

Nghiên cứu định lượng verapamil trong huyết tương chó bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ

Vũ Văn Tuấn^{1,2*}, Trịnh Nam Trung², Nguyễn Văn Bạch²

¹Trường Đại học Đại Nam, 1 phố Xóm, phường Phú Lương, Hà Nội, Việt Nam

²Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/6/2025; ngày chuyển phân biện 16/6/2025; ngày nhận phân biện 8/7/2025; ngày chấp nhận đăng 11/7/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm xây dựng phương pháp định lượng verapamil trong huyết tương chó bằng sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS), đáp ứng yêu cầu của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Dược điển Việt Nam, đồng thời ứng dụng để đánh giá sinh khả dụng *in vivo* của viên nén nổi verapamil giải phóng kéo dài. Mẫu huyết tương được xử lý bằng phương pháp kết tủa protein kết hợp chiết pha rắn với acetonitril, magnesi sulfat và natri clorid. Verapamil và chuẩn nội diltiazem được phân tích bằng LC-MS/MS với ion hóa bằng phun điện tử ở chế độ dương (ESI(+)) và ghi phổ phản ứng đa ion đặc trưng (MRM). Phương pháp được thẩm định theo: độ đặc hiệu, tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, giới hạn định lượng dưới (LLOQ), hiệu suất chiết, độ ổn định và độ nhiễu chéo. Kết quả cho thấy, LLOQ là 5,0 ng/ml, khoảng tuyến tính 5,0-495,0 ng/ml; bình phương hệ số tương quan $R^2=0,9999$, độ đúng 87,1-106,6%, hiệu suất chiết 70,5-79,7%. Mẫu ổn định qua 3 chu kỳ đông - rã, trong quá trình xử lý và bảo quản dài hạn ở -40°C ; độ nhiễu chéo trong giới hạn cho phép. Phương pháp được áp dụng định lượng verapamil trong huyết tương chó ($n=6$) sau uống viên nổi 120 mg; $C_{\max}=232,9\pm 18,1$ ng/ml; $T_{\max}=5,3\pm 1,2$ giờ; $AUC_{0-24}=2907,5\pm 290,3$ giờ.ng/ml; $AUC_{0-\infty}=3310,6\pm 365,0$ giờ.ng/ml. Phương pháp đạt độ nhạy, chính xác và độ tin cậy cao, phù hợp nghiên cứu sinh khả dụng các dạng bào chế verapamil.

Từ khóa: huyết tương chó, sắc ký lỏng khối phổ, verapamil.

Chỉ số phân loại: 3.1, 3.4

Study on quantification of verapamil in dog plasma by liquid chromatography-mass spectrum

Van Tuan Vu^{1,2*}, Nam Trung Trinh², Van Bach Nguyen²

¹Dai Nam University, 1 Xom Street, Phu Luong Ward, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Military Medical University, 160 Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

Received 12 June 2025; revised 8 July 2025; accepted 11 July 2025

Abstract:

This study aims to develop and validate an Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantification of verapamil in canine plasma, compliant with FDA and Vietnamese Pharmacopoeia requirements, and to apply this method for the *in vivo* bioavailability evaluation of a gastro-retentive extended-release verapamil tablet. Plasma samples were processed using protein precipitation combined with solid-phase extraction employing acetonitrile, magnesium sulfate, and sodium chloride. Verapamil and the internal standard diltiazem were analysed using LC-MS/MS with electrospray ionisation in positive mode (ESI+) and multiple reaction monitoring (MRM) acquisition. The method was validated for specificity, linearity, accuracy, precision, lower limit of quantification (LLOQ), extraction recovery, stability, and carry-over. Results show that the method achieved an LLOQ of 5.0 ng/ml, a linear range of 5.0-495.0 ng/ml; a coefficient of determination of $R^2=0.9999$, accuracy between 87.1 and 106.6%, and extraction recovery ranging from 70.5-79.7%. The analyte was stable after three freeze-thaw cycles, during sample preparation, and under long-term storage at -40°C . Carry-over was within acceptable limits. The method was successfully applied to quantify verapamil in canine plasma ($n=6$) following oral administration of a 120 mg floating tablet; $C_{\max}=232.9\pm 18.1$ ng/ml; $T_{\max}=5.3\pm 1.2$ h; $AUC_{0-24}=2907.5\pm 290.3$ h.ng/ml; $AUC_{0-\infty}=3310.6\pm 365.0$ h.ng/ml. The developed LC-MS/MS method exhibited high sensitivity, accuracy, and reliability, making it suitable for bioavailability studies of verapamil formulations.

Keywords: canine plasma, Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry, verapamil.

