Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 35, No. 2, Summer 2025 ORIGINAL ARTICLE

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

Seyed Mohammad Alavi[1], Amir Beheshti Maal[1], Mohsen Amini[2], Hoda Jahandar[3]
[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, 5µ) 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 µg/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 µg/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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۴، صفحات ۱۵۶ تا ۱۶۵

Original Article

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 دارو های ضد انعقادی خوراکی و مهار کننده مستقیم فاکتور ۱۰ است که جهت کاهش خطر چندین بیماری ترومبوآمبولیک 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 بازیابی آپیکسابان محاسبه شد.*

یافته‌ها: *بررسی آپیکسابان با ستون C18 (250 mm × 4/6 mm, 5µ) و روش ایزوکراتیک با فاز متحرک شامل استونیتریل: بافر آمونیوم استات ۰/۱۵ درصد با pH ۷/۶ ± ۰/۰۵ به نسبت حجمی ۵۰:۵۰ و سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه در دمای اتاق، انجام شد. آپیکسابان در طول موج ۲۷۶ نانومتر شناسایی شد. منحنی کالیبراسیون آپیکسابان در پلاسمای انسانی در محدوده ی ۰/۳ تا ۰/۱۲۲۸۸ میکروگرم در میلی لیتر با ضریب همبستگی r^2 = 0/9957 خطی بود و حداقل غلظت قابل اندازه گیری و تشخیص به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر و میانگین درصد بازیابی روش استخراج دارو از خون ۷۸/۷۳ درصد به دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *روش HPLC-UV توسعه یافته در این مطالعه، برای تعیین دقیق سطوح آپیکسابان در مطالعات فارماکوکینتیک مناسب است.*

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

مقدمه

در گذشته آنتاگونیست‌های ویتامین K گزینه‌های ارجح برای پیشگیری از سکته در فیبریلاسیون دهلیزی بودند. اما در سال‌های اخیر، به علت مزایایی اعم از فارماکولوژی قابل پیش بینی و تداخلات کمتر دارو با غذا و سایر دارو ها، توجه به داروهای ضد انعقاد خوراکی مستقیم، افزایش پیدا کرده است (۱, ۲).

علی‌رغم تمامی مزیت‌های ذکر شده برای داروهای ضد انعقاد خوراکی مستقیم، بررسی‌های فارماکوویژیلانس این داروها موارد زیادی از خونریزی های 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).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، بخش شیمی دارویی، محسن امینی (**email**: moamini@tums.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0003-3135-2917
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۵/۱۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

همچنین از آنجایی که این دارو ها بر خلاف وارفارین الزام به نظارت و آزمایش ندارند و از سوی دیگر بعضی از آنها مانند ریواروکسابان روزی یک بار تجویز می‌شوند، نگرانی در خصوص 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 فیبریلاسیون دهلیزی، فراخوانی جهت توسعه روشی معتبر برای اندازه گیری دقیق غلظت‌های پلاسمایی این دارو ها 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 ترومبوآمبولیک اعم از سکته ناشی از فیبریلاسیون دهلیزی غیر دریچه‌ای، ترومبوز بعد از جراحی زانو و لگن، ترومبوز وریدی عمیق و آمبولی ریه استفاده می-شود. 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 دوز های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵ میلی گرمی، بین ۵۱ تا ۷۱۶ نانوگرم در میلی لیتر گزارش شده است. همچنین حداکثر غلظت پلاسمایی آن تا دوز ۱۰ میلی گرم، متناسب 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 (۱۳-۱۱).

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 کیفی دارو است و در تمامی مراحل پیدایش، توسعه و تولید دارو در صنعت داروسازی از آن استفاده می‌شود. (۵، ۱۴، ۱۵).

به منظور شناسایی و اندازه گیری آپیکسابان، روش‌های مختلفی، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ارائه 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 ناخالصی ها و پایداری دارو (۸، ۱۹) 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 دتکتور UV به منظور اندازه گیری غلظت آپیکسابان در نمونه های 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 اچ متر (SANA)، ستون کروماتوگرافی BRISA C18 5 250*4/6 (Teknokroma) به همراه محافظ (guard) مربوطه، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (Shimadzu LC-10 Series)، ست فیلتراسیون خلا (MILLIPORE)، سانتریفیوز (ROTOFIX 32 A)، فیلتر ممبران ۰/۲۲ میکرونی کوبتر، فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ استریل PTFE، لوله فالکون ۱۵ سی سی استریل اس پی ال، سرنگ ۳ سی سی، سر سمپلر آبی و زرد، میکروتیوب (اپندورف) ۱/۵ سی سی پلی پروپیلنی، حمام التراسونیک، لوله های خونگیری غیر وکیوم K_2EDTA دار شرکت فرتست، وورتکس میکسر و اسپکتروفوتومتر (RIGOL Ultra-3660)

