lô: QT201 050719; hàm lượng 99,40 % (nguyên trạng).

- Hydrochlorothiazid - chuẩn Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp.HCM; số lô: QT300 030321; hàm lượng 99,60 % (nguyên trạng).

- Telmisartan (IS) - chuẩn Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp.HCM; số lô: QT217 040619; hàm lượng 99,70 % (nguyên trạng).

Huyết tương trắng: Bệnh viện Truyền máu và Huyết học Tp. HCM cung cấp, được bảo quản ở $\leq -25^{\circ}\text{C}$.

2.1.2 Thiết bị và dụng cụ phân tích

- Các thiết bị phân tích đều được hiệu chuẩn theo yêu cầu của GLP và ISO/IEC 17025, bao gồm: hệ thống máy LC-MS/MS 8040 (Shimadzu - Nhật Bản); cân phân tích (Mettler Toledo - Thụy Sĩ); máy đo pH (Mettler Toledo – Thụy Sĩ).

- Máy siêu âm, máy lắc, tủ đông bảo quản, máy li tâm; các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, micropipet có độ chính xác phù hợp.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát các điều kiện sắc kí lỏng, điều kiện khối phổ và phương pháp xử lí mẫu thích hợp để định lượng IRB và HCTZ trong các mẫu huyết tương.

- Tiến hành thẩm định theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học của US-FDA và EMA [6,7] về các chỉ tiêu: tính đặc hiệu, giới hạn định lượng dưới, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, hiệu suất chiết, ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư và độ ổn định của hoạt chất.

Sau khi tham khảo tài liệu kết hợp với thử nghiệm, đã lựa chọn được các điều kiện để phân tích IRB và HCTZ trong các mẫu huyết tương người trên hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao với đầu dò khối phổ (LC-MS/MS) như sau:

Nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích

Điều kiện sắc kí

- Pha động: methanol – dung dịch đệm amoniformat 5 mM, pH = 5 (80:20)

- Cột sắc kí: gemini C18 (150 mm x 2 mm; 3 μm)

- Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}\text{C}$

- Tốc độ dòng: 0,4 mL/min

- Thể tích tiêm: 2 μL

- Nhiệt độ khay chứa mẫu: 10 $^{\circ}\text{C}$

Điều kiện khối phổ

Đầu dò khối phổ ba lần tứ cực (LCMS 8040 Triple Quadrupole - Shimadzu, Nhật Bản), với nguồn ion hoá ESI. Các thông số của thiết bị khối phổ tối ưu để phát hiện IRB, HCTZ và IS được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1 Các thông số khối phổ tối ưu để phân tích IRB, HCTZ và IS

| <i>Hoạt chất</i> | <i>IRB</i> | <i>HCTZ</i> | <i>IS</i> |
|---|------------|-------------|-----------|
| Thông số | | | |
| Điện thế ion hoá (V) | 4 000 | 4 000 | 4 000 |
| Nhiệt độ khí bay hơi ($^{\circ}\text{C}$) | 250 | 250 | 250 |
| Tốc độ dòng khí phun (L/min) | 3 | 3 | 3 |
| Tốc độ dòng khí bay hơi (L/min) | 15 | 15 | 15 |
| Nhiệt độ buồng ion hoá ($^{\circ}\text{C}$) | 400 | 400 | 400 |
| Thế Q1 (V) | -24 | 14 | -24 |
| Năng lượng va chạm (V) | -26 | 20 | -50 |
| Thế Q2 (V) | -20 | 16 | -26 |
| MRM | + | - | + |
| Mảnh ion mẹ | 429,15 | 295,90 | 515,00 |
| Mảnh ion con | 207,00 | 268,95 | 276,10 |

2.2.2 Chuẩn bị dung dịch gốc của chất phân tích và nội chuẩn: pha dung dịch chuẩn gốc của IRB, HCTZ và IS ở các nồng độ lần lượt là (0,5; 0,3 và 0,1)

mg/mL được hòa tan trong methanol. Pha dung dịch làm việc ở các mức nồng độ khác nhau từ dung dịch chuẩn gốc bằng methanol.