Classification numbers: 3.1, 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: tuanvv@dainam.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Verapamil hydroclorid (VER) là một thuốc nhóm ức chế kênh canxi sử dụng trong điều trị đau thắt ngực, tăng huyết áp và rối loạn nhịp tim. Verapamil có sinh khả dụng thấp, đạt khoảng 20% do bị chuyển hóa mạnh lần đầu tại gan và thời gian bán thải ngắn (từ 2 đến 8 giờ) [1, 2]. Do đó, việc nghiên cứu bào chế các dạng thuốc giải phóng kéo dài chứa verapamil giúp giảm số lần dùng thuốc trong ngày cho bệnh nhân là cần thiết [3]. Để đảm bảo độ an toàn và hiệu quả kinh tế, việc đánh giá sinh khả dụng của các dạng bào chế được thực hiện trên động vật (thường là trên chó) trước khi thử trên người. Nồng độ thuốc trong máu ở mức ng/ml và có lẫn nhiều tạp chất gây khó khăn cho quá trình phân tích. Vì vậy, cần thiết phải xây dựng một phương pháp thích hợp để định lượng verapamil trong huyết tương chó.

Đến nay, trong nước mới chỉ có T.D. Mạnh và cs (2025) [4] đã định lượng verapamil trong huyết tương chó bằng kỹ thuật sắc ký lỏng với đầu dò huỳnh quang. Tuy nhiên, độ nhạy và đặc hiệu của phương pháp này không tốt nên các trường hợp nồng độ thấp và lẫn tạp chuyển hóa có thể cho kết quả không chính xác. Ngoài ra, việc xử lý mẫu huyết tương theo phương pháp kết tủa protein bằng dung môi hữu cơ có hạn chế về mức độ tinh sạch. Kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ được biết đến với độ đặc hiệu cao. Một số nghiên cứu đã được tiến hành để định lượng verapamil trong huyết tương người [5, 6] và huyết tương chuột [7, 8]. Tuy nhiên, chưa có công bố quốc tế nào định lượng verapamil trong huyết tương chó. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm xây dựng một phương pháp mới để định lượng verapamil trong huyết tương chó bằng sắc ký lỏng khối phổ, cho kết quả tin cậy và đáp ứng các yêu cầu của FDA về phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nguyên liệu: Chất chuẩn verapamil hydroclorid, SKS: QT060909 hàm lượng 100,52% tính theo nguyên trạng và chất chuẩn nội diltiazem hydroclorid SKS: C0221218 hàm lượng 99,60% tính theo nguyên trạng được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Thuốc sử dụng trong nghiên cứu là viên nén verapamil 120 mg giải phóng kéo dài theo cơ chế nổi ở dạ dày, là sản phẩm nghiên cứu của nhóm tác giả [3].

Mẫu huyết tương trắng không chứa verapamil, được lấy từ các chó tham gia thử nghiệm đánh giá sinh khả dụng trước khi dùng thuốc. Mẫu huyết tương chó uống thuốc chứa verapamil, là các mẫu huyết tương chó được lấy sau khi dùng thuốc. Các hóa chất, dung môi đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký lỏng gồm methanol, acid formic và nước. Magnesi sulfat và natri clorid đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

Động vật: Chó ta, giống đực khoẻ mạnh, cân nặng 10-12 kg/con, được theo dõi trước khi tiến hành thí nghiệm 1 tuần. Bữa tối trước ngày dùng thuốc, cho chó ăn nhẹ trước 10 giờ đêm. Ngày dùng thuốc, không cho chó ăn sáng, cho chó uống 1 viên thuốc còn nguyên vẹn với 50 ml nước (trong tình trạng không gây mê) và cho chó ăn vào thời điểm 8 giờ kể từ sau khi uống thuốc.

Thiết bị và dụng cụ: Hệ thống HPLC Agilent 1290 Infinity II (Đức) kết nối với hệ phổ khối Agilent 6475 Triple Quadrupole (LC-MS/MS) (Singapore). Các thiết bị khác bao gồm cân phân tích MS 205 DU (Mettler Toledo, Thụy Sĩ), máy lắc vortex (IKA, Đức), máy ly tâm Universal 320 (Đức). Ống đựng máu có sẵn heparin loại 4 ml (BD Vacutainer® Heparin).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp định lượng:

- Chuẩn bị các dung dịch chuẩn: Chất chuẩn và chuẩn nội được hòa tan bằng methanol để có dung dịch chuẩn gốc nồng độ 1 mg/ml. Pha loãng các dung dịch này với nước để được dãy các dung dịch chuẩn và chuẩn nội làm việc 1000 ng/ml.

Xử lý mẫu huyết tương chó: Hút chính xác 0,5 ml huyết tương cho vào ống ly tâm 2 ml. Thêm 50 µl dung dịch diltiazem 1000 ng/ml và 0,5 ml acetonitril. Tiến hành lắc xoay trên máy vortex trong một phút. Tiếp tục thêm 0,2 g magnesi sulfat và 0,05 g natri clorid. Lắc xoay một phút rồi ly tâm với tốc độ 16000 rcf trong 10 phút ở nhiệt độ phòng (22-24°C). Hút lớp dịch lỏng trên cùng để định lượng bằng LC-MS/MS [9].

