

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG NIFEDIPIN TRONG HUYẾT TƯƠNG CHÓ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ SIÊU HIỆU NĂNG

Trần Quang Trung¹, Nguyễn Thanh Hải²
Trịnh Văn Lầu³, Nguyễn Hữu Duy¹, Nguyễn Thị Đào⁴

TÓM TẮT

Mục tiêu: Thẩm định phương pháp sắc ký lỏng khối phổ siêu hiệu năng (UPLC MS/MS) để định lượng nifedipin (NIF) trong huyết tương chó. **Phương pháp:** Thẩm định độ đặc hiệu - chọn lọc, giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ chính xác, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, tỷ lệ thu hồi hoạt chất, ảnh hưởng của nền mẫu, độ nhiễm chéo, độ ổn định của NIF trong huyết tương. **Kết quả:** Thẩm định được phương pháp UPLC MS/MS để định lượng NIF trong huyết tương chó theo các tiêu chí quy định. **Kết luận:** Xây dựng được phương pháp UPLC MS/MS để định lượng NIF trong huyết tương chó làm cơ sở đánh giá sinh khả dụng các chế phẩm thuốc chứa NIF.

* Từ khóa: Nifedipin; UPLC-MS/MS; Huyết tương chó.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nifedipin là thuốc chẹn kênh calci và là thuốc đầu tiên của nhóm dihydropyridin được đưa vào lâm sàng điều trị suy tĩnh mạch vành từ năm 1969 [2]. NIF được sử dụng rộng rãi trong điều trị tăng huyết áp, chống cơn đau thắt ngực và các rối loạn về mạch máu khác [1, 3, 4]. NIF thuộc phân nhóm II theo hệ thống phân loại sinh dược học với đặc tính tan tốt trong lipid, do đó có khả năng hấp thu nhanh và hoàn toàn qua đường tiêu hóa sau khi sử dụng theo đường uống. Tuy nhiên, NIF có sinh khả dụng thấp, khoảng 45 - 75%, chủ yếu do chuyển hóa tiền hệ thống,

dẫn đến nồng độ thuốc trong huyết tương thấp [1]. Nhiều phương pháp đã được sử dụng để định lượng NIF trong huyết tương như: Phương pháp sắc ký khí, phương pháp von kế, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV và detector điện hóa [5, 6, 7, 8, 9]. Tuy nhiên, các phương pháp này không đủ độ nhạy để xác định NIF ở nồng độ thấp trong huyết tương. Vì vậy, để làm cơ sở cho việc đánh giá sinh khả dụng của các chế phẩm chứa NIF bằng phương pháp phân tích nhanh chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm: *Nghiên cứu định lượng NIF trong huyết tương chó bằng phương pháp UPLC MS/MS.*

¹Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y

²Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

⁴Công ty CPDP Thành Phát

Người phản hồi: Trần Quang Trung (tqt201316@gmail.com)

Ngày nhận bài: 29/6/2020

Ngày bài báo được đăng: 06/7/2020

NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu và thiết bị

* Nguyên liệu, dung môi, hóa chất:

- Chất chuẩn:

+ Nifedipin: Chuẩn Dược điển Việt Nam, SKS: WS. 0216200.02, hàm lượng: 99,82% (nguyên trạng).

+ Glibenclamid (GLI): Chuẩn Dược điển Việt Nam, SKS: 0103129, hàm lượng: 100,10% (khan), độ ẩm 0,09%, dùng làm chuẩn nội trong phương pháp phân tích.

- Dung môi, hóa chất:

+ Methanol, acetonitril, acid formic đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho sắc ký.

+ Chloroform đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích.

- Huyết tương trắng: Huyết tương chó không chứa NIF do Ban Cung cấp Động vật thí nghiệm, Học viện Quân y cung cấp.

* Thiết bị:

Các thiết bị phân tích đều được chuẩn hóa, đáp ứng yêu cầu của ISO/IEC 17025 - 2005 và GLP bao gồm: Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ siêu hiệu năng UPLC MS/MS (Water), cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,01 mg (Thụy Sĩ), máy lắc siêu âm Elmasonic S100H (hãng Elma, Đức), máy lắc ngang HS 260 (hãng IKA, Đức), máy lắc xoay Genius 3 (hãng IKA, Đức), tủ lạnh âm sâu (hãng Panasonic, Nhật Bản) và các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, pipet có độ chính xác phù hợp.