Chuẩn bị đường chuẩn và mẫu kiểm chứng

Lấy chính xác 50 μ L hỗn hợp dung dịch làm việc gồm IRB, HCTZ cho vào 950 μ L huyết tương trắng, lắc đều. Pha dung dịch chuẩn ở các nồng độ lần lượt (5; 15; 300; 600; 1 500; 1 800; 3 000; 3 600; 4 800 và 6 000) ng/mL đối với IRB và (0,9; 3; 15; 30; 75; 90; 150; 180; 240 và 300) ng/mL đối với HCTZ.

Mẫu kiểm chứng cho IRB và HCTZ đã được pha chế tại nồng độ cao (HQC) 4 800; 240, kiểm soát chất lượng trung bình (MQC) 3 000; 150, kiểm soát chất lượng thấp (LQC) 15; 3 và kiểm soát chất lượng giới hạn thấp (LLOQ) 5; 0,9 ng/mL, tương ứng.

Điều kiện xử lý mẫu huyết tương

Mẫu huyết tương được xử lý bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng như sau: lấy chính xác 1 mL huyết tương có chứa các chất phân tích cho vào ống nghiệm, thêm dung dịch chuẩn nội (irbesartan nồng độ 40 ng/mL), acid hóa bằng 50 μ L acid phosphoric 10 %. Sau đó chiết với dung môi tert-butyl methyl ether, chiết 2 lần mỗi lần 3 mL. Gộp dịch chiết và bốc hơi dung môi tới gần bằng khí nitơ. Hoà tan cần trong 500 μ L hỗn hợp pha động, lọc qua màng lọc millipore 0,22 μ m, tiệt sắc kí.

2.2.3. Phương pháp thẩm định

Phương pháp thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA và EMA.

Tính đặc hiệu

Sáu mẫu huyết tương trắng riêng lẻ được phân tích để khảo sát các đỉnh nhiễu tại thời gian lưu của mỗi chất phân tích. Đáp ứng của các đỉnh gây nhiễu tại thời gian lưu của IRB và HCTZ được coi là chấp nhận được nếu chúng nhỏ hơn 20 % đáp ứng của LLOQ. Các phản hồi của các đỉnh gây nhiễu tại thời gian lưu của IS được chấp nhận nếu chúng nhỏ hơn 5 % của IS.

Khoảng tuyến tính và giới hạn dưới của định lượng

Khoảng tuyến tính được đánh giá bằng cách sử dụng mười điểm đường chuẩn được phân tích vào các ngày riêng biệt. Để xác nhận, các đường cong được xây dựng bằng cách tính toán tỉ lệ diện tích peak của mỗi hợp chất với chất chuẩn nội và vẽ biểu đồ này dựa trên nồng độ thực của mẫu. Các đường chuẩn được mô tả bằng phương trình tuyến tính: $y = ax + b$, trong đó y là tỉ số giữa các peak của chất phân tích và các peak IS tương ứng và x là nồng độ (μ g/mL).

Hệ số hồi quy, độ dốc và hệ số chặn y của các đường chuẩn thu được được xác định bằng cách sử dụng hồi quy bình phương nhỏ nhất với hệ số trọng số là $1/x^2$.

Nồng độ không xác định được tính toán từ phương trình của đường chuẩn.

Giới hạn trên của định lượng (ULOQ) được coi là nồng độ chuẩn cao nhất mà cả độ lệch chuẩn tương đối và độ lệch phần trăm so với nồng độ danh nghĩa đều nhỏ hơn 15 %. LLOQ được định nghĩa là nồng độ thấp nhất có thể đo được với hệ số biến thiên giữa các ngày (CV) trong khoảng ± 20 %.

Ảnh hưởng của nền mẫu (matrix)

Sáu lô huyết tương trắng của người khác nhau được xử lý và phân tích như các mẫu riêng biệt trong sáu lần lặp lại ở nồng độ QC cao và thấp. Hệ số nền chuẩn hóa IS được xác định riêng biệt cho từng mẫu bằng cách xác định diện tích peak trong huyết tương sau chiết xuất với diện tích peak trong methanol.