- Chuẩn bị mẫu thẩm định: Pha loãng dung dịch chuẩn và chuẩn nội làm việc bằng dịch chiết huyết tương trắng để được dãy dung dịch chuẩn trong huyết tương có nồng độ VER lần lượt là 5, 10, 25, 50, 150, 200, 300, 500 ng/ml. Mẫu kiểm tra nồng độ thấp (LQC), nồng độ giữa (MQC) và nồng độ cao (HQC) trong huyết tương có nồng độ VER lần lượt là 15; 175 và 375 ng/ml được chuẩn bị độc lập. Mẫu trắng là huyết tương chó được lấy trước khi cho chó uống thuốc. Các mẫu thẩm định được xử lý tương tự như mẫu huyết tương chó ở trên.

- Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Hypersil Gold RP C18 (150x2,1 mm; 3µm); nhiệt độ cột 40°C; tốc độ dòng 0,25 ml/phút; Detector MS/MS; nhiệt độ autosampler 15°C. Pha động gồm hỗn hợp Methanol:Acid formic 0,1% (48:52, tt/tt); Thể tích tiêm: 0,4 µl. Các điều kiện này đã được tối ưu dựa trên nghiên cứu của N.C.C Borges và cs (2005) [5].

- Điều kiện ghi phổ: Với kiểu khối phổ hai lần MS/MS, chế độ ion hóa ESI(+), chế độ ghi phổ MRM, tiến hành tiêm các dung dịch phân tích sau xử lý (như mô tả phần xử lý mẫu huyết tương chó) vào trong hệ thống sắc ký khối phổ. Xác định các ion mẹ, ion con có cường độ tín hiệu cao và ổn định cho VER và nội chuẩn nhờ phần mềm Optimizer được tích hợp sẵn của thiết bị.

Thẩm định phương pháp: Tiến hành thẩm định phương pháp theo hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học của FDA và Dược điển Việt Nam V [10, 11].

Định lượng verapamil trong huyết tương: Mẫu máu được thu thập tại các thời điểm: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16 và 24 giờ sau khi dùng thuốc. Tại mỗi thời điểm, lấy khoảng 3 ml máu từ tĩnh mạch chi sau, cho vào các ống đựng máu chứa sẵn chất chống đông heparin (BD Vacutainer® Heparin), lắc nhẹ 8-10 lần. Ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng (22-24°C) để thu huyết tương. Huyết tương thu được được bảo quản ở -40°C cho đến khi phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS [11].

Phương pháp xử lý số liệu: Các tham số thống kê bao gồm giá trị trung bình, độ lệch chuẩn tuyệt đối (SD), độ chính xác (CV), phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số tương quan (R) được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Các thông số dược động học được xác định bằng phần mềm Phoenix 8.3.4.

Đạo đức nghiên cứu: Các số liệu được Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố; nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

3. Kết quả

3.1. Kết quả xây dựng phương pháp

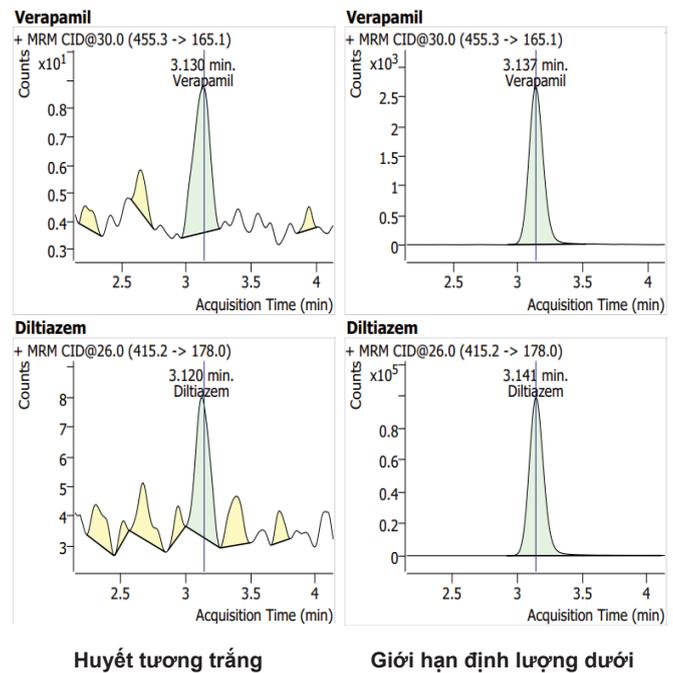
Dung dịch chuẩn verapamil (100 ng/ml) được tiêm trực tiếp vào hệ thống phân tích để tối ưu hóa điều kiện phân tích. Chế độ ion hóa ESI dương được sử dụng và ion mẹ [M+H]⁺ được phân mảnh để chọn ion con có cường độ mạnh nhất phục vụ định lượng. Các thông số tối ưu thu được nhờ phần mềm Optimizer và được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Điều kiện khối phổ sau tối ưu.