طراحی 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

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

تهیه پلاسما از نمونه خونی

نمونه های خونی به لوله‌های خونگیری حاوی k_2EDTA منتقل و سپس بلافاصله برای جداسازی پلاسما، به مدت ۱۵ دقیقه با قدرت چرخش ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. پلاسمای جدا شده در اپندورف‌های پلی پروپیلنی ۱/۵ میلی‌لیتر به چند قسمت تقسیم گردیده و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز شدند.

ذوب کردن پلاسما

نمونه‌های پلاسما مورد استفاده در روز آزمایش، از فریزر بیرون آورده شده و بلافاصله 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 پلاسما و آماده سازی نمونه برای تزریق با استفاده از روش رسوب دادن پروتئین انجام شد، به هر واحد حجم از پلاسما 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 ۱۵۰۰ g 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 ضریب رقت ۰/۸، غلظت های ۰/۳، ۰/۲۴، ۰/۱۹۲، ۰/۱۵۳۶ و ۰/۱۲۲۸۸ 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، متابولیت‌ها 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 پلاسما بدون دارو به عنوان نمونه منفی به دستگاه تزریق شد و کروماتوگرام آن با کروماتوگرام نمونه ی حاوی پلاسما و دارو به عنوان نمونه مثبت مقایسه شد.

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 µg/ml ۰/۳، ۰/۲۴، ۰/۱۹۲، ۰/۱۵۳۶، ۰/۱۲۲۸۸ 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 ICH(Q2) 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.

فرمول محاسبه ی حد تشخیص: $\frac{3.3\sigma}{S}$

در آن σ 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 ICH(Q2)، محاسبه شد و سپس نزدیک ترین غلظت به آن در ماتریکس پلاسما ی شفاف بدون پروتئین آماده سازی و ۳ بار به دستگاه تزریق شد و در آخر نسبت سیگنال به نویز و تکرارپذیری نتایج بررسی شدند.

فرمول محاسبه ی حد کمی (اندازه گیری): $\frac{10\sigma}{S}$

در آن σ انحراف معیار استاندارد و S شیب خط منحنی کالیبراسیون میباشد.

بررسی صحت

بر اساس رهنمود های ICH، ۳ غلظت که گستره ی مورد نظر را پوشش بدهند شامل ۰/۱۶، ۰/۲ 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 خطای نسبی با استفاده از فرمول زیر بررسی شد.

$$\text{خطای نسبی} = \frac{\text{سطح زیر نمودار نمونه ی استاندارد} - \text{سطح زیر نمودار نمونه بررسی شده}}{\text{سطح زیر نمودار ی نمونه ی استاندارد}}$$

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

بررسی دقت

بر اساس رهنمودهای ICH، ۳ غلظت از داروی آپیکسابان که گستره مورد نظر را پوشش بدهند (۰/۱۶، ۰/۲ 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، ۰/۲ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر، دوباره در روز دیگر هر کدام ۳ بار به دستگاه تزریق شدند، سپس مقدار انحراف معیار نسبی داده های 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 پلاسما 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.

$$\text{درصد بازیابی} = \frac{\text{سطح زیر نمودار نمونه بررسی شده}}{\text{سطح زیر نمودار ی نمونه ی اسپایک شده}}$$

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 حلالیت بسیار کمی دارد، اما در استونیتریل تقریباً و در متانول کاملا 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. به جهت کاهش زمان بازدارندگی و جلوگیری از پهن 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 × 250 mm C18 Brisa LC2 (mm, 5µ انتخاب شد. جهت بهینه سازی شرایط، نسبت‌های مختلفی از آب و استونیتریل مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا زمانی که فاز متحرک، مخلوطی از آب و استونیتریل و آب و متانول بود، در کروماتوگرام حاصل کمی کشیدگی مشاهده شد و نتایج کروماتوگرام‌ها قابل قبول نبود. جهت بهبود نتایج، ترکیب مختلف نمک‌ها برای تهیه بافر استفاده شد و در نهایت بافر آمونیوم استات ۰/۱۵ درصد، که pH آن با آمونیوم هیدروکساید رقیق شده، در محدوده ۰/۰۵ ± ۷/۶ تنظیم شده بود، انتخاب شد. فاز متحرک شامل مخلوطی از استونیتریل: بافر آمونیوم استات ۰/۱۵ درصد با pH ۰/۰۵ ± 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 توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اسکن 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 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 و شکل ۲ کروماتوگرام حاصل از آنالیز نمونه پلاسمای حاوی آپیکسابان را نشان می‌دهد.