Độ đúng và độ chính xác

Độ chính xác và độ chụm của phương pháp phân tích được xác định bằng cách phân tích mẫu ở các nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC, được chuẩn bị như mô tả ở trên. Sáu lần lặp lại của mỗi cấp độ của các mẫu được định lượng trong một lần chạy để có độ chính xác và độ chính xác trong ngày. Sáu lần lặp lại của mỗi cấp độ của mẫu được thử nghiệm trong vòng ba ngày khác nhau (tổng cộng 18 lần lặp lại cho mỗi cấp độ nồng độ).

Hiệu suất chiết

Khả năng thu hồi (hiệu suất chiết) của các chất phân tích được xác định bằng cách phân tích các mẫu QC tăng đột biến ở các nồng độ cao, trung bình và thấp. Sáu lần lặp lại của mỗi mẫu QC đã được chuẩn bị như trên và được tiêm vào hệ thống LC-MS/MS. Hiệu suất thu hồi được xác định bằng cách so sánh diện tích peak thu được từ các mẫu huyết tương được chiết xuất với diện tích peak thu được từ các mẫu được trong methanol ở cùng mức nồng độ.

Ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư

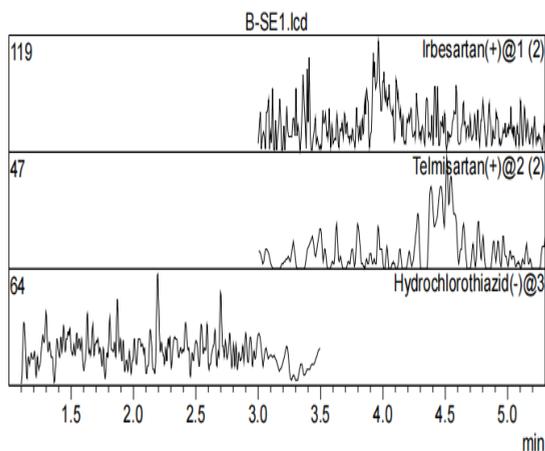
Sự nhiễm chéo đánh giá bằng cách tiêm huyết tương trắng ngay sau khi tiêm giới hạn định lượng trên (ULOQ). Độ nhiễm chéo được chấp nhận nếu nó thấp hơn 20 % LLOQ của mỗi chất phân tích và ít hơn 5 % diện tích IS.

Độ ổn định

Độ ổn định ngắn hạn và sau điều chế, cũng như độ ổn định sau ba chu kỳ đông lạnh - rã đông, được xác định cho tất cả các chất phân tích trong huyết tương bằng cách sử dụng các mẫu QC thấp và cao bằng cách tính

toán độ chệch giữa nồng độ quan sát được và nồng độ lý thuyết.

Tính ổn định ngắn hạn được khảo sát bằng cách phân tích sáu lần lặp lại mẫu ở mỗi nồng độ (-70 °C) được giữ ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ trước khi chuẩn bị mẫu. Độ ổn định đông lạnh được xác định trong ba chu kì. Trong mỗi chu kì, các mẫu huyết tương tăng đột biến được đông lạnh ở -70 °C trong 24 giờ và rã đông ở nhiệt độ phòng. Độ ổn định sau điều chế được kiểm tra bằng cách giữ sáu lần lặp lại của mỗi nồng độ thấp và cao trong bộ lấy mẫu tự động được duy trì ở 10 °C trong 48 giờ. Các mẫu đã được phân tích, và kết quả được so sánh với kết quả đạt được từ các mẫu tươi. Độ ổn định có thể chấp nhận được nếu độ lệch (%) nằm trong khoảng ± 15.