Thông số	Verapamil	Diltiazem
Ion mẹ (m/z)	455,3	415,2
Ion con (m/z)	165,1	178,0
Điện áp phân mảnh (V)	188	152
Điện áp gia tốc (V)	5	5
Năng lượng va chạm (V)	30	26
Cực ion hóa	Dương tính	Dương tính
Tốc độ khí (l/min)	13,0	
Áp suất khí phun (psi)	35,0	
Tốc độ khí bao (l/min)	11,0	
Nhiệt độ khí (°C)	300	
Nhiệt độ khí bao (°C)	300	
Điện áp mao quản (V)	5200	
Điện áp đầu phun (V)	200	

3.2. Kết quả thẩm định phương pháp

Độ chọn lọc - độ đặc hiệu: Phân tích các mẫu huyết tương trắng và các mẫu LLOQ theo phương pháp đã được xây dựng. Sắc ký đồ thể hiện trong hình 1 và kết quả đánh giá ảnh hưởng của nền đến mẫu được trình bày ở bảng 2.



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng và giới hạn định lượng dưới thêm nội chuẩn. (+ MRM CID: Ghi phổ phản ứng đa ion đặc trưng ở chế độ ion dương với năng lượng phân mảnh ion (Collision-Induced Dissociation); Counts: Đếm tín hiệu; Acquisition Time (min): Thời gian thu nhận tín hiệu (phút); LLOQ: Giới hạn định lượng dưới).

Bảng 2. Ảnh hưởng của mẫu trắng tại thời gian lưu của VER (n=6).

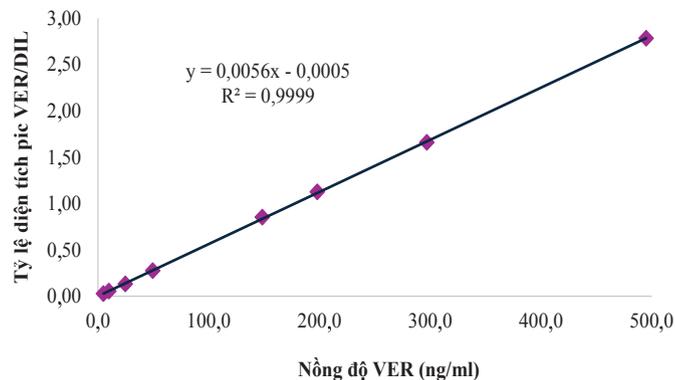
Thứ tự	Tín hiệu pic của VER		Tín hiệu pic của DIL	
	Mẫu trắng	LLOQ	Mẫu trắng	LLOQ
TB	109±61	20652±204	55±30	77886±99443
Tỷ lệ tín hiệu (%)		0,5310		0,0071

Kết quả ở hình 1 và bảng 2 cho thấy, trên sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng, tại các thời điểm 3,13 và 3,12 phút (trùng với thời gian lưu của VER và DIL trong mẫu chuẩn) sự xuất hiện các pic có các mảnh phổ khối m/z=455,3 → 165,1 (VER) và m/z=415,2 → 178,0 (DIL) là không đáng kể. Diện tích pic các vết nhiễu của mẫu trắng tại các thời điểm trùng với thời gian lưu của VER và DIL là không đáng kể, lần lượt chiếm 0,5310 (không quá 20%) và 0,0071% (không quá 5%). Vì vậy, quy trình phân tích đảm bảo có khả năng phát hiện, phân biệt được VER, DIL và không bị ảnh hưởng bởi các tạp chất có trong huyết tương.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính: Các dung dịch VER chuẩn trong huyết tương trắng có nồng độ khoảng 5-500 ng/ml. Sau khi phân tích, nồng độ VER có trong mẫu được tính theo kỹ thuật nội chuẩn. Kết quả xác định mối tương quan giữa tỷ lệ diện tích pic của VER/DIL với nồng độ của VER trong huyết tương chó được trình bày trong bảng 3 và hình 2.

Bảng 3. Sự phụ thuộc giữa tỷ lệ diện tích pic của VER/DIL và nồng độ VER chuẩn trong huyết tương.

Mẫu	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Nồng độ VER (ng/ml)	5,0	9,9	24,8	49,5	148,5	198,0	297,0	495,0
Tỷ lệ diện tích pic VER/DIL	0,0259	0,0537	0,1312	0,2740	0,8519	1,1250	1,6604	2,7834
Phương trình hồi quy	$y = 0,0056x - 0,0005$ $R^2 = 0,9999$							
Nồng độ VER theo đường chuẩn (ng/ml)	4,7	9,7	23,5	49,0	152,2	201,0	296,6	497,1
Độ đúng (%)	95,1	97,8	95,1	99,0	102,5	101,5	99,9	100,4



Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa tỷ lệ diện tích pic và nồng độ verapamil trong huyết tương.

Kết quả bảng 3 và hình 2 cho thấy, trong khoảng nồng độ từ 5,0 đến 495,0 ng/ml, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ VER và tỷ lệ giữa diện tích pic của VER/DIL với bình phương hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1 ($R^2=0,9999$). Nồng độ VER xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đạt 95,1-102,5% và nằm trong giới hạn cho phép ($\pm 15\%$). Đường chuẩn và khoảng tuyến tính đã xây dựng phù hợp với yêu cầu về phân tích thuốc trong dịch sinh học của FDA.