2. Phương pháp nghiên cứu

* Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: C18; 50 x 2,1 mm; 1,9 µm. Nhiệt độ cột 40°C.

- Pha động: MeCN : acid formic 0,1% (90 : 10).

- Tốc độ dòng: 0,2 ml/phút.

- Detector: Xevo TQD.

- Thẻ tích tiêm: 5 µl.

- Nhiệt độ buồng tiêm: 20°C.

* Điều kiện khối phổ:

+ Kiểu khối phổ: MS/MS, nguồn ion hóa ESI (+).

+ Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện NIF và GLI.

Bảng 1: Các thông số của detector khối phổ để định tính, định lượng NIF và chuẩn nội GLI.

Chất phân tích / Thông số	NIF	IS (GLI)
Chế độ ion hoá	ESI (+)	ESI (+)
Thế nguồn (kV)	4	4
Thế hội tụ (V)	24	34
Nhiệt độ hóa hơi (°C)	350	350
Lưu lượng khí mang (L/H)	850	850
Lưu lượng khí hỗ trợ (L/H)	20	20
Năng lượng bắn phá (V)	8	14
m/z ion mẹ	347,07	494,20
m/z ion con	315,02	369,12

* Quy trình xử lý mẫu huyết tương chó:

Để huyết tương rã đông ở nhiệt độ phòng. Lấy 0,5 ml huyết tương, thêm 50 µl dung dịch chuẩn nội (dung dịch GLI 0,4 µg/ml). Lắc xoay 5 giây. Thêm 4 ml cloroform. Lắc ngang cơ học 300 lần/phút trong 5 phút. Ly tâm 4.000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 2 ml lớp dịch trong phía dưới, bốc hơi (không nhiệt) dưới dòng khí nitơ. Hòa tan cần thu được trong 0,5 ml pha động. Tiêm sắc ký.

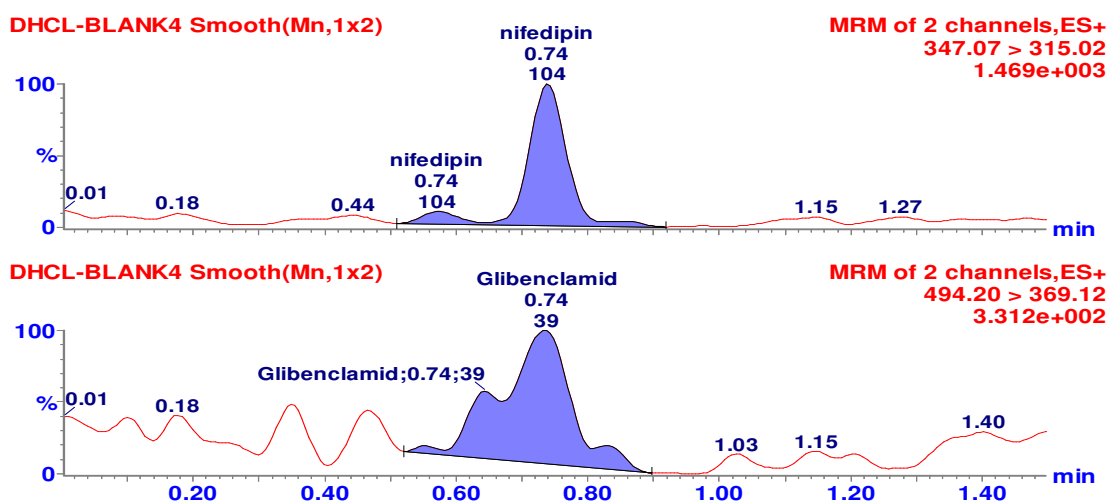
* *Thẩm định phương pháp định lượng NIF trong huyết tương chó bằng phương pháp UPLC MS/MS:*

Phương pháp được đánh giá theo hướng dẫn thẩm định phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học của US-FDA

