

Analytical method development and validation for extraction and quantification of apixaban in human plasma using HPLC

Seyed Mohammad Alavi¹, Amir Beheshti Maal¹, Mohsen Amini², Hoda Jahandar³

¹ PharmD Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, TMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Tehran, Iran

³ Assistant professor, Department of Pharmacognosy, TMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Apixaban, an oral anticoagulant and direct factor Xa inhibitor, is used to reduce the risk of various thromboembolic diseases. Measuring the active substance in blood can assess its effectiveness compared to the reference drug. In this study, a rapid, new, and reliable reversed-phase liquid chromatography method was developed for measuring apixaban in human plasma.

Materials and methods: The chromatographic conditions were optimized, followed by validation using spiked standard samples. To evaluate the extraction method of Apixaban from spiked blood samples, the recovery rate was calculated.

Results: The chromatographic analysis was conducted on a C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ) using isocratic elution with a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile: ammonium acetate buffer 0.15% at pH 7.6 ± 0.05 with a 50:50 volume ratio and a flow rate of 1 mL/min at room temperature. Apixaban detection was carried out at 276 nm. The calibration curve for apixaban in human plasma was linear in the range of 0.3 to 0.12288 μ g/ml with a correlation coefficient of $r^2 = 0.9957$. Limit of Quantitation and Limit of Detection concentrations were obtained as 0.06 and 0.02 μ g/ml, respectively and the average extraction recovery of the extraction method was 78.73%.

Conclusion: The developed and validated HPLC-UV method presented in the study is suitable for accurate determination of apixaban levels in the pharmacokinetic studies.

Keywords: Apixaban, Oral anticoagulant drug, RP-HPLC, Drug quantification, Human plasma.

Cited as: Alavi SM, Beheshti Maal A, Amini M, Jahandar H. Analytical Method Development and Validation for Extraction and Quantification of Apixaban in Human Plasma using HPLC. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(2): 156-165.

Correspondence to: Mohsen Amini

Tel: +98 9122182581

E-mail: moamini@tums.ac.ir

ORCID ID: 0000-0003-3135-2917

Received: 27 May 2024; **Accepted:** 5 Aug 2024

توسعه و معتبرسازی روش استخراج داروی آپیکسابان از خون و آنالیز آن با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

سید محمد علوی^۱، امیر بهشتی مآل^۱، محسن امینی^۲، هدی جهاندار^۳

^۱ دانشجوی دکترای داروسازی، گروه شیمی دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ استاد تمام، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه گیاهان دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آپیکسابان جز داروهای ضد انعقادی خوراکی و مهار کننده مستقیم فاکتور ۱۰ است که جهت کاهش خطر چندین بیماری ترومبومبوآمیولیک استفاده می‌شود. با اندازه گیری ماده موثره دارو در خون می‌توان به اثربخشی آن در مقایسه با داروی مرجع پی برد. در این مطالعه، یک روش سریع، جدید و معتبر بر پایه کروماتوگرافی مایع فاز معکوس برای اندازه گیری آپیکسابان در پلاسمای انسانی، توسعه یافته است.

روش بررسی: ابتدا شرایط کروماتوگرافی بهینه‌سازی شد. سپس، اعتبارسنجی روش با استفاده از نمونه‌های استاندارد اسپایک شده صورت گرفت. برای ارزیابی روش استخراج آپیکسابان از نمونه‌های خون اسپایک شده، درصد بازبایی آپیکسابان محاسبه شد.

یافته‌ها: بررسی آپیکسابان با ستون ($5\mu \text{m}, 250 \text{ mm} \times 4/6 \text{ mm}$) C18 و روش ایزوکراتیک با فاز متحرک شامل استوزنیتریل: بافر آمونیوم استات ۱/۵، درصد با $\text{pH} = ۷/۶ \pm ۰/۵$ به نسبت حجمی $۰/۵:۰/۵:۰/۵$ و سرعت جریان $۱ \text{ میلی لیتر در دقیقه در دمای اتاق، انجام شد. آپیکسابان در طول موج ۲۷۶ \text{ نانومتر} \text{ شناسایی شد. منحنی کالیبراسیون آپیکسابان در پلاسمای انسانی در محدوده} \text{۰/۳} \text{ تا} \text{۰/۱۲۲۸۸} \text{ میکروگرم در میلی لیتر با ضریب همبستگی} = ۰/۹۹۵۷ \text{ خطی بود و حداقل غلظت قابل اندازه گیری و تشخیص به ترتیب} \text{۰/۰۶} \text{ و} \text{۰/۰۲} \text{ میکروگرم بر میکروگرم در میانگین درصد بازبایی روش استخراج دارو از خون} = ۷۸/۷۳ \text{ درصد به دست آمد.}$

نتیجه گیری: روش HPLC-UV توسعه یافته در این مطالعه، برای تعیین دقیق سطوح آپیکسابان در مطالعات فارماکوکنیتیک مناسب است.

واژگان کلیدی: آپیکسابان، داروی ضد انعقاد خوراکی، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با فاز معکوس، اندازه گیری دارو، پلاسمای انسان.

توجه به داروهای ضد انعقاد خوراکی مستقیم، افزایش پیدا

کرده است (۲، ۱). علی‌رغم تمامی مزیت‌های ذکر شده برای داروهای ضد انعقاد خوراکی مستقیم، بررسی‌های فارماکوپیزیلانس این داروها موارد زیادی از خونریزی‌های داخلی در افراد را نشان می‌دهد که در بیشتر موارد منجر به بستری شدن بیمار می‌شود. برای مثال در یک آزمایش تعداد خونریزی‌های ایجاد شده توسط این دارو ها، $۳/۴۴$ نفر به ازای ۱۰۰ نفر در طی یک سال گزارش شده است (۳).