Giới hạn định lượng dưới: Tiến hành phân tích mẫu huyết tương trắng và mẫu huyết tương chứa verapamil ở nồng độ 5,0 ng/ml (mức thấp nhất trong dải tuyến tính). Đáp ứng đỉnh thu được từ mẫu chuẩn được sử dụng để tính toán nồng độ dựa trên đường chuẩn. Độ đúng được đánh giá

thông qua so sánh giữa nồng độ tính toán và giá trị thực của mẫu. Kết quả về LLOQ được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định giá trị giới hạn định lượng dưới của phương pháp (n=6).

	Diện tích pic VER	Diện tích pic DIL	Tỷ lệ diện tích pic VER/DIL	Nồng độ (ng/ml)	Độ đúng (%)
TB±SD	20652±204	778869±9443	0,0265±0,0003	4,8±0,063	97,50±0,90
CV (%)					0,96

Theo kết quả trình bày tại bảng 4, tại thời gian lưu khoảng 3,14 phút, tín hiệu của mẫu chuẩn 5,0 ng/ml vượt quá 5 lần so với mẫu trắng. Độ chính xác qua 6 lần phân tích có $CV < 10\%$, trong khi độ đúng 97,50±0,90%, nằm trong ngưỡng chấp nhận 80-120%. Do đó, nồng độ 5,0 ng/ml đáp ứng tiêu chí LLOQ theo hướng dẫn phân tích sinh học của FDA. Đồng thời, các giá trị CV và độ đúng so với lý thuyết tại LLOQ cho thấy phương pháp đảm bảo độ đúng và lặp lại tại nồng độ LLOQ.

Độ đúng và độ lặp lại: Các mức nồng độ kiểm tra gồm LQC, MQC và HQC được chuẩn bị và xử lý theo quy trình phân tích đã thiết lập. Nồng độ verapamil trong các mẫu được xác định thông qua đường chuẩn, và độ đúng được tính bằng tỷ lệ phần trăm giữa giá trị đo được và nồng độ lý thuyết. Kết quả đánh giá độ đúng, độ lặp lại trong ngày và khác ngày được tổng hợp tại bảng 5.

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ đúng và độ lặp lại (n=6, TB±SD).

Ngày	LQC	MQC	HQC
I	100,09±0,94	104,93±0,98	102,92±1,15
II	93,52±4,52	99,53±4,75	102,35±2,56
III	92,64±4,45	94,93±2,85	100,24±4,09
TB±SD (n=18)	95,42±4,88	99,80±5,20	101,84±2,94
CV (%)	5,11	5,68	2,89

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, ở cả 3 nồng độ (thấp: 14,9 ng/ml; trung bình: 173,3 ng/ml và cao: 371,3 ng/ml) của khoảng tuyến tính, phương pháp đều cho độ đúng khác ngày và trong ngày cao (87,10-106,62%) và độ lặp lại với giá trị CV không quá 10% (2,89-5,68%). Các kết quả trên chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại, độ đúng đáp ứng được các yêu cầu đối với phương pháp phân tích các chất trong dịch sinh học.

Hiệu suất chiết của phương pháp: Tiến hành xử lý và phân tích sắc ký các mẫu LQC, MQC, HQC theo quy trình. Song song với các mẫu trong huyết tương, tiến hành phân tích mẫu spike là các dung dịch tự tạo bằng cách thêm dung dịch chuẩn làm việc vào nền huyết tương trắng đã xử lý có nồng độ tương ứng như các mẫu QC. Tiến hành phân tích

các mẫu. Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi VER từ huyết tương chó được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Hiệu suất chiết verapamil từ mẫu huyết tương chó (n=6).

	LQC			MQC			HQC		
	Mẫu có chiết	Mẫu spike	Hiệu suất (%)	Mẫu có chiết	Mẫu spike	Hiệu suất (%)	Mẫu có chiết	Mẫu spike	Hiệu suất (%)
TB±SD	64221±462	87236±2811	73,68±2,38	742705±5679	975522±30512	76,19±2,14	1476194±12683	1905076±60448	77,54±2,11
CV (%)	0,72	3,22	3,22	0,76	3,13	2,81	0,86	3,17	2,72

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, ở mỗi nồng độ QC, hiệu suất chiết không khác nhau quá 15%. Giá trị CV giữa các đáp ứng của VER trong các mẫu QC có qua chiết tách ở mỗi nồng độ không lớn hơn 15%. Giá trị CV giữa các đáp ứng của VER trong các mẫu QC không qua chiết tách ở mỗi nồng độ không lớn hơn 10%. Do đó, phương pháp xử lý mẫu đã được xây dựng là phù hợp để chiết tách VER từ huyết tương chó.