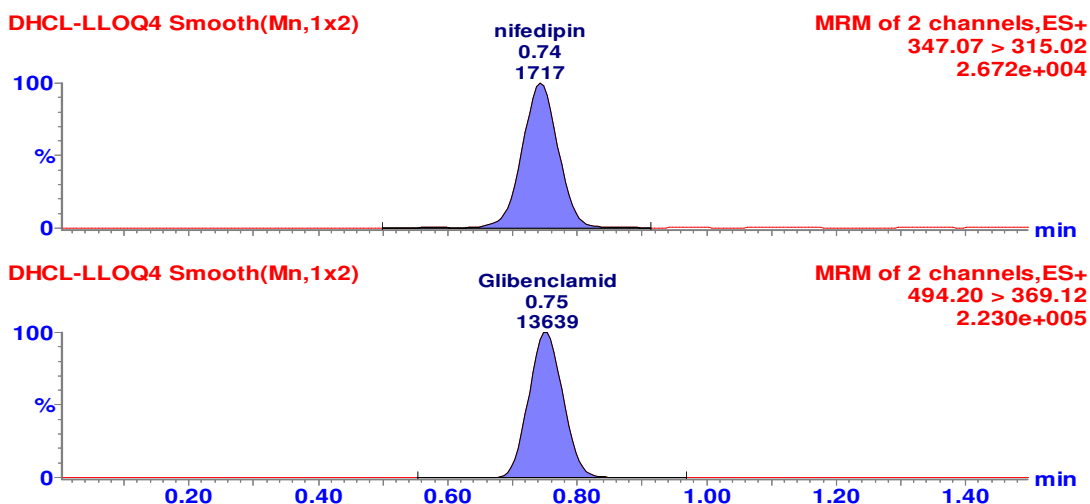
dựa trên việc khảo sát các chỉ tiêu sau: Độ đặc hiệu - chọn lọc, giới hạn định lượng dưới, độ đúng, độ chính xác, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, tỷ lệ thu hồi hoạt chất, độ nhiễu chéo, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định của NIF trong huyết tương.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Độ đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp



Hình 1: Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng.



Hình 2: Sắc ký đồ mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn NIF ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/ml) và chuẩn nội GLI (40 ng/ml).

Phân tích các mẫu huyết tương trắng và các mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn NIF với nồng độ khoảng 0,5 ng/ml có chứa nội chuẩn GLI. Kết quả phân tích cho thấy, đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIF (0,74 phút) nhỏ hơn 7% đáp ứng của pic NIF ở nồng độ 0,5 ng/ml và đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của GLI (0,75 phút) không vượt quá 1% đáp ứng của GLI. Do vậy, phương pháp đặc hiệu và chọn lọc đối với NIF, GLI theo các quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Bảng 2: Độ tuyến tính của phương pháp thu được sau khi phân tích hồi quy.

CC	CC1		CC2		CC3		CC4		CC5	
	Nồng độ (ng/ml)	Tỷ lệ NIF/GLI	Nồng độ (ng/ml)	Tỷ lệ NIF/GLI	Nồng độ (ng/ml)	Tỷ lệ NIF/GLI	Nồng độ (ng/ml)	Tỷ lệ NIF/GLI	Nồng độ (ng/ml)	Tỷ lệ NIF/GLI
S1	0,5	0,116	0,5	0,131	0,5	0,141	0,5	0,132	0,5	0,135
S2	1,0	0,227	1,0	0,234	1,0	0,267	1,0	0,25	1,0	0,26
S3	2,0	0,426	2,0	0,435	2,0	0,507	2,0	0,501	2,0	0,487
S4	5,0	1,020	5,0	1,056	5,0	1,225	5,0	1,161	5,0	1,178
S5	10,0	1,981	10,0	2,117	10,0	2,357	10,0	2,285	10,0	2,385
S6	20,1	4,122	20,1	4,214	20,1	4,674	20,0	4,751	20,1	4,678
S7	40,1	7,681	40,1	7,984	40,1	8,930	40,1	8,803	40,2	8,983
S8	80,2	15,343	80,2	16,259	80,2	18,005	80,2	17,786	80,3	18,144
S9	100,3	19,857	100,3	20,676	100,3	22,186	100,2	23,299	100,4	23,044
a	0,1980		0,2047		0,2298		0,2291		0,2303	
b	0,0198		0,0287		0,0300		0,0193		0,0223	
r	0,9994		0,9998		0,9993		0,9994		0,9997	

Bảng 3: Độ đúng của các mẫu chuẩn.