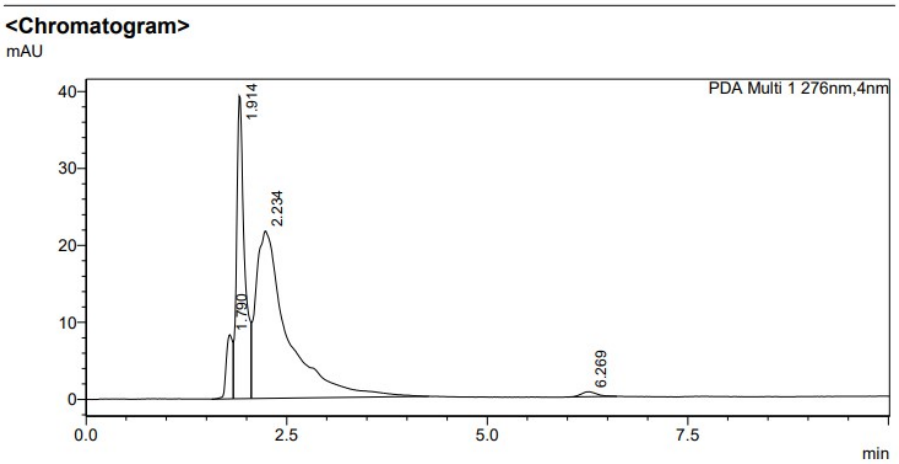
خطی بودن و نمودار کالیبراسیون

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.

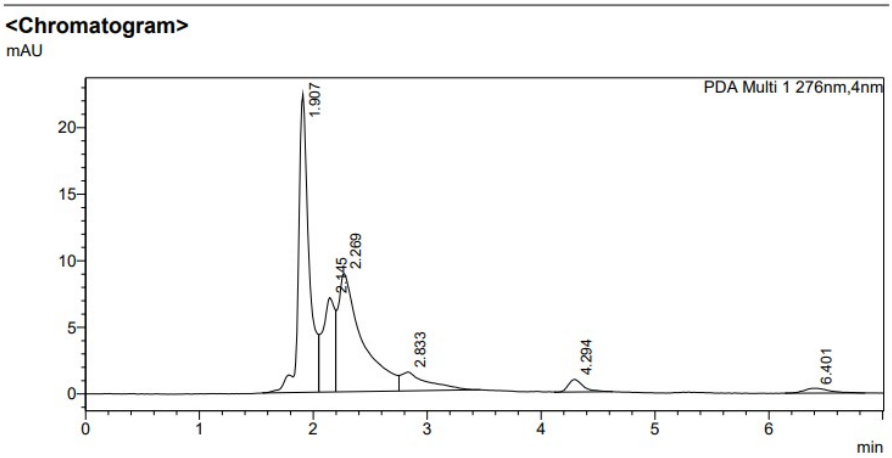
بررسی تکرار پذیری (دقت) و صحت روش

بر اساس رهنمودهای ICH، سه غلظت ۰/۱۶، ۰/۲ و ۰/۲۵، که نماینده سه نقطه حد پایین، وسط و بالای گستره مورد

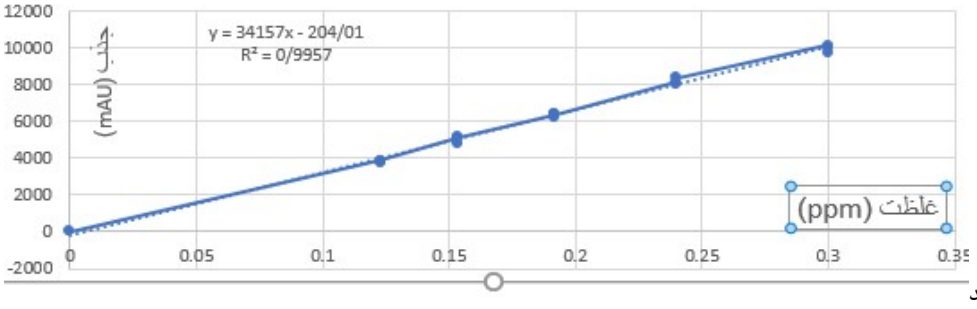
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]



شکل ۱. کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه ی پلاسمای فاقد آپیکسابان.