Độ ổn định sau 3 chu kỳ đông - rã: Phân tích các lô mẫu LQC và HQC (mỗi nhóm 5 mẫu) theo phương pháp đã được xây dựng. Xác định nồng độ VER có trong các mẫu bằng đường chuẩn tiến hành song song trong cùng điều kiện. Kết quả so sánh nồng độ VER có trong các mẫu LQC và HQC ngay sau khi pha (nồng độ ban đầu) và nồng độ VER có trong các mẫu LQC và HQC bảo quản sau 3 chu kỳ đông - rã được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Độ ổn định của VER trong mẫu huyết tương sau 3 chu kỳ đông - rã (n=5).

	LQC		HQC	
	Ban đầu	Sau 3 chu kỳ đông - rã	Ban đầu	Sau 3 chu kỳ đông - rã
TB±SD (ng/ml)	14,9±0,1	14,8±0,1	372,1±1,3	370,8±2,7
Độ ổn định (%)	99,33		99,65	
CV (%)	0,85	0,79	0,37	0,71

Kết quả xác định nồng độ VER trong mẫu LQC, HQC sau 3 chu kỳ đông - rã và các mẫu tiến hành phân tích ngay sau khi rã đông cho thấy: Độ ổn định của mẫu huyết tương ở LQC và HQC lần lượt là 99,33 và 99,65% so với ban đầu. Các giá trị CV tại mỗi nồng độ đều không quá 5%. Như vậy, VER trong mẫu huyết tương ổn định qua 3 chu kỳ đông - rã.

Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu: Đánh giá độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu trên các mẫu LQC và HQC. So sánh nồng độ VER trong các mẫu LQC, HQC sau khi pha được xử lý theo quy trình đã lựa chọn và các mẫu LQC, HQC có cùng nồng độ tương ứng nhưng xử lý mẫu sau khi để tan chảy ở nhiệt độ phòng 6 giờ. Kết quả được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Độ ổn định của VER trong huyết tương sau 6 giờ (n=5).

	LQC		HQC	
	Ban đầu	Sau 6 giờ	Ban đầu	Sau 6 giờ
TB±SD (ng/ml)	14,9±0,1	14,7±0,2	372,1±1,2	369,2±2,9
Độ ổn định (%)	98,66		99,22	
CV (%)	0,85	1,43	0,37	0,88

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ VER trong mẫu LQC, HQC được xử lý ngay và xử lý sau 6 giờ để tan chảy ở nhiệt độ phòng đảm bảo độ ổn định lần lượt là 98,66 và 99,22%. Các giá trị CV tại mỗi nồng độ đều không quá 5%. Như vậy, VER trong mẫu huyết tương ổn định sau 6 giờ ở nhiệt độ phòng.

Độ ổn định dài ngày: Đánh giá độ ổn định của mẫu huyết tương trên các mẫu LQC và HQC. Xác định nồng độ VER có trong mẫu tại các thời điểm ngay sau khi pha và sau 10, 20 và 30 ngày bảo quản mẫu ở nhiệt độ -40°C theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Kết quả độ ổn định dài ngày của verapamil trong huyết tương (n=5).

		LQC		HQC	
		TB±SD (ng/ml)	Độ ổn định (%)	TB±SD (ng/ml)	Độ ổn định (%)
Ban đầu	TB±SD (ng/ml)	15±0,2		372,1±1,3	
	Độ ổn định (%)	1,33	0,36		
Sau 10 ngày	TB±SD (ng/ml)	14,9±0,2		370,2±8,6	
	Độ ổn định (%)	99,47	99,49		
	CV (%)	1,53	2,34		
Sau 20 ngày	TB±SD (ng/ml)	14,8±0,2		368,9±9,1	
	Độ ổn định (%)	98,67	99,15		
	CV (%)	1,07	2,47		
Sau 30 ngày	TB±SD (ng/ml)	14,9±0,3		366,1±7,5	
	Độ ổn định (%)	99,6	98,39		
	CV (%)	2,25	2,04		

Kết quả bảng 9 cho thấy, độ ổn định của VER trong các mẫu bảo quản ở nhiệt độ -40°C sau 10, 20 và 30 ngày so với mẫu định lượng ngay nằm trong giới hạn cho phép 85-115%. Các giá trị CV tại mỗi nồng độ đều không quá 5%. Điều đó chứng tỏ VER ổn định trong huyết tương trong 30 ngày bảo quản ở nhiệt độ -40°C.

Độ nhiễu chéo: Chuẩn bị 6 mẫu huyết tương trắng và 6 mẫu huyết tương có nồng độ LLOQ và 1 mẫu ULOQ. Tiến hành xử lý mẫu theo quy trình và phân tích xen kẽ nhau 6 lần giữa mẫu trắng và LLOQ sau khi phân tích mẫu ULOQ. Diện tích pic ghi nhận tại thời gian lưu tương ứng với chất phân tích và nội chuẩn được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Kết quả đánh giá độ nhiễm chéo phân tích.