CC	Độ chính xác so với nồng độ lý thuyết (%)				
	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5
S1	97,1	99,8	97,0	98,4	98,1
S2	104,5	100,5	103,3	100,8	103,1
S3	102,5	99,2	103,7	105,2	100,9
S4	101,0	100,4	104,0	99,7	100,4
S5	99,0	102,1	101,3	98,9	102,6
S6	103,1	101,7	100,5	103,3	100,6
S7	96,5	96,9	96,6	95,6	96,8
S8	96,5	98,9	97,5	96,7	98,0
S9	99,9	100,6	96,1	101,4	99,6

Tiến hành pha các mẫu huyết tương chứa chuẩn NIF có nồng độ chính xác khoảng từ 0,5 - 100 ng/ml. Phân tích theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ NIF (x) có trong mẫu và tỷ lệ diện tích pic NIF/GLI (y) bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng hệ số tỷ trọng (1/nồng độ²).

Kết quả thẩm định cho thấy: Trong khoảng nồng độ từ 0,5 - 100 ng/ml, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ NIF và tỷ lệ diện tích pic NIF/GLI với hệ số tương quan r > 0,99. Nồng độ NIF xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều 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. Giới hạn định lượng dưới của phương pháp

Bảng 4: Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp.

STT	Nồng độ lý thuyết (ng/ml)	Nồng độ xác định từ đường chuẩn (ng/ml)	Độ đúng so với nồng độ thực (%)	Giá trị S/N của pic
1	0,5	0,6	113,5	> 10
2		0,5	100,4	> 10
3		0,6	112,2	> 10
4		0,6	119,5	> 10
5		0,6	123,8	> 10
Trung bình (%)			113,9	
CV (%)			7,8	

Phân tích các mẫu huyết tương trắng, mẫu huyết tương chứa chuẩn nội GLI và chuẩn NIF có nồng độ chính xác khoảng 0,5 ng/ml (mẫu LLOQ). Xác định nồng độ NIF có trong các mẫu LLOQ từ đường chuẩn tiến hành làm song song trong cùng điều kiện.

Kết quả thẩm định cho thấy: Giá trị S/N của pic NIF trong các mẫu LLOQ đều > 10; tỷ lệ (trung bình) nồng độ NIF có trong mẫu xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết nằm trong khoảng từ 80 - 120%, đáp ứng yêu cầu giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

4. Độ đúng, độ chính xác của phương pháp

Bảng 5: Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày.

STT	LLOQ (0,5 ng/ml)		LQC (1,5 ng/ml)		HQC (50,2 ng/ml)		HQC (75,3 ng/ml)	
	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)
1	0,6	113,5	1,6	105,6	43,1	85,8	71,9	95,5
2	0,5	100,4	1,6	109,4	49,6	98,9	70,9	94,2
3	0,6	112,2	1,7	116,2	51,1	101,8	67,7	89,9

TẠP CHÍ Y - DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ 5-2020

4	0,6	119,5	1,6	108,5	50,0	99,5	70,9	94,2
5	0,6	123,8	1,6	106,6	48,4	96,5	71,2	94,6
Trung bình	0,6	113,9	1,6	109,3	48,4	96,5	70,5	93,7
CV (%)	7,7	7,8	2,8	3,8	6,5	6,5	2,3	2,3

Bảng 6: Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác khác ngày.

STT	LLOQ (0,5 ng/ml)		LQC (1,5 ng/ml)		HQC (50,2 ng/ml)		HQC (75,3 ng/ml)	
	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)	Nồng độ (ng/ml) ^(a)	Độ đúng (%) ^(b)
Ngày 1	0,6	113,5	1,6	105,6	43,1	85,8	71,9	95,5
	0,5	100,4	1,6	109,4	49,6	98,9	70,9	94,2
	0,6	112,2	1,7	116,2	51,1	101,8	67,7	89,9
	0,6	119,5	1,6	108,5	50,0	99,5	70,9	94,2
	0,6	123,8	1,6	106,6	48,4	96,5	71,2	94,6
Ngày 2	0,5	97,7	1,6	106,6	46,9	93,4	74,8	99,3
	0,5	100,2	1,5	100,2	48,1	95,8	70,7	93,9
	0,5	107,7	1,6	107,8	49,7	98,9	68,2	90,6
	0,5	107,7	1,7	110,1	49,5	98,5	70,5	93,6
	0,6	119,1	1,5	102,4	48,0	95,6	70,3	93,4
Ngày 3	0,5	106,5	1,5	103,0	42,4	84,5	67,3	89,4
	0,6	110,4	1,5	98,2	44,7	89,1	65,2	86,6
	0,5	108,9	1,4	96,4	43,1	85,8	62,4	82,8
	0,4	83,4	1,4	91,5	44,2	88,1	63,7	84,7
	0,5	101,8	1,4	94,0	39,9	79,4	65,2	86,6
Trung bình	0,5	107,5	1,5	103,8	46,6	92,8	68,7	91,3
CV (%)	11,6	9,4	6,4	6,5	7,3	7,3	5,0	5,0