مقدمه

در گذشته آناتاگونیست‌های ویتامین K گزینه‌های ارجح برای پیشگیری از سکته در فیبریلاسیون دهليزی بودند. اما در سال‌های اخیر، به علت مزایایی اعم از فارماکولوژی قابل پیش‌بینی و تداخلات کمتر دارو با غذا و سایر داروهای انسان.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، بخش شیمی دارویی،

محسن امینی (ir) (email: moamini@tums.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0003-3135-2917

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳۳۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۵/۱۵

کیفی دارو است و در تمامی مراحل پیدایش، توسعه و تولید دارو در صنعت داروسازی از آن استفاده می‌شود. (۱۴، ۱۵، ۵). به منظور شناسایی و اندازه گیری آپیکسابان، روش‌های مختلفی، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا رانه شده است. در چندین مطالعه، از این تکنیک همراه با طیف سنج جرمی به منظور شناسایی و اندازه گیری آپیکسابان در پلاسمای انسانی بهره برده شد (۱۶، ۱۷، ۱۸). همچنین در مطالعات دیگری، از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای بررسی ناخالصی‌ها و پایداری دارو (۸) و آنالیز کمی آن در فرمولاسیون دارویی (۲۰، ۲۱، ۲۲) استفاده شد. هدف از این مطالعه توسعه و معتبرسازی یک روش آنالیز با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و دستکثر UV به منظور اندازه گیری غلظت آپیکسابان در نمونه‌های پلاسمای انسانی بود.

مواد و روشها

مواد و تجهیزات مورد استفاده

مواد شیمیایی: ماده فعال دارویی آپیکسابان، متانول، استونیتریل، آمونیوم استات و آمونیوم هیدروکساید (در جه خلوص مناسب HPLC-مرک)، آب دیونیزه (زلال طب شیمی تهران).

تجهیزات: ترازوی آنالیتیکال (BOSCH)، پی اج متر (SANA) (Teknokroma) BRISA C18 5 250*4/6 ستون کروماتوگرافی (guard) مربوطه، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا همراه محافظ (guard) مربوطه، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (Shimadzu LC-10 Series)، سیت فیلتراسیون خلا (ROTOFIX 32 A)، فیلتر ممبران (MILLIPORE)، سانتریفیوز (RIGOL Ultra-3660) و اسپکتروفوتومتر (K₂EDTA ۰/۲۲ میکرونی کوبتر، فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ استرنیل PTFE، لوله فالکون ۱۵ سی سی استرنیل اس بی ال، سرنگ ۳ سی سی، سر سمپلر آبی و زرد، میکروتیوب (پندورف) ۱/۵ سی سی پلی پروپیلنی، حمام التراسونیک، لوله‌های خونگیری غیر و کیوم K₂EDTA دار شرکت فرستت، وورتکس میکس-ر و اسپکتروفوتومتر (RIGOL Ultra-3660).

طراطحی و توسعه روش آنالیز

ابتدا جهت انتخاب حلال مناسب، بررسی حلالیت آپیکسابان در آب، متانول و استونیتریل انجام شد. سپس شرایط کروماتوگرافی مانند نوع ستون و طول آن، ترکیب فاز متحرک، نوع شستشو، سرعت جریان، دمای مناسب و طول موج بهینه تعیین شد.

آماده سازی استوک آپیکسابان

محلول استوک آپیکسابان به غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر در یک بالن ژوژه تیره ۵۰ میلی لیتری با حل کردن

همچنین از آنجایی که این دارو‌ها بر خلاف وارفارین الزام به نظارت و آزمایش ندارند و از سوی دیگر بعضی از آنها مانند ریواروکسابان روزی یک بار تجویز می‌شوند، نگرانی درخصوص کاهش سطح سرمی دارو، در صورت از فراموش شدن یک دوز نیز وجود دارد (۴، ۵).

به همین علت در سال ۲۰۱۸، انجمن قلب و عروق اروپا برای کمک به پزشکان و بیماران دارای فیریلایسیون دهلیزی، فراخوانی جهت توسعه روشی معتبر برای اندازه گیری دقیق غلظت‌های پلاسمایی این دارو‌ها در شرایط اورژانسی، منتشر کرد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، هوگو تن کت بیان کرد که تنظیم دوز بر اساس غلظت سرمی دارو، موثرتر از درمان با استفاده از دوزهای ثابت است (۶، ۷).

یکی از داروهای این دسته آپیکسابان است که ضد انعقاد خوراکی و مهار کننده مستقیم فاکتور ۱۰ است و برای کاهش خطر چندین بیماری ترموبوآمبولیک اعم از سکته ناشی از فیریلایسیون دهلیزی غیر دریچه‌ای، ترموبوز بعد از جراحی زانو و لگن، ترموبوز وریدی عمیق و آمبولی ریه استفاده می‌شود. این دارو هنوز به طور رسمی مونوگرافی در فارماکوپه برای آنالیز و بررسی ندارد. بنابراین روش دقیق و انتخابی برای اندازه گیری و بررسی آن مورد نیاز است (۸، ۹).

بیشترین جذب آپیکسابان در روده کوچک رخ داده و سپس جذب آن در ادامه لوله گوارشی کاهش پیدا می‌کند. فراهمی زیستی مطلق دارو در دوزهای خوراکی، تا ۱۰ میلی گرم در هر دوز، تقریباً ۵۰ درصد است. حضور غذا اثر قابل توجهی بر فراهمی زیستی دارو ندارد (۱۰، ۱۱).

حداکثر غلظت پلاسمایی آپیکسابان، چهار ساعت پس از مصرف دوزهای ۵/۲ و ۵/۱۰ و ۵/۲۵ میلی گرمی، بین ۵۱ تا ۷۱ نانوگرم در میلی لیتر گزارش شده است. همچنین حداکثر غلظت پلاسمایی آن تا دوز ۱۰ میلی گرم، مناسب با افزایش دوز تجویزی افزایش پیدا می‌کند، اما در دوزهای بالاتر از ۲۵ میلی گرم، با افزایش دوز تجویزی، حداکثر غلظت پلاسمایی دارو تغییرات کمی دارد (۱۱-۱۲).