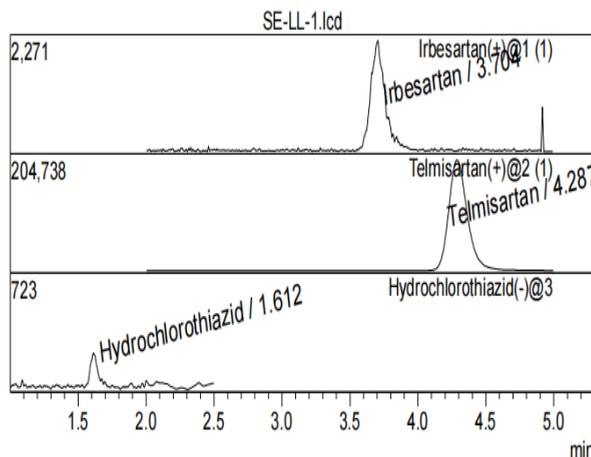
Hình 1 Sắc kí đồ mẫu huyết tương trắng

3 Kết quả và thảo luận

Kết quả thẩm định quy trình phân tích

3.1 Độ đặc hiệu của phương pháp

Tiến hành phân tích 6 mẫu huyết tương trắng, 6 mẫu huyết tương tự tạo chứa các hoạt chất ở nồng độ LLOQ đã xử lí. Kết quả cho thấy trên sắc kí đồ mẫu huyết tương trắng, tại các thời điểm 3,704 phút; 1,612 phút và 4,287 phút (tương ứng với thời gian lưu của IRB, HCTZ và IS) và không có xuất hiện nhiễu. Như vậy phương pháp đặc hiệu và chọn lọc đối với IRB và HCTZ. Hình 1 và Hình 2 minh họa sắc kí đồ mẫu trắng và mẫu huyết tương tự tạo ở nồng độ LLOQ.



Hình 2 Sắc kí đồ tự tạo chứa chất phân tích ở nồng độ LLOQ

3.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Pha các mẫu huyết tương có chứa chuẩn IRB có nồng độ (5-6 006) ng/mL, HCTZ có nồng độ khoảng từ (0,9-300) ng/mL. Xử lí mẫu và phân tích theo quy trình đã xây dựng. Đánh giá sự tương quan giữa nồng

độ chất phân tích (x) trong huyết tương với tỉ số diện tích đỉnh đo được (y) trong khoảng nồng độ khảo sát bằng phương pháp hồi quy tuyến tính với trọng số 1/X². Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2 Tương quan giữa nồng độ và tỉ số diện tích đỉnh

| | | Mẫu | | | | | | | | | |
|------|--|--|-----------|--------|--------|--------|--------|-----------|---------|-----------|-------------|
| | | C-1 (LLOQ) | C-2 (LQC) | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-7 (MQC) | C-8 | C-9 (HQC) | C-10 (ULOQ) |
| IRB | Nồng độ thực (µg/mL) | 0,005 | 0,015 | 0,300 | 0,601 | 1,501 | 1,802 | 3,003 | 3,603 | 4,805 | 6,006 |
| | Độ đúng (%) | 100,41 | 98,66 | 96,57 | 104,39 | 101,84 | 100,56 | 103,72 | 102,48 | 98,38 | 92,99 |
| | Phương trình hồi quy theo trọng số (1/X ²) | $\hat{y} = 1,3453x + 0,0005$ $R^2 = 0,9987$ | | | | | | | | | |
| HCTZ | Nồng độ thực (ng/mL) | 0,900 | 3,001 | 15,007 | 30,014 | 75,035 | 90,043 | 150,071 | 180,085 | 240,113 | 300,142 |
| | Độ đúng (%) | 101,15 | 95,99 | 102,91 | 102,39 | 95,01 | 103,32 | 97,43 | 106,36 | 99,98 | 98,37 |
| | Phương trình | $\hat{y} = 0,0001x$ | | | | | | | | | |

| | |
|-----------------------------------|----------------|
| hồi quy theo trọng số ($1/X^2$) | $R^2 = 0,9985$ |
|-----------------------------------|----------------|

3.3 Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Tiến hành xử lý mẫu huyết tương chứa IRB và IS ở nồng độ lần lượt khoảng 5 ng/mL và 0,9 ng/mL (mẫu LLOQ), tiến hành sắc kí xác định diện tích đỉnh của IRB, HCTZ và IS, tính nồng độ của IRB và HCTZ dựa vào đường chuẩn được tiến hành song song trong cùng điều kiện có S/N lớn hơn 5.