Tiến hành thẩm định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày trên 4 lô mẫu thử LLOQ, LQC, MQC và HQC chứa NIF có nồng độ lần lượt tương ứng là 0,5; 1,5; 50; 75 ng/ml. Xác định hàm lượng NIF trong mẫu bằng phương pháp đường chuẩn và tỷ lệ % giữa nồng độ xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết.

Kết quả thẩm định cho thấy: Ở các khoảng nồng độ thấp; trung bình và cao, phương pháp có độ đúng trung bình trong ngày đạt từ 93,7 - 113,9%. Tương tự, độ đúng trung bình khác ngày đạt từ 91,3 - 107,5%; độ chính xác trong ngày đạt từ 2,3 - 7,8%, độ chính xác khác ngày đạt từ 5,0 - 11,6%; đáp ứng các yêu cầu về độ đúng, độ chính xác ($\leq 20\%$ đối với mẫu LLOQ và $\leq 15\%$ đối với các mẫu còn lại) của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của US-FDA.

5. Tỷ lệ thu hồi

Bảng 7: Kết quả khảo sát tỷ lệ thu hồi của NIF và GLI.

Tỷ lệ thu hồi (%)		
	NIF	GLI
LQC	104,7	104,3
MQC	99,0	
HQC	106,6	

Xác định tỷ lệ thu hồi NIF và GLI bằng cách so sánh diện tích pic NIF và GLI trong các lô mẫu qua chiết tách và không qua chiết tách (mẫu pha trong nền).

Kết quả khảo sát cho thấy: Phương pháp xử lý mẫu cho hiệu suất chiết NIF, GLI cao và ổn định (sai khác giữa các nồng độ không quá 10%).

6. Xác định ảnh hưởng của nền mẫu

Bảng 8: Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu.

STT	MF _{NIF}		MF _{GLI}		MF _{NIF} /MF _{GLI}	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
1	0,513	0,536	0,659	0,594	0,779	0,903
2	0,564	0,395	0,658	0,463	0,858	0,853
3	0,543	0,490	0,610	0,576	0,891	0,851
4	0,497	0,440	0,554	0,530	0,897	0,831
5	0,454	0,507	0,577	0,499	0,787	1,015
6	0,805	0,555	0,726	0,605	1,109	0,917
Trung bình					0,887	0,895
CV (%)					13,5	7,5

Chuẩn bị các mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau. Tiến hành xử lý theo quy trình thu được các dung dịch nền mẫu. Chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong các dung dịch nền mẫu tương ứng. Song song chuẩn bị các mẫu chuẩn ở nồng độ LQC và HQC trong pha động. Đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu qua tỷ số MF_{NIF}/MF_{IS}. Trong đó, MF_{NIF}, MF_{IS} được xác định bằng cách so sánh diện tích pic của NIF và IS của các mẫu pha trong nền mẫu so với diện tích pic của các mẫu pha trong pha động.

Kết quả khảo sát cho thấy: Không có sự sai khác giữa các nền mẫu khác nhau (CV < 15%).

7. Xác định độ nhiễm chéo

Bảng 9: Kết quả đánh giá độ nhiễm chéo.