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



باشد

شکل ۳. منحنی استاندارد آپیکسابان در پلاسما شفاف بدون پروتئین.

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.

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

جدول ۱. میزان جذب UV آپیکسابان در ماتریکس پلاسما در غلظت‌های مختلف منحنی کالیبراسیون

غلظت (ppm)	جذب (mAU)	میانگین	انحراف معیار نسبی
۰	۰	۰	-
۰/۱۲۲۸۸	۳۸۵۹		
۰/۱۲۲۸۸	۳۷۹۵	۳۸۴۶	٪ ۱/۱۹
۰/۱۲۲۸۸	۳۸۸۴		
۰/۱۵۳۶	۵۱۷۲		
۰/۱۵۳۶	۴۸۱۱	۵۰۲۷/۶۶	٪ ۳/۸
۰/۱۵۳۶	۵۱۰۰		
۰/۱۹۲	۶۳۹۴		
۰/۱۹۲	۶۱۹۱	۶۳۲۰/۳۳	٪ ۱/۷۸
۰/۱۹۲	۶۳۷۶		
۰/۲۴	۸۱۷۲		
۰/۲۴	۷۹۹۸	۸۱۸۵/۳۳	٪ ۲/۳۷
۰/۲۴	۸۳۸۶		
۰/۳	۱۰۱۷۶		
۰/۳	۹۹۹۷	۹۹۷۹/۳۳	٪ ۲/۰۶
۰/۳	۹۷۶۵		

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 (۰/۰۲ 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 (۰/۰۶ میکرو گرم در میلی لیتر) در ماتریکس پلاسما ی 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 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

جدول ۳. داده‌های تکرارپذیری و صحت روش

غلظت (ppm)	جذب (mAU)	میانگین جذب	انحراف استاندارد	انحراف معیار نسبی	میانگین انحراف معیار نسبی	میانگین خطای نسبی در هر غلظت	میانگین خطای نسبی در روز
۰/۱۶	۵۰۲۰	۵۱۳۰	۱۰۹/۰۱۳۸	٪ ۲/۱۳	٪ ۱/۶۲	-۰/۰۲۳۹۹	+۰/۰۱۹۹۹
۰/۱۶	۵۱۳۲						
۰/۱۶	۵۲۳۸						
۰/۲	۶۹۴۲	۶۹۷۶	۴۸/۰۷	٪ ۰/۶۹		+۰/۰۵۱۰۳	
۰/۲	۷۰۳۱						
۰/۲	۶۹۵۵						
۰/۲۵	۸۴۳۱						
۰/۲۵	۸۶۳۸	۸۶۱۶/۳۳۳	۱۷۵/۵۰۵۹	٪ ۲/۰۴		+۰/۰۳۲۹۲	
۰/۲۵	۸۷۸۰						

جدول ۴. بررسی تکرارپذیری نتایج در دو روز متفاوت

غلظت (ppm)	میانگین جذب	انحراف معیار نسبی	میانگین انحراف معیار نسبی	میانگین خطای نسبی در هر غلظت	میانگین خطای نسبی در روز
۰/۱۶	۵۰۶۰/۳۳۳۳۳۳	٪ ۲/۳۴	٪ ۱/۶۸	- ۰/۰۳۶۷۳۷۸	+۰/۰۱۸۰۰۲۵
۰/۲	۷۰۰۸/۱۶۶۶۶۷	٪ ۱/۱۳		+ ۰/۰۵۵۷۳۹۱	
۰/۲۵	۸۶۳۴/۱۶۶۶۶۷	٪ ۱/۵۷		+ ۰/۰۳۵۰۰۶۲	

جدول ۵. 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 استاندارد	درصد بازیابی
۰/۵۶	۲۳۵۴۳	۲۹۱۸۸	۲۴۰۰۷/۳۳	۳۰۴۹۴/۳۳	٪۷۸/۷۳
۰/۵۶	۲۴۳۶۷	۳۱۹۶۸			
۰/۵۶	۲۴۱۱۲	۳۰۳۲۷			