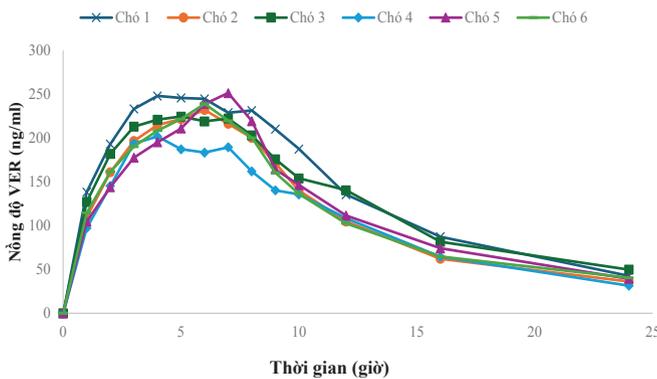
Thứ tự	Trắng	VER	Tỷ lệ (%)	Trắng	DIL	Tỷ lệ (%)
1	103	20787	0,4955	40	632703	0,0063
2	102	20785	0,4907	36	637663	0,0056
3	115	20645	0,5570	48	636717	0,0075
4	119	20833	0,5712	50	638848	0,0078
5	424	20575	2,0608	116	637313	0,0182
6	137	20286	0,6753	44	644220	0,0068
TB			0,8084			0,0087

Kết quả bảng 10 cho thấy, tại thời gian lưu của VER, tín hiệu ghi của mẫu trắng so với LLOQ là 0,8084% (dưới 20%). Tại thời gian lưu của DIL, tín hiệu ghi của mẫu trắng so với LLOQ là 0,0087% (dưới 5%). Do đó, phương pháp đảm bảo độ nhiễm chéo và tin cậy để phân tích nồng độ VER trong huyết tương chó.

Như vậy, kết quả thẩm định độ đặc hiệu - chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, hiệu suất chiết, độ ổn định và độ nhiễm chéo của VER cho thấy, phương pháp đã xây dựng đáp ứng được các yêu cầu của một phương pháp phân tích dùng trong sinh học. Phương pháp này có thể áp dụng để định lượng VER trong huyết tương chó khi nghiên cứu sinh khả dụng của các dạng bào chế chứa VER trên chó thực nghiệm.

3.3. Kết quả định lượng verapamil trong huyết tương chó

Tiến hành phân tích các mẫu huyết tương chó đã thu thập theo phương pháp đã xây dựng và thẩm định. Xác định nồng độ VER có trong mẫu dựa vào đường chuẩn được tiến hành song song trong ngày. Kết quả được minh họa trong hình 3 (n=6).



Hình 3. Nồng độ verapamil trong huyết tương chó theo thời gian.

Kết quả định lượng cho thấy, nồng độ VER cao nhất đạt được là 251,4 ng/ml ở thời điểm 7 giờ sau khi chó 5 uống viên thuốc. Nồng độ VER thấp nhất quan sát thấy là 31,6 ng/ml ở thời điểm 24 sau khi chó 4 uống viên thử. Các nồng độ này hoàn toàn nằm trong khoảng tuyến tính đã xác định được. Một số mẫu có nồng độ VER định lượng được thấp hơn 5 ng/ml đều là mẫu huyết tương thu được trước khi

cho chó dùng thuốc (mẫu ở thời điểm t=0 giờ). Khi phân tích dược động học, các nồng độ này đều được coi bằng 0. Kết quả xác định các thông số dược động chính bằng phần mềm Phoenix 8.3.4 cho thấy $C_{max} = 232,9 \pm 18,1$ ng/ml; $T_{max} = 5,3 \pm 1,2$ giờ; $AUC_{0-24} = 2907,5 \pm 290,3$ giờ.ng/ml; $AUC_{0-\infty} = 3310,6 \pm 365,0$ giờ.ng/ml.

4. Bàn luận

Phương pháp định lượng VER trong huyết tương chó đã xây dựng có giới hạn định lượng dưới là 5 ng/ml cho thấy, độ nhạy của phương pháp tốt hơn so với kết quả công bố của N.V. Bach và cs (2025) [4] định lượng bằng sắc ký lỏng với đầu dò huỳnh quang cho LLOQ 20 ng/ml. Đường chuẩn của phương pháp có R^2 là 0,9999. Điều này có thể do phương pháp xử lý mẫu hợp lý và đầu dò MS/MS đặc hiệu tốt hơn. Đồng thời việc sử dụng nội chuẩn có cũng làm giảm đáng kể sai số do mất mẫu khi xử lý và hạn chế ảnh hưởng của nền mẫu bao gồm các sản phẩm phân hủy của verapamil trong huyết tương. Các kết quả thẩm định chứng tỏ phương pháp có độ đặc hiệu - chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, hiệu suất chiết, độ ổn định và độ nhiễm chéo đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích trong dịch sinh học của FDA [10]. Khi định lượng VER trong các mẫu huyết tương chó nhận thấy nồng độ VER trong các mẫu huyết tương đều nằm trong khoảng tuyến tính, các kết quả này phù hợp với công bố trước đó [4, 5]. Như vậy, phương pháp đã xây dựng có khoảng tuyến tính phù hợp, độ đúng - độ chính xác cao và có thể ứng dụng vào thực tế để đánh giá sinh khả dụng trên chó của VER từ các dạng bào chế khác nhau. Mặc dù vậy, trong nghiên cứu còn chưa đánh giá được ảnh hưởng của nền mẫu (Matrix effect). Do đó, việc kiểm soát động vật thí nghiệm về tình trạng sức khỏe, cân nặng, chế độ ăn uống là cần thiết.