Bảng 3 Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới

| Lô huyết tương | S/N | |
|----------------|--------|--------|
| | IRB | HCTZ |
| 1 | 19,170 | 22,580 |
| 2 | 14,690 | 34,300 |
| 3 | 19,380 | 21,810 |

| | | |
|-------------------|--------|--------|
| 4 | 24,860 | 17,750 |
| 5 | 15,150 | 14,230 |
| 6 | 8,740 | 16,680 |
| Trung bình | 16,998 | 21,225 |

3.4 Độ đúng, độ chính xác của phương pháp

Tiến hành sắc kí các mẫu huyết tương chứa chất phân tích ở 4 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt độ đúng trong ngày ($n = 6$) và khác ngày ($n = 18$) với tỉ lệ thu hồi nằm trong khoảng 85 % - 115 % (trừ LLOQ có độ đúng từ 80 % đến 120 %) và đạt độ chính xác với giá trị CV < 15 %. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 4.

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

| | Mẫu | | Nồng độ thực tế | | Nồng độ lý thuyết | | Độ đúng (%) | |
|-------------------|--------|------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|-------------|--------|
| | | | IRB ($\mu\text{g/mL}$) | HCTZ (ng/mL) | IRB ($\mu\text{g/mL}$) | HCTZ (ng/mL) | IRB | HCTZ |
| Ngày 1 (n = 6) | LLOQ | TB | 0,005 | 0,910 | 0,005 | 0,901 | 104,71 | 101,03 |
| | | CV (%) | | | | | 3,06 | 16,78 |
| | LQC | TB | 0,016 | 2,936 | 0,015 | 3,003 | 103,89 | 97,78 |
| | | CV (%) | | | | | 2,68 | 6,92 |
| | MQC | TB | 2,962 | 167,939 | 3,003 | 150,146 | 98,63 | 111,85 |
| | | CV (%) | | | | | 0,79 | 2,64 |
| HQC | TB | 4,440 | 267,367 | 4,805 | 240,233 | 92,41 | 111,30 | |
| | CV (%) | | | | | 4,54 | 3,25 | |
| Ngày 2 (n = 6) | LLOQ | TB | 0,004 | 0,925 | 0,005 | 0,901 | 95,423 | 102,78 |
| | | CV (%) | | | | | 4,350 | 7,52 |
| | LQC | TB | 0,015 | 2,957 | 0,015 | 3,003 | 101,13 | 96,01 |
| | | CV (%) | | | | | 2,80 | 8,85 |
| | MQC | TB | 2,619 | 160,191 | 3,003 | 150,146 | 87,23 | 106,69 |
| | | CV (%) | | | | | 2,46 | 3,15 |
| HQC | TB | 4,326 | 229,037 | 4,805 | 240,233 | 90,03 | 95,34 | |
| | CV (%) | | | | | 3,14 | 10,19 | |
| Ngày 3 (n = 6) | LLOQ | TB | 0,004 | 0,964 | 0,005 | 0,901 | 93,553 | 107,07 |
| | | CV (%) | | | | | 7,189 | 7,87 |
| | LQC | TB | 0,014 | 2,959 | 0,015 | 3,003 | 94,71 | 103,51 |
| | | CV (%) | | | | | 5,72 | 3,68 |
| | MQC | TB | 3,011 | 161,052 | 3,003 | 150,146 | 100,26 | 107,27 |
| | | CV (%) | | | | | 3,02 | 2,41 |
| HQC | TB | 4,270 | 257,690 | 4,805 | 240,233 | 88,87 | 107,27 | |
| | CV (%) | | | | | 4,30 | 5,97 | |
| Giữa các ngày | LLOQ | TB Gộp | | | | | 97,90 | 103,62 |
| | | CV Gộp (%) | | | | | 6,97 | 11,00 |