جدول ۶ – بررسی توانمندی روش توسعه یافته با تغییر در سرعت جریان

غلظت (ppm)	جذب نمونه استاندارد با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه (mAU)	جذب نمونه مورد مطالعه با سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه (mAU)	میانگین جذب نمونه استاندارد (mAU)	میانگین جذب نمونه مورد مطالعه (mAU)	میانگین درصد تغییر
۰/۵۶	۲۹۱۸۸	۳۲۰۴۴	۳۰۴۹۴/۳۳	۳۲۲۷۸/۳۳	+٪۵/۸
۰/۵۶	۳۱۹۶۸	۳۲۵۳۵			
۰/۵۶	۳۰۳۲۷	۳۲۲۵۶			

جدول ۷. نتایج حاصل از ۳ بار تزریق غلظت ۰/۰۶ میکرو گرم در میلی لیتر داروی آپیکسابان در پلاسما، جهت تعیین حد اندازه گیری.

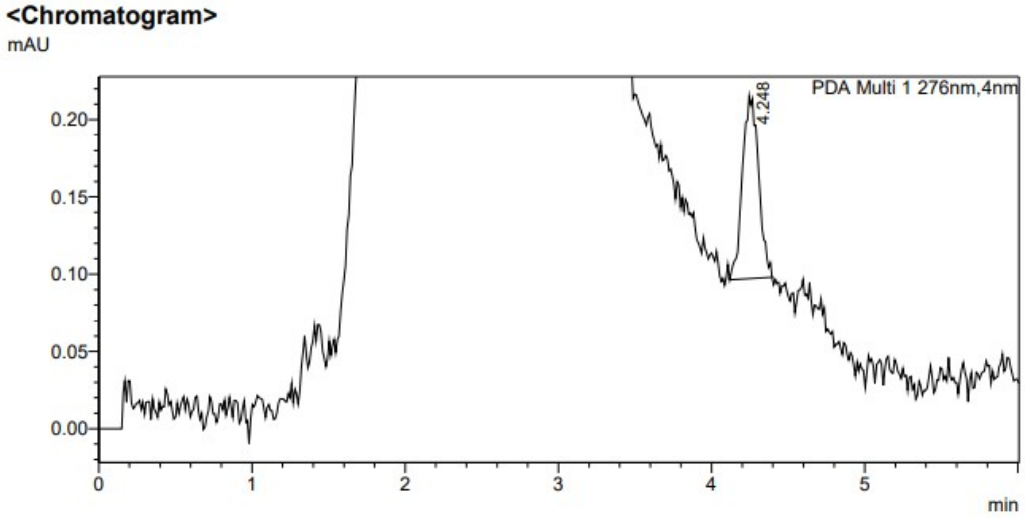
غلظت (ppm)	جذب (Mau)	انحراف معیار نسبی
۰/۰۶	۱۶۴۲	٪۲/۵
۰/۰۶	۱۷۲۵	
۰/۰۶	۱۶۷۲	

استاندارد نسبی ۲/۵ درصد، نشان دهنده تکرارپذیر بودن نتایج در این غلظت است. بنابراین غلظت ۰/۰۶ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان حد اندازه گیری این روش شناخته شد.

بحث

آپیکسابان یکی از داروهای ضد انعقاد خوراکی است که در سال‌های اخیر برای مدیریت بیماری‌های ترومبوآمبولیک،

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]



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

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 فارماکوکینتیک مشخص و تداخل پایین با سایر داروها اشاره کرد که نیاز آن را به پایش‌های آزمایشگاهی نسبت به داروهای ضد انعقاد آنتاگونیست ویتامین 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 موثره 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

در روش ایزوکراتیک ارائه شده جداسازی با استفاده از ستون C_{18} 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 ٪ ۰/۱۵ و استونیتریل با درصد حجمی ۵۰:۵۰ و شناساگر ماوراء بنفش، انجام شده است. pH محلول بافر با آمونیوم هیدروکساید رقیق شده در محدوده ۰/۰۵ ± ۷/۶ تنظیم شده است. سرعت جریان فاز متحرک در روش ایزوکراتیک مطرح شده ۱ میلی لیتر بر دقیقه انتخاب شد. حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بوده و آنالیز در دمای محیط انجام شد. زمان بازداری آپیکسابان حدود ۴/۴ دقیقه و زمان اجرایی هر تزریق نیز ۷ دقیقه بود. حداقل غلظت قابل اندازه گیری و حداقل غلظت قابل تشخیص روش، به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۰۲ 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.

قدردانی و تشکر

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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]

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 X a 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 X a 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 Analyt 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-06-26]