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) یکی از مهم‌ترین ابزارهای شیمی تجزیه امروزی است که اساس آن تفکیک اجزای نمونه بر اساس تفاوت در برهمکنش با فاز ساکن (ستون) و فاز متحرک و در نتیجه تفاوت در زمان خروج آنها از ستون است (۳، ۴). این روش توانایی جداسازی، شناسایی و اندازه گیری ترکیبات موجود در نمونه‌های محلول را دارد و یکی از دقیق‌ترین روش‌های شیمی تجزیه در تحلیل کمی و

بررسی خطی بودن روش آنالیز و رسم نمودار کالیبراسیون روش ارائه شده باید در کل دامنه مورد آنالیز خطی باشد. بنابراین برای مشخص کردن نقاط نمودار کالیبراسیون، با استفاده از راهنمای ICH ۵ غلظت $\mu\text{g/ml}$ $0/3$ $0/24$ $0/92$ $0/1536$ از آپیکسابان در ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین آماده و هر غلظت ۳ بار تزریق شد و سپس با استفاده از میانگین نتایج حاصل از هر غلظت و رگرسیون، نمودار کالیبراسیون رسم شد.

تعیین حد تشخیص

روشی که برای بدست آوردن حد تشخیص و حد اندازه گیری استفاده شد شامل روش محاسباتی و نگرشی بر اساس نسبت سیگنال به نویز بود. در روش محاسباتی با استفاده از فرمول محاسباتی در دستورالعمل (Q2) ICH حد تشخیص به صورت مجازی محاسبه شد. سپس نزدیک ترین غلظت به آن در ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین تهیه و ۳ بار به دستگاه تزریق شد. نسبت سیگنال به نویز و تشخیص نمونه در این غلظت بررسی شد.

۳.۳.۵

S

فرمول محاسبه‌ی حد تشخیص: در آن ۵ انحراف معیار استاندارد و S شیب خط منحنی کالیبراسیون میباشد.

تعیین حد اندازه گیری

مقدار تئوری حد اندازه گیری با توجه به فرمول محاسباتی در دستورالعمل (Q2) ICH محاسبه شد و سپس نزدیک ترین غلظت به آن در ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین آماده سازی و ۳ بار به دستگاه تزریق شد و در آخر نسبت سیگنال به نویز و تکرارپذیری نتایج بررسی شدند.

۱۰۰

S

فرمول محاسبه‌ی حد کمی (اندازه گیری): در آن ۵ انحراف معیار استاندارد و S شیب خط منحنی کالیبراسیون میباشد.

بررسی صحت

بر اساس رهنمودهای ICH، غلظت که گستره‌ی مورد نظر را پوشش بدهند شامل $0/16$ ، $0/2$ و $0/25$ میکروگرم در میلی لیتر در ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین، آماده شدند و هر کدام ۳ بار تزریق شدند و سپس مقدار خطای نسبی با استفاده از فرمول زیر بررسی شد.

$$\frac{\text{سطح زیر نمودار تموته‌ی استانداره} - \text{سطح زیر نمودار تموته‌ی بررسی}}{\text{سطح زیر نمودار تموته‌ی استانداره}} = \text{خطای نسبی}$$

آپیکسابان در متابولو تهیه و در یخچال با دمای ۳ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه پلاسمما از نمونه خونی

نمونه‌های خونی به لوله‌های خونگیری حاوی EDTA منتقل و سپس بلافصله برای جداسازی پلاسمما، به مدت ۱۵ دقیقه با قدرت چرخش g ۱۵۰ سانتریفیوژ شدند. پلاسمای جدا شده در اپندورهای پلی پروبیلنی ۱/۵ میلی لیتر به چند قسمت تقسیم گردیده و در فریزر با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد فریز شدند.

ذوب کردن پلاسمما

نمونه‌های پلاسمما مورد استفاده در روز آزمایش، از فریزر بیرون آورده شده و بلافصله در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شدند.

آماده سازی نمونه‌های استاندارد اسپایک شده پلاسمایی برای تزریق

استخراج دارو از پلاسمما و آماده سازی نمونه برای تزریق با استفاده از روش رسوب دادن پروتئین انجام شد، به هر واحد حجم از پلاسمما اسپایک شده، چهار واحد حجم استونیتریل اضافه شد و با استفاده از میکسر و ورتکس به مدت ۵ دقیقه، با نمونه مخلوط شد. سپس این مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه با قدرت چرخش g ۱۵۰ سانتریفیوژ شده و فاز شفاف بالایی با استفاده از سمپلر جدا شده و از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. به این ترتیب با استفاده از روش رقیق سازی سریالی با ضربی رقت $0/8$ ، غلظت های $0/3$ $0/24$ $0/92$ $0/1536$ و $0/12288$ میکروگرم در میلی لیتر آپیکسابان در پلاسمای شفاف بدون پروتئین تهیه شدند. نمودار کالیبراسیون با ۳ بار تزریق هر غلظت رسم شد.

معتبرسازی روش توسعه یافته

به منظور معتبرسازی روش، پارامترهای نظیر انتخابی بودن، نمودار کالیبراسیون، دامنه، خطی بودن، صحت، دقت، حد تشخیص و حد اندازه گیری به شرح زیر بررسی شدند.