Kết quả định lượng và xác định các thông số dược động học, thể hiện tính hợp lý của các thời điểm lấy mẫu. Nghiên cứu lấy ở thời điểm 0 giờ và 13 điểm khác, đáp ứng yêu cầu (ít nhất 11 điểm sau khi sử dụng thuốc). T_{max} bằng 5,3 giờ thỏa mãn yêu cầu có ít nhất 3-4 điểm lấy mẫu trước đạt C_{max} . Số điểm sau nồng độ đỉnh là 8 điểm (quy định là không ít hơn 4-6 điểm). Tổng số điểm lấy mẫu của đường cong nồng độ - thời gian là 14 điểm, đáp ứng điều kiện không ít hơn 12 điểm. Mặc dù, thời điểm lấy mẫu dừng ở 24 giờ, tương ứng với nồng độ 40,1 ng/ml, giá trị này bằng khoảng 1/6 C_{max} , chưa đáp ứng về thời gian lấy mẫu cần kéo dài đến khi nồng độ được chất trong mẫu máu bằng khoảng 1/10 đến 1/20 giá trị nồng độ đỉnh hoặc sau khi uống thuốc 72 giờ. Tuy nhiên, tỷ lệ của AUC_{0-24} so với $AUC_{0-\infty}$ đạt 87,8% (>80%) thể hiện nghiên cứu có thời điểm lấy mẫu phù hợp [11].

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng VER trong huyết tương chó bằng LC-MS/MS và thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu: độ đặc hiệu - chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, hiệu suất chiết, độ ổn định và độ nhiễu chéo đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích trong dịch sinh học của FDA và Dược điển Việt Nam. Phương pháp đã được ứng dụng để định lượng VER trong huyết tương chó khi đánh giá sinh khả dụng của các viên nén nổi verapamil 120 mg giải phóng kéo dài trên chó thực nghiệm, các thông số bao gồm $C_{max}=232,9\pm 18,1$ ng/ml; $T_{max}=5,3\pm 1,2$ giờ; $AUC_{0-24}=2907,5\pm 290,3$ giờ.ng/ml; $AUC_{0-\infty}=3310,6\pm 365,0$ giờ.ng/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ministry of Health (2018), *Vietnam National Drug Formulary*, Medical Publishing House, 1532pp (in Vietnamese).
- [2] Joint Formulary Committee (2017), *British National Formulary (BNF) 73*, Pharmaceutical Press, 1480pp.
- [3] V.V. Tuan, T.N. Trung, N.V. Bach (2025), “Optimising verapamil hydrochloride floating tablets formula”, *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, DOI: 10.31276/VJSTE.2025.0006.
- [4] N.V. Bach, T.D. Manh (2025), “Evaluation of bioavailability of verapamil hydrochlorid sustained-release 120 mg capsules on experimental dogs”, *Vietnam Journal of Community Medicine*, **66(2)**, pp.113-119.
- [5] N.C.C. Borges, G.D. Mendes, R.E.B. Astigarraga, et al. (2005), “Verapamil quantification in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: An application for bioequivalence study”, *Journal of Chromatography B*, **827(2)**, pp.165-172.
- [6] A.M. Punt, N.A. Stienstra, M.E.A. Kleef, et al. (2019), Screening of cardiovascular agents in plasma with LC-MS/MS: a valuable tool for objective drug adherence assessment, *Journal of Chromatography B*, **1121**, pp.103-110.
- [7] H. Mohamed, A. Abdulrhman, A. Haitham, et al. (2021), “Rapid and sensitive LC-MS/MS method for the enantioanalysis of verapamil in rat plasma using superficially porous silica isopropyl-cyclofructan 6 chiral stationary phase after SPE: Application to a stereoselective pharmacokinetic study”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **201**, DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114108.
- [8] Y.Y. Hongping, W.W. Changhe, L.L. Wen, et al. (2020), “Comparative pharmacokinetics of verapamil and norverapamil in normal and ulcerative colitis rats after oral administration of low and high dose verapamil by UPLC-MS/MS”, *Xenobiotica*, **50(6)**, pp.713-721, DOI: 10.1080/00498254.2019.1682715.
- [9] T.S. Cao, D.N. Dinh, T.N. Thach (2016), “Pharmacokinetic analysis of levo-tetrahydropalmatine in rabbit plasma by rapid sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, **1008**, pp.81-86, DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.11.033.
- [10] Administration U.S. Food and Drug (2018), *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*, Silver Spring, MD: U.S. Department of Health and Human Services.
- [11] Ministry of Health (2017), *Vietnamese Pharmacopoeia V: Appendix 14-Guidelines on The Evaluation of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence for Generic Drugs*, Hanoi Medical Publishing House, 6pp.