

Xây dựng quy trình định lượng apixaban trong viên nén bao phim bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao

Võ Sỹ Nhật*, Phan Nguyễn Thu Xuân
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Apixaban (APX) là hoạt chất chống đông máu chọn lọc yếu tố Xa, được sử dụng phổ biến trong điều trị và phòng ngừa huyết khối. Tuy nhiên, hiện chưa có tiêu chuẩn Dược điển chính thức cho dạng viên nén bao phim chứa APX, trong khi một số phương pháp định lượng trước đây sử dụng acetonitril - dung môi có chi phí cao và độc tính cao hơn methanol. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng APX trong viên nén bao phim bằng phương pháp HPLC, đáp ứng đầy đủ các chỉ tiêu thẩm định phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ASEAN. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu nghiên cứu là chế phẩm viên nén bao phim chứa APX. Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp đầu dò PDA với pha động methanol - nước (60:40), bước sóng phát hiện 277 nm. Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ASEAN gồm: Tính đặc hiệu, tuyến tính, độ đúng, độ chính xác và độ lặp lại. **Kết quả:** Quy trình đạt các yêu cầu thẩm định, hệ số tương quan $R^2 = 1.000$, độ lặp lại $RSD = 0.42\%$, tỷ lệ phục hồi trung bình 100.5%. **Kết luận:** Phương pháp HPLC-PDA sử dụng methanol là khả thi, hiệu quả và phù hợp để định lượng APX trong viên nén bao phim.

Từ khóa: apixaban, viên nén bao phim, sắc ký lỏng hiệu năng cao, thẩm định phương pháp

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Eliquis®, tên thương mại của hoạt chất apixaban (APX), là một thuốc chống đông thể hệ mới đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị và dự phòng huyết khối. Với cơ chế ức chế chọn lọc yếu tố Xa, APX mang lại hiệu quả phòng ngừa huyết khối cao, đồng thời hạn chế được nhiều tác dụng phụ nghiêm trọng so với các thuốc chống đông cổ điển như warfarin. Eliquis đã chứng minh được lợi ích lâm sàng vượt trội qua nhiều nghiên cứu lớn, góp phần đáng kể trong việc làm giảm tỷ lệ đột quỵ ở bệnh nhân rung nhĩ không do bệnh van tim và bệnh nhân sau phẫu thuật thay khớp [1].

APX là chất ức chế chọn lọc yếu tố Xa, làm giảm sự hình thành và phát triển huyết khối, đặc biệt trên các bệnh nhân có nguy cơ hoặc tiền sử đột quỵ. So với warfarin, apixaban có hiệu quả tương đương và tỷ lệ chảy máu thấp hơn, đặc biệt là xuất huyết não. Nó có khoảng trị liệu tương đối rộng, không cần theo dõi xét nghiệm thường xuyên để hiệu chỉnh liều. Ngoài ra, thuốc ít gặp tương tác với các thuốc khác và hầu như không cần lưu ý về chế độ ăn như thuốc kháng vitamin K [2].

APX đã được FDA cấp bằng sáng chế và chấp thuận cho sử dụng y tế tại Hoa Kỳ vào năm 2012 [2]. Đến năm 2020, doanh thu Eliquis (APX) của công ty

Pfizer đạt 9.2 tỷ USD, tăng 16% so với năm 2019 [3]. Theo thống kê của ClinCalc DrugStats tại Hoa Kỳ, năm 2021, APX đứng thứ 33 về tần suất xuất hiện trong các đơn thuốc kê toa và có trên 4 triệu bệnh nhân đã và đang sử dụng APX [4].

APX là chất rắn dạng tinh thể, công thức phân tử là $C_{25}H_{25}N_5O_4$, khối lượng phân tử: 459.5 g/mol, cực đại hấp thụ ở bước sóng 281 nm. Hoạt chất có độ tan trong các dung môi như sau: Trong DMF là 3 mg/mL, trong DMSO là 5 mg/mL, và trong hỗn hợp DMSO:PBS (pH 7.2) theo tỷ lệ 1:1 là 0.5 mg/mL [5].

Năm 2019, Hyeon-Cheol Jeong và cộng sự đã xây dựng một phương pháp phân tích để xác định nồng độ APX trong huyết tương bằng phương pháp UPLC-MS/MS. Pha động là amoni format 2.5 mM (pH 3.0) (A) và 100% methanol chứa 0.1% acid formic (B) bằng phương pháp gradient với cột Thermo hypersil GOLD. Phương pháp đã phát triển có thể được sử dụng cho các nghiên cứu dược động học lâm sàng [6].

Năm 2022, Abi Kumar Yadav và cộng sự đã xây dựng phương pháp định lượng APX trong nguyên liệu và dạng bào chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), cột C18 với kích thước hạt 5 μ m và kích thước cột 4.6 mm $\times$ 25 cm. Bước sóng phát

Tác giả liên hệ: Võ Sỹ Nhật

Email: nhatvs@hiu.vn

hiện ở 278 nm, pha động là dung dịch đậm phosphat pH 4.0 và acetonitril (50:50). Phân tích được thực hiện với tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ L và tổng thời gian chạy 8 phút. Kết quả cho thấy hợp chất APX có thời gian lưu 6.01 phút [7].

Năm 2023, Erten Akbel và cộng sự đã