بررسی انتخابی بودن روش

انتخابی بودن شامل توانایی روش در ارزیابی واضح و آشکار آنالیت مورد نظر در حضور سایر مواد مانند ناخالصی‌ها، متabolیتها و سایر مواد جانبی است. از مقایسه نتیجه حاصل از نمونه منفی فاقد آنالیت با نتیجه حاصل از نمونه حاوی آنالیت، می‌توان انتخابی بودن روش را بررسی کرد. به منظور بررسی این امر، نمونه حاوی پلاسمما بدون دارو به عنوان نمونه منفی به دستگاه تزریق شد و کروماتوگرام آن با کروماتوگرام نمونه‌ی حاوی پلاسمما و دارو به عنوان نمونه مثبت مقایسه شد.

به جهت کاهش زمان بازدارندگی و جلوگیری از پهنه شدن پیک با توجه به قطبی بودن آپیکسابان، ستون C18 که غیرقطبی تر از C8 است، انتخاب شد. جهت جداسازی و افزایش رزولوشن پیکها با توجه به منابع و با توجه به ستون‌های موجود در آزمایشگاه، ستون (4/6 mm × 250 mm) C18 Brisa LC2 انتخاب شد. جهت بهینه سازی شرایط، نسبت‌های مختلفی از آب و استونیتریل مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا زمانی که فاز متحرک، محلولی از آب و استونیتریل و آب و متابول بود، در کروماتوگرام حاصل کمی کشیدگی مشاهده شد و نتایج کروماتوگرام‌ها قبل قبول نبود. جهت بهبود نتایج، ترکیب مختلف نمک‌ها برای تهیه بافر استفاده شد و در نهایت بافر آمونیوم استات ۱/۵ درصد، که pH آن با آمونیوم هیدروکساید رقیق شده، در محدوده ۰/۰۵ ± ۷/۶ تنظیم شده بود، انتخاب شد. فاز متحرک شامل محلولی از استونیتریل: بافر آمونیوم استات ۱/۵ درصد با ۱/۰۵ pH ± ۷/۶ با نسبت حجمی ۵۰:۵۰ و سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود. آنالیز در دمای اتاق با روش شست شوی ایزوکراتیک، انجام شد. به منظور انتخاب بهترین طول موج برای مطالعه، استاندارد آپیکسابان در فاز متحرک، در طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر برای آنالیز انتخاب شد. پیک شد و طول موج ۲۷۶ نانومتر برای آنالیز انتخاب شد. پیک مربوط به آپیکسابان در زمان بازداری حدود ۴/۴ دقیقه مشاهده شد. نتایج حاصل از معتبرسازی روش ارائه شده در مطالعه به شرح زیر بود.

بررسی انتخابی بودن روش

در کروماتوگرام نمونه پلاسمای بازداری فاقد دارو، پیکی در زمان بازداری حدود ۴/۴ دقیقه، مربوط به آپیکسابان مشاهده نشد. بنابراین روش آنالیز ارائه شده برای اندازه گیری مقدار آپیکسابان در پلاسما انتخابی بود. شکل ۱ کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه پلاسما بدون آپیکسابان و شکل ۲ کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه پلاسمای حاوی آپیکسابان را نشان می‌دهد.

خطی بودن و نمودار کالیبراسیون

روش توسعه یافته در این مطالعه، در بازه ۰/۳ تا ۰/۱۲۲۸۸ میکروگرم در میلی لیتر، با ضریب همبستگی ۰/۹۹۵۷ خطی بود. نمودار کالیبراسیون و مشخصات آن در شکل ۳ و جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

بررسی تکرار پذیری (دقت) و صحت روش

بر اساس رهنمودهای ICH، سه غلظت ۰/۱۶، ۰/۲۰ و ۰/۲۵، که نماینده سه نقطه حد پایین، وسط و بالای گستره مورد

بررسی دقت

بر اساس رهنمودهای ICH، ۳ غلظت از داروی آپیکسابان که گستره مورد نظر را پوشش بدهند (۰/۲۰ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر)، در ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین، آماده شدند و هر کدام ۳ بار تزریق شدند و سپس مقدار انحراف معیار نسبی محاسبه و ارزیابی شد.

بررسی دقت در دو روز متفاوت

سه غلظت ۰/۱۶، ۰/۲۰ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر، دوباره در روز دیگر هر کدام ۳ بار به دستگاه تزریق شدند، سپس مقدار انحراف معیار نسبی داده‌های حاصل از تزریق هر غلظت، بررسی شد.

محاسبه درصد بازیابی روش استخراج

به منظور اندازه گیری درصد بازیابی (recovery) روش استخراج، مقدار مشخص از دارو در خون تام اسپایک شد و سپس تمامی مراحل استخراج دارو از پلاسمما برای نمونه انجام شد (بر اساس محاسبات انجام شده، پس از انجام تمامی مراحل استخراج، غلظت نهایی ۰/۵۶ میکروگرم در میلی لیتر تخمین زده شد). سپس حاصل استخراج، ۳ بار تزریق شد و با استفاده از فرمول زیر، درصد بازیابی به دست آمد.

$$\frac{\text{سطح زیر تمودار تمیزه} \times \text{بررسی شده}}{\text{سطح زیر تموداری تمیزه} \times \text{اسپایک شده}} = \text{درصد بازیابی}$$

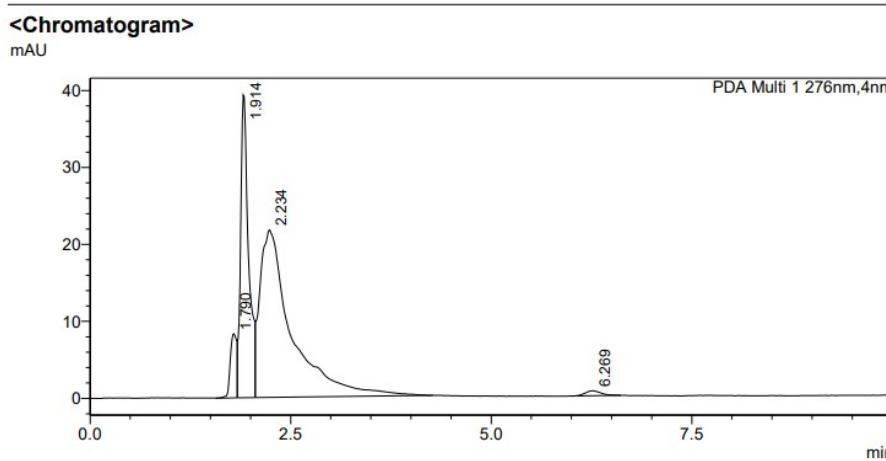
که در این فرمول منظور از نمونه اسپایک شده، نمونه حاوی پلاسمای شفاف اسپایک شده با آپیکسابان با غلظت نهایی ۰/۵۶ میکروگرم در میلی لیتر است.