| | | | | | | | | |
|--------|-----|-----------------------|--|--|--|--|-------|--------|
| (n=18) | LQC | TB _{Gộp} | | | | | 99,91 | 99,10 |
| | | CV _{Gộp} (%) | | | | | 5,38 | 7,12 |
| | MQC | TB _{Gộp} | | | | | 95,37 | 108,60 |
| | | CV _{Gộp} (%) | | | | | 6,62 | 3,38 |
| | HQC | TB _{Gộp} | | | | | 90,44 | 104,63 |
| | | CV _{Gộp} (%) | | | | | 4,15 | 9,15 |

3.5 Hiệu suất chiết

Xác định hiệu suất chiết IRB, HCTZ và IS bằng cách so sánh diện tích peak IRB, HCTZ và IS trong các mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu

pha trong pha động). Kết quả xác định hiệu suất chiết của IRB, HCTZ và IS ở 3 mức nồng độ LQC, MQC, HQC được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5 Hiệu suất chiết của IRB, HCTZ và IS (n = 6)

| | IRB | | | HCTZ | | | Telmisartan (IS) | | |
|--|-------|-------|--------|-------|-------|--------|------------------|-------|--------|
| | LQC | MQC | HQC | LQC | MQC | HQC | LQC | MQC | HQC |
| Hiệu suất chiết (%) | 90,80 | 98,20 | 103,53 | 93,51 | 94,89 | 100,60 | 97,76 | 88,49 | 103,12 |
| CV (%) | 5,46 | 2,05 | 2,09 | 8,46 | 5,49 | 2,41 | 3,60 | 1,49 | 3,11 |
| Hiệu suất chiết TB ở 3 mức nồng độ (%) | 97,51 | | | 96,33 | | | 96,45 | | |
| CV (%) | 6,56 | | | 3,90 | | | 7,67 | | |

3.6 Ảnh hưởng của nền mẫu (Matrix effect)

Tiến hành phân tích 6 lô huyết tương trắng đã xử lý rồi thêm chất phân tích ở 2 nồng độ LQC và HQC cùng với chuẩn nội. Song song đó tiến hành phân tích mẫu LQC và HQC có chuẩn nội trong pha động. Ảnh hưởng nền mẫu đối với các chất phân tích được trình

bày ở Bảng 6. Tỉ số MF_{IRB/IS} và tỉ số MF_{HCTZ/IS} ở mức nồng độ LQC và HQC có giá trị CV lần lượt là (2,61-5,38) % và (1,74-6,22) %. Phương pháp phân tích có bị ảnh hưởng bởi nền mẫu nhưng vẫn nằm trong mức cho phép và đáp ứng yêu cầu của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

Bảng 6 Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu khi phân tích IRB và HCTZ

| Mẫu | MF _{IRB} | MF _{HCTZ} | MF _{IS} | MF _{IRB/MF_{IS}} | MF _{HCTZ/MF_{IS}} |
|--------|-------------------|--------------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| LQC | 89,52 | 99,82 | 106,22 | 0,84 | 0,94 |
| | 116,11 | 109,16 | 114,90 | 1,01 | 0,95 |
| | 106,15 | 103,72 | 115,15 | 0,92 | 0,90 |
| | 108,23 | 115,89 | 118,61 | 0,91 | 0,98 |
| | 109,17 | 112,11 | 118,24 | 0,92 | 0,95 |
| | 117,48 | 117,54 | 124,69 | 0,94 | 0,94 |
| TB | 107,78 | 109,71 | 116,30 | 0,93 | 0,94 |
| CV (%) | | | | 5,83 | 2,61 |
| HQC | 108,34 | 109,34 | 122,20 | 0,89 | 0,89 |
| | 105,36 | 110,54 | 119,25 | 0,88 | 0,93 |
| | 106,78 | 107,41 | 122,22 | 0,87 | 0,88 |
| | 101,74 | 107,56 | 119,48 | 0,85 | 0,90 |
| | 98,40 | 92,60 | 114,22 | 0,86 | 0,81 |
| | 98,56 | 108,59 | 110,76 | 0,89 | 0,98 |
| TB | 103,20 | 106,01 | 118,02 | 0,87 | 0,90 |
| CV (%) | | | | 1,74 | 6,22 |