STT	Mẫu trắng		Mẫu LLOQ		Mẫu trắng/Trung bình LLOQ		Kết luận
	NIF	GLI	NIF	GLI	NIF	GLI	
1	110	13	1374	10699	0,080	0,0012	Đạt
2	165	42	1374	10536	0,119	0,0040	Đạt
3	133	40	1377	10610	0,096	0,0038	Đạt
4	153	35	1319	10526	0,111	0,0033	Đạt
5	76	5	1461	10366	0,055	0,0005	Đạt
6	108	0			0,078	0,0000	Đạt
Trung bình			1381	10547			

Tiến hành xử lý mẫu theo phương pháp đã xây dựng trên 6 mẫu huyết tương trắng, 05 mẫu chuẩn pha trong huyết tương ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/ml) và 06 mẫu chuẩn pha trong huyết tương ở nồng độ cao nhất của đường chuẩn (100 ng/ml). Tiêm sắc ký các mẫu trắng sau mỗi mẫu ULOQ.

Kết quả thực nghiệm cho thấy: Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIF đáp ứng của các mẫu trắng đều < 20% đáp ứng LLOQ và tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS đáp ứng của các mẫu trắng đều < 5% đáp ứng LLOQ. Như vậy, phương pháp phân tích đáp ứng yêu cầu về độ nhiễm chéo của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

8. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

Bảng 10: Kết quả đánh giá độ ổn định của NIF trong huyết tương.

Độ ổn định	Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/ml)	Nồng độ sau bảo quản (ng/ml; n = 3)	Tỷ lệ sai khác (%)
3 chu kỳ đông - rã đông	LQC	1,5	1,66	10,7
	HQC	75,3	64,0	-15,0
Độ ổn định thời gian ngắn (5 giờ; nhiệt độ phòng)	LQC	1,5	1,54	2,6
	HQC	75,3	64,0	-15,0
Độ ổn định trong autosampler (24 giờ/4°C)	LQC	1,5	1,63	8,7
	HQC	75,3	68,98	-8,4
Độ ổn định dài ngày (-60°C ± -5°C, 45 ngày)	LQC	1,5	1,57	4,8
	HQC	75,3	68,37	-9,2

Tiến hành nghiên cứu độ ổn định của NIF trong huyết tương trên các lô mẫu LQC và HQC. Đánh giá độ ổn định của NIF trong huyết tương bằng cách so sánh nồng độ NIF có trong các mẫu được bảo quản so với nồng độ lý thuyết.

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Nồng độ NIF trong các mẫu LQC và HQC bảo quản sau 3 chu kỳ đông - rã đông, sau 5 giờ bảo quản ở nhiệt độ phòng, sau 24 giờ bảo quản trong autosampler, sau 45 ngày bảo quản ở nhiệt độ $-60 \pm 5^{\circ}\text{C}$ so với nồng độ lý thuyết khác nhau không quá 15%. Do vậy, NIF ổn định trong mẫu huyết tương sau khi bảo quản trong các điều kiện như trên.

KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định lượng NIF trong huyết tương chó bằng phương pháp UPLC MS/MS với giá trị giới hạn định lượng dưới là 0,5 ng/ml, khoảng tuyến tính rộng, độ đúng cao, độ lặp lại với giá trị CV < 15%, phương pháp xử lý mẫu nhanh, đơn giản. Phương pháp phân tích có thể ứng dụng trong các nghiên cứu sinh khả dụng chế phẩm thuốc chứa NIF.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Dược thư Quốc gia Việt Nam. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội 2002:2432-2441.
2. Phạm Tử Dương. Thuốc tim mạch. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội 2003:300-304.
3. O'Rourke RA. Rationale for calcium entry-blocking drugs in systemic hypertension complicated by coronary artery disease.

The American Journal of Cardiology 1985; 56(16):34H-40H.

4. Sweetman SC, et al. Martindale. Pharmaceutical Press 2014:1447-1455.

5. Patrick KS, et al. Gas chromatographic - mass spectrometric analysis of plasma nifedipine. Journal of Chromatography 1989:123-130.

6. Ozaltin N, et al. Determination of nifedipine in human plasma by square wave adsorptive stripping voltammetry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2002:573-582.

7. Zendelovska D, et al. Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. Journal of Chromatography B 2006:85-88.

8. Vertzoni MV. Sensitive and simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of nifedipine in canine plasma. Anal Chim Acta 2006:298-304.

9. Telting-Diaz M, et al. High-performance liquid chromatographic determination of nifedipine, nicardipine and pindolol using a carbon fibre flow-through amperometric detector. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis 1991:889-893.

10. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration: Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation 2018.