بررسی توانمندی روش

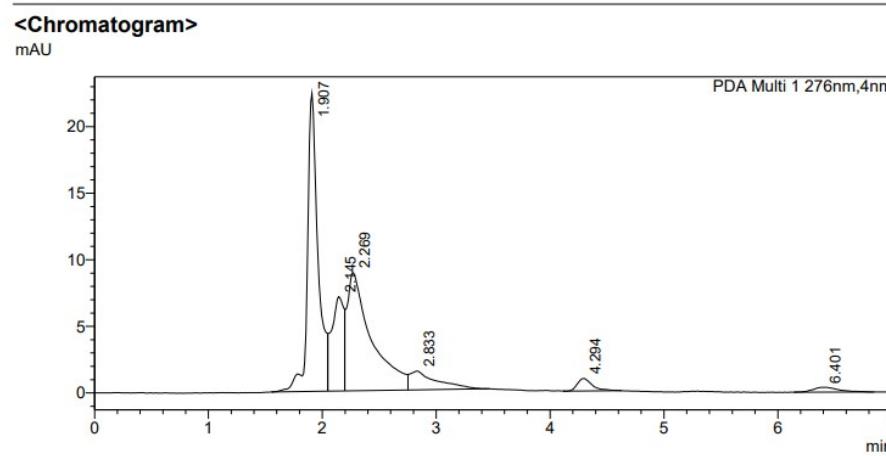
به منظور بررسی توانمندی روش در مقابله با تاثیر عوامل متغیر بر نتایج آنالیز، در روزی متفاوت، با اپراتوری متفاوت، میزان جذب نمونه استاندارد همراه با تغییر در سرعت جریان دستگاه، بررسی شد.

یافته‌ها

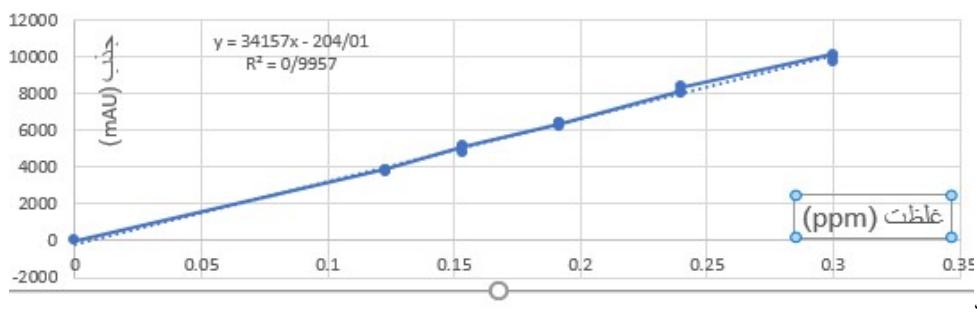
آزمایشات اولیه در این پژوهش نشان داد که داروی آپیکسابان در آب حلایت بسیار کمی دارد، اما در استونیتریل تقریباً و در متابول کاملاً محلول است. با توجه به اینکه داروی آپیکسابان داروی قطبی است و با توجه به منابع علمی معتبر، فاز معکوس برای این تحقیق در نظر گرفته شد.



شكل ۱. کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه‌ی پلاسمای فاقد آپیکسابان.



شكل ۲. کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه‌ی پلاسما حاوی ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر آپیکسابان. وجود پیکی در زمان حدود ۴/۴ دقیقه که در نمونه حاوی دارو مشاهده می‌شود نشان دهنده انتخابی بودن روش توسعه یافته می‌باشد.



شكل ۳. منحنی استاندارد آپیکسابان در پلاسمای شفاف بدون پروتئین.

بررسی تکرار پذیری (دقت) در دو روز متفاوت به منظور بررسی و مقایسه صحت و دقت روش در روزی متفاوت، سه غلظت مشابه با روز قبلی آماده و هر کدام ۳ بار تزریق شدند و سپس مقادیر انحراف معیار و خطای نسبی بررسی شدند و جدول ۴ نشان دهنده نتایج است.

آنالیز هستند، آماده شد و هر کدام سه بار تزریق شدند. نتایج حاصل در جدول ۳ مشاهده می‌شود. داده‌ها نشان می‌دهند که روش مورد نظر در بازه مشخص شده، با میانگین انحراف معیار نسبی و خطای نسبی پایین‌تر از ۲ درصد از صحت و دقت مناسبی برخوردار است.