3.7 Ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư (carryover)

Tiến hành thử nghiệm lượng mẫu tồn dư để kiểm tra sự có mặt của chất phân tích từ lần tiêm trước đó. Các mẫu được tiêm theo thứ tự sau: mẫu có nồng độ cao

nhất (ULOQ) và mẫu trắng, tiêm lặp lại 6 lần, tiêm 6 lần mẫu có nồng độ LLOQ để đánh giá. Kết quả được trình bày trong Bảng 7, cho thấy không có ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư đối với cả IRB, HCTZ và IS.

Bảng 7 Ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư (carryover)

| Chất phân tích | Mức nồng độ | Diện tích peak trung bình | Lượng mẫu tồn dư (%) |
|----------------|-------------|---------------------------|----------------------|
| IRB | LLOQ | 11 919 | 0,00 |
| | ULOQ | 16 498 344 | |
| | Mẫu trắng | 0 | |
| HCTZ | LLOQ | 525 | 0,00 |
| | ULOQ | 165 318 | |
| | Mẫu trắng | 0 | |
| IS | LLOQ | 1 869 508 | 0,00 |
| | ULOQ | 1 994 923 | |
| | Mẫu trắng | 0 | |

3.8 Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Tiến hành xử lý mẫu huyết tương chứa chất phân tích ở 2 mức nồng độ LQC và HQC ở các điều kiện bảo quản sau: sau 6 giờ ở nhiệt độ phòng; sau khi xử lý dung dịch cô mẫu 24 giờ ở (2-8) °C; sau 3 chu kỳ đông - rã đông ở -70 °C và sau khi xử lý được đặt trong 48

giờ trong buồng tiêm mẫu. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 8, cho thấy hàm lượng IRB, HCTZ và IS nằm trong khoảng (85-115) % so với nồng độ ban đầu với giá trị CV < 15 %. Như vậy, các hoạt chất trong huyết tương ổn định ở các điều kiện đã khảo sát.

Bảng 8 Độ ổn định của IRB, HCTZ và IS

| Điều kiện bảo quản | | Nhiệt độ phòng (25 °C) - 6 giờ | | Trong buồng tiêm mẫu (10 °C) - 48 giờ | | Sau 3 chu kỳ đông - rã đông | |
|--------------------|----------------|--------------------------------|--------|---------------------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | | LQC | HQC | LQC | HQC | LQC | HQC |
| IRB | Độ phục hồi TB | 98,32 | 87,32 | 97,28 | 90,18 | 110,37 | 97,93 |
| | CV (%) | 4,67 | 1,45 | 5,14 | 5,24 | 2,63 | 1,22 |
| HCTZ | Độ phục hồi TB | 99,59 | 109,10 | 99,45 | 100,41 | 104,27 | 109,53 |
| | CV (%) | 7,38 | 1,78 | 7,71 | 3,79 | 8,35 | 3,05 |

4 Kết luận và đề xuất

Ưu điểm của phương pháp sử dụng định tính và định lượng các chất bằng LC-MS/MS thông qua các ion sẽ chính xác và đặc hiệu. Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình xử lý mẫu thích hợp nên có hiệu suất chiết trung bình của IRB, HCTZ và chuẩn nội telmisartan ở 3 mức nồng độ trong khoảng (96,33-97,51) % với giá trị CV không quá 8 %. So sánh với một số công trình đã công bố trước đó [3,4] quy trình xử lý mẫu này có hiệu suất chiết cao và ổn định.

Trong nghiên cứu này, LLOQ của IRB và HCTZ lần lượt là (5 và 0,901) ng/mL. Ở mức nồng độ này, kết quả độ đúng và độ chính xác lần lượt là (104,71 và

3,06) % đối với IRB, và (101,03 và 16,780) % đối với HCTZ. Tỷ lệ S/N ở mức LLOQ lần lượt là 16,998 và 21,225 đối với IRB và HCTZ. LLOQ của IRB và HCTZ trong nghiên cứu này thấp hơn so với quy trình sử dụng cùng kỹ thuật phân tích LC-MS/MS đã được công bố trước đó. Nghiên cứu của Tutunji và cộng sự năm 2010 có LLOQ của IRB và HCTZ lần lượt là 60 ng/mL và 1 ng/mL [3]. Như vậy, độ nhạy của phương pháp với kỹ thuật xử lý mẫu bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng cho phép xác lập giá trị LLOQ ở mức thấp hơn với các mức đã công bố trước đây. Đây là một trong những ưu điểm của phương pháp phân tích. Phương pháp phân tích IRB và HCTZ trong huyết tương người bằng kỹ thuật LC-MS/MS đã được xây

dụng và thẩm định đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của US-FDA và EMA về thẩm định phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

Áp dụng phương pháp phân tích này trong việc xác định nồng độ irbesartan và hydrochlorothiazid trong dịch sinh học để theo dõi hiệu quả điều trị của bệnh nhân.

Kiến nghị có thể thực hiện thêm độ ổn định dài hạn các chất trong huyết tương để có thể đánh giá sinh khả dụng của các thuốc chứa hoạt chất trong dịch sinh học

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.82/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Wan X., Ma P. và Zhang X. (2014). *A promising choice in hypertension treatment: Fixed-dose combinations*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 9(1), 1–7.
2. Bộ Y tế (2015), Dược thư Quốc gia Việt Nam. *Nhà xuất bản Y học, Hà Nội*, tr. 777-779, 835-837.
3. Tutunji L.F., Tutunji M.F., Alzoubi M.I. và cộng sự. (2010). *Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence studies*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51(4), 985–990.
4. Qi-Fang Huang, Chang-Sheng Sheng, Yan Li và cộng sự. (2013). *Efficacy and Safety of a Fixed Combination of Irbesartan/Hydrochlorothiazide in Chinese Patients with Moderate to Severe Hypertension*. Drugs in R&D, 13(2), 109–117.
5. Qiu X., Wang Z., Wang B. và cộng sự. (2014). *Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to a bioequivalence study*. Journal of Chromatography B, 957, 110-115.
6. FDA (2018), *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*, Rockville, MD, USA, pp. 1-44.
7. EMA (2015), *Guideline on bioanalytical method validation*, pp. 1-23.

Development of an analytical method for Irbesartan and Hydrochlorothiazide in human plasma

Le Thi Dao

Faculty of Medical Laboratory Technology, Nguyen Tat Thanh University
ltdao@ntt.edu.vn

Abstract This paper presents the process of developing and partially validating the analytical procedure for irbesartan (IRB) and hydrochlorothiazide (HCTZ) in human plasma via the LC-MS/MS technique. The analytical method used telmisartan as an internal standard for the determination of irbesartan and hydrochlorothiazide. The analytes and internal standards were extracted using liquid-liquid extraction technique with tert-butyl methyl ether, Gemini C18 column (150 mm × 2 mm; 3 μm), Methanol mobile phase – ammoniumformat buffer at 5 mM, pH = 5 (80:20), flow rate 0.4 mL/min, and sample injection volume 2 μL. Irbesartan and telmisartan were analyzed in the positive ionization mode and hydrochlorothiazide in the negative ionization mode. According to the US-FDA and EMA guidelines for the validation of drug analytical methods in biological fluids, the results of partial validation of the analytical procedure showed that the procedure achieved specificity, extraction efficiency of more than 95 %, and linearity over the intended concentration ranges, and achieving intraday and intraday accuracy and precision, with the lower limits of quantification for IRB and HCTZ being 0.005 μg/mL and 0.901 ng/mL, respectively.

Keywords Liquid-liquid extraction, Human plasma, Hydrochlorothiazide, Irbesartan, LC-MS/MS