استخراج آپیکسابان و آنالیز با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

محاسبه درصد بازیابی روش استخراج
درصد بازیابی روش استخراج با توجه به فرمول ذکر شده در بخش
قبل، محاسبه شده و نتیجه آن در جدول ۵ مشاهده می‌شود.
بررسی توانمندی روش (robustness)
به منظور بررسی توانمندی روش در مقابله با تاثیرات حاصل از
عوامل متغیر بر نتایج حاصل، در روزی متفاوت، با اپراتوری
متفاوت، میزان جذب نمونه ی استاندارد همراه با تغییر در سرعت
جریان دستگاه، بررسی شد. نتایج آن در جدول ۶ قابل مشاهده
است.
تعیین حد تشخیص و حد اندازه گیری
با استفاده از فرمول محاسباتی در دستورالعمل ICH(Q2) حد
تشخیص ۰/۰۱۸۱۸ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد. سپس
نزدیک ترین غلظت به آن ۰/۰۰۲ میکرو گرم در میلی لیتر) در
ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین آماده سازی و نمونه
حاصل ۳ بار به دستگاه تزریق شد. نسبت سیگنال به نویز در این
غلظت بررسی شد (شکل ۴).
مقدار تئوری حد اندازه گیری نیز با توجه به فرمول محاسباتی در
دستورالعمل ICH(Q2)، ۰/۰۵۵۱۰ میکروگرم در میلی لیتر
بدست آمد و سپس نزدیک ترین غلظت به آن (۰/۰۰۶ میکرو گرم
در میلی لیتر) در ماتریکس پلاسمای شفاف بدون پروتئین آماده
سازی و ۳ بار به دستگاه تزریق شد و در آخر نسبت سیگنال به
نویز و تکرارپذیری نتایج بررسی شدند (جدول ۷). انحراف

| جدول ۱. میزان جذب UV آپیکسابان در ماتریکس پلاسماء در غلظت‌های مختلف منحنی کالیبراسیون | | | |
|---|---------|-----------|--------------|
| انحراف معیار نسبی | میانگین | جذب (mAU) | انحراف (ppm) |
| - | - | - | - |
| % ۱/۱۹ | ۳۸۴۶ | ۳۸۵۹ | ۰/۱۲۲۸۸ |
| % ۳/۸ | ۵۰۲۷/۶۶ | ۳۷۹۵ | ۰/۱۲۲۸۸ |
| % ۱/۷۸ | ۶۳۲۰/۳۳ | ۳۸۸۴ | ۰/۱۲۲۸۸ |
| % ۲/۳۷ | ۸۱۸۵/۳۳ | ۵۱۷۲ | ۰/۱۵۳۶ |
| % ۲/۰۶ | ۹۹۷۹/۳۳ | ۴۸۱۱ | ۰/۱۵۳۶ |
| | | ۵۱۰۰ | ۰/۱۵۳۶ |
| | | ۶۳۹۴ | ۰/۱۹۲ |
| | | ۶۱۹۱ | ۰/۱۹۲ |
| | | ۶۳۷۶ | ۰/۱۹۲ |
| | | ۸۱۷۲ | ۰/۲۴ |
| | | ۷۹۹۸ | ۰/۲۴ |
| | | ۸۳۸۶ | ۰/۲۴ |
| | | ۱۰۱۷۶ | ۰/۳ |
| | | ۹۹۹۷ | ۰/۳ |
| | | ۹۷۶۵ | ۰/۳ |

جدول ۲. داده‌های مرتبط با خط رگرسیون

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics

| | |
|-------------------|----------|
| Multiple R | 0.997824 |
| R Square | 0.995653 |
| Adjusted R Square | 0.995343 |
| Standard Error | 188.2353 |
| Observations | 16 |

ANOVA

| | df | SS | MS | F | Significance F |
|------------|----|----------|----------|----------|----------------|
| Regression | 1 | 1/14E+08 | 1/14E+08 | 3206/775 | 6/15E-18 |
| Residual | 14 | 496055/4 | 35432/53 | | |
| Total | 15 | 1/14E+08 | | | |

| | Coefficients | Standard Error | t Stat | P-value | Lower 95% | Upper 95% | Upper 95.0% |
|--------------|--------------|----------------|----------|----------|-----------|-----------|-------------|
| Intercept | -204/009 | 123/382 | -1/65348 | 0/120473 | -468/637 | 60/61867 | 60/61867 |
| X Variable 1 | 34157/06 | 603/1791 | 56/62839 | 6/15E-18 | 32863/37 | 35450/76 | 35450/76 |

جدول ۳. داده‌های تکرارپذیری و صحت روش

| غلظت (ppm) | جذب (mAU) | جذب | میانگین خطای نسبی در روز | میانگین خطای نسبی در استاندارد | میانگین خطای نسبی میار | انحراف میار نسبی هر غلظت | انحراف میار نسبی در روز |
|------------|-----------|-----------|--------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| +٠/٠١٩٩٩ | -٠/٠٢٣٩٩ | % ٢/١٣ | ٥١٣٠ | ٥٠٢٠ | ٥١٣٢ | ٥١٣٨ | ٥٠٢٠ |
| +٠/٠٥١٠٣ | +٠/٠٦٩ | % ٤٨/٠٧ | ٦٩٧٦ | ٦٩٤٢ | ٦٩٤٢ | ٦٩٧٦ | ٦٩٤٢ |
| +٠/٠٣٢٩٢ | +٠/٠٢٠٤ | % ١٧٥/٥٥٩ | ٨٦١٦/٣٣٣ | ٨٦٣٨ | ٨٦٣٨ | ٨٦١٦/٣٣٣ | ٨٦٣٨ |
| | | | | | | | ٨٧٨٠ |

جدول ٤. بررسی تکرارپذیری نتایج در دو روز مختلف

| غلظت (ppm) | میانگین جذب انحراف میار نسبی میانگین خطای نسبی در هر غلظت میانگین خطای نسبی در روز | ٪ ٢/٣٤ | ٥٠٦٠/٣٣٣٣٣ | ٠/١٦ |
|-------------|--|--------|-------------|------|
| - ٠/٠٣٦٧٣٧٨ | | | | |
| +٠/٠١٨٠٠٢٥ | +٠/٠٥٥٧٣٩١ | ٪ ١/٦٨ | ٧٠٠٨/١٦٦٦٦٧ | ٠/٢ |
| +٠/٠٣٥٠٠٦٢ | | ٪ ١/٥٧ | ٨٦٣٤/١٦٦٦٦٧ | ٠/٢٥ |

جدول ٥. نتایج مربوط به درصد بازیابی (recovery) روش استخراج

| غلظت (ppm) | جذب نمونه مورد مطالعه (mAU) | جذب نمونه استاندارد (mAU) | میانگین جذب نمونه مورد مطالعه | میانگین جذب نمونه با استاندارد | درصد بازیابی |
|------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------|
| | ٢٩١٨٨ | ٢٢٥٤٣ | | | ٠/٥٦ |
| ٧٨/٧٣٪. | ٣٠٤٩٤/٣٣ | ٢٤٠٠٧/٣٣ | ٣١٩٦٨ | ٢٤٣٦٧ | ٠/٥٦ |
| | ٣٠٣٢٧ | ٢٤١١٢ | | | ٠/٥٦ |

جدول ٦ - بررسی توانمندی روش توسعه یافته با تغییر در سرعت جریان

| غلظت (ppm) | جذب نمونه استاندارد با سرعت جریان ١ میلی لیتر در دقیقه (mAU) | جذب نمونه مورد مطالعه با سرعت جریان ٠/٨ میلی لیتر در دقیقه (mAU) | میانگین جذب نمونه مورد مطالعه (mAU) | میانگین جذب نمونه با استاندارد (mAU) | درصد تغییر |
|------------|--|--|-------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| | ٢٩١٨٨ | ٢٢٥٤٣ | | | ٠/٥٦ |
| +٥/٨٪. | ٣٢٢٧٨/٣٣ | ٣٠٤٩٤/٣٣ | ٣٢٥٣٥ | ٣١٩٦٨ | ٠/٥٦ |
| | ٣٢٢٥٦ | ٣٠٣٢٧ | | | ٠/٥٦ |

جدول ٧. نتایج حاصل از ٣ بار تزریق غلظت ٠/٠٦ میکرو گرم در میلی لیتر داروی آپیکسابان در پلاسمما، جهت تعیین حد اندازه گیری.

| غلظت (ppm) | جذب (Mau) | انحراف میار نسبی |
|------------|-----------|------------------|
| | ١٦٤٢ | |
| ٢/٥٪. | ١٧٢٥ | ١٧٢٥ |
| | ١٦٧٢ | ١٦٧٢ |

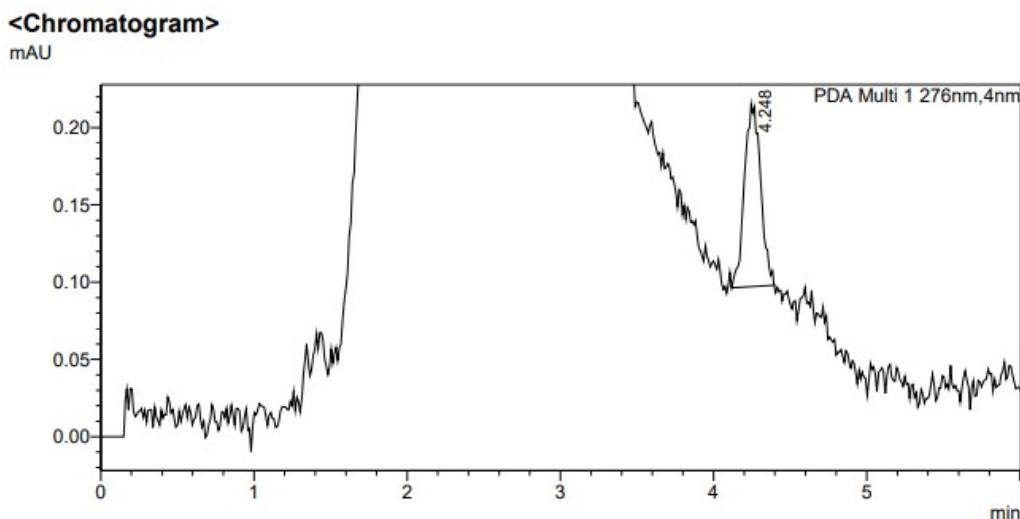
بحث

آپیکسابان یکی از داروهای ضد انعقاد خوارکی است که در سال‌های اخیر برای مدیریت بیماری‌های ترومبوامبوليک،

استاندارد نسبی ٢/٥ درصد، نشان دهنده تکرارپذیر بودن نتایج

در این غلظت است. بنابراین غلظت ٠/٠٦ میکرو گرم در میلی

لیتر به عنوان حد اندازه گیری این روش شناخته شد.



شکل ۴. کروماتوگرام مربوط به تزریق نمونه ۰/۰۲ میکروگرم در میلی لیتر آپیکسابان در پلاسمما جهت تعیین حد تشخیص

در روش ایزوکراتیک ارائه شده جداسازی با استفاده از ستون C₁₈ به طول ۲۵ سانتی متر، قطر ۴/۶ میلی متر و اندازه ذرهای ۵ میکرون با فاز متحرک که شامل ترکیب بافر آبی آمونیوم استات ۱۵٪ و استونیتریل با درصد حجمی ۵٪:۵٪:۰٪ است. pH ۷/۶ م محلول بافر با شناساگر ماوراء بنفس، انجام شده است. آمونیوم هیدروکساید رقیق شده در محدوده ۰/۰۵ ± ۰/۰۵ م میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. در بررسی صحت و دقت، درصد انحراف معیار نسبی به ترتیب ۰/۰۲ و ۱/۶ بود که نشان دهنده مناسب بودن این روش است. در یک بررسی کلی، نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که روش آنالیز ارائه شده در این تحقیق، روشی قابل اعتماد برای تعیین مقدار آپیکسابان در پلاسمای انسان است.

قدرتانی و تشکر

بدین وسیله از سرکار خانم فرشته مظاہری کارشناس مرکز تحقیقات علوم دارویی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

توجه زیادی به آنها شده است (۹). بیشترین جذب آپیکسابان در روده کوچک رخ داده و فراهمی زیستی مطلق دارو در دوزهای خوراکی تا ۱۰ میلی گرمی، تقریباً پنجاه درصد است. از مزایای آن می‌توان به فارماکوکنیتیک مشخص و تداخل پایین با سایر داروها اشاره کرد که نیاز آن را به پایش‌های آزمایشگاهی نسبت به داروهای ضد انقاد آنتاگونیست و بتامین K، کمتر می‌کند (۱۰). اما از سوی دیگر، همه داروهای ضد انعقادی که در کاهش ریسک ترومبوز استفاده می‌شوند، در مواردی اعم از مصرف بیش از حد دارو، نارسایی کلیه و کبد و تداخلات دارویی، خطر ایجاد خون ریزی داخلی را دارند. بنابراین بررسی و پایش غلظت پلاسمایی این دارو ها در بیمار، کمک بزرگی به مدیریت بیماری و عدم ایجاد عوارض جانبی می‌کند (۱۶).

روش آنالیز آپیکسابان با استفاده از HPLC در فارماکوپه‌های معتبر بین المللی مانند BP و USP گزارش نشده و روش‌های ارائه شده در مقالات، محدودیت‌هایی مانند استفاده از طیف سنج جرمی و یا عدم بررسی و تعیین مقدار ماده موثر در پلاسمای انسانی را داشتند. به همین دلیل، این تحقیق به منظور بررسی، یافتن و طراحی روشی ساده، دقیق و قابل اعتماد برای اندازه گیری آپیکسابان در ماتریکس پلاسمای انسانی انجام شد و با توجه به دستورالعمل ICH، پارامترهای معتبرسازی اعم از انتخابی بودن، دامنه خطی بودن، دقت، صحت، حد تشخیص و حد اندازه گیری مورد بررسی قرار گرفتند.

REFERENCES

1. Verheugt FW, Granger CB. Oral anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: current status, special situations, and unmet needs. *Lancet* 2015;386:303-10.
2. Di Minno A, Frigerio B, Spadarella G, Ravani A, Sansaro D, Amato M, et al. Old and new oral anticoagulants: food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Rev* 2017;31:193-203.
3. Garbayo JLM, Castelló IP, Soler MTF, Ribis MP. Hospital admissions for bleeding events associated with treatment with apixaban, dabigatran and rivaroxaban. *Eur J Hosp Pharm* 2019;26:106-12.
4. Heidbuchel H, Vrijens B. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants (NOAC): considerations on once-vs. twice-daily regimens and their potential impact on medication adherence. *Europace* 2015;17:1317-8.
5. Rodriguez R, Carrier M, Wells P. Non-adherence to new oral anticoagulants: a reason for concern during long-term anticoagulation? *J Thromb Haemost* 2013;11:390-94.
6. Steffel J, Verhamme P, Potpara TS, Albaladejo P, Antz M, Desteghe L, et al. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2018;39:1330-93.
7. Ten Cate H. New oral anticoagulants: discussion on monitoring and adherence should start now! *Thromb J* 2013;11:8.
8. Haque A, Soundharya R, Venu J, Monika ML, Bakshi V. Method development and validation of apixaban using RP-HPLC method and its stress stability studies. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis* 2017;5.
9. Byon W, Garonzik S, Boyd RA, Frost CE. Apixaban: a clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clin Pharmacokinet* 2019;58:1265-79.
10. Vakkalagadda B, Frost C, Byon W, Boyd RA, Wang J, Zhang D, et al. Effect of rifampin on the pharmacokinetics of apixaban, an oral direct inhibitor of factor Xa. *Am J Cardiovasc Drugs* 2016;16:119-27.
11. Frost C, Wang J, Nepal S, Schuster A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, et al. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: Single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(2):476-87.
12. Frost C, Nepal S, Wang J, Schuster A, Byon W, Boyd RA, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of apixaban, a factor Xa inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2013;76:776-86.
13. Frost C, Shenker A, Jhee S, Yu Z, Wang J, Bragat A, et al. Evaluation of the single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban in healthy Japanese and Caucasian subjects. *Clin Pharmacol* 2018;10:153-63.
14. Parys W, Dołowy M, Pyka-Pająk A. Significance of chromatographic techniques in pharmaceutical analysis. *Processes* 2022;10:172.
15. Kazakevich YV, Lobrutto R, eds. HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, New Jersey, United States: John Wiley & Sons; 2007.
16. Dzudovic J, Sakac MC, Antunovic M, Repic A, Obradovic S, Djordjevic S, Savic J, Dzudovic B. Development and validation of LC-MS/MS method for determination of plasma apixaban. *Acta Chromatographica* 2021;34:332-37.
17. Lagoutte-Renosi J, Le Poupon J, Girard A, Montange D, Davani S. A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2018;1100-1101:43-49.
18. Baig ML, Ali SA. A validated LC-MS/MS method for the estimation of apixaban in human plasma. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2017;7:044-52.
19. Landge SB, Jadhav SA, Dahale SB, Solanki PV, Bembalkar SR, Mathad VT. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method on core shell column for determination of degradation and process related impurities of apixaban—an anticoagulant drug. *American Journal of Analytical Chemistry* 2015;6:539-50.
20. Al-Ani I, Hamad M, Al-Shdefat R, Mansoor K, Glogor F, Dayyish WA. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method of apixaban in commercial dosage forms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2019;12:241-51.
21. Kashid AM, Vidhate MB, Ingale MR. Analytical method development and validation for estimation of apixaban by RP-HPLC. *Indian Drugs* 2017;54:76-79.
22. Akbel E, Bulduk İ, Gökçe S. A green HPLC method for the determination of apixaban in pharmaceutical products: Development and validation. *Reviews in Analytical Chemistry* 2023;42:20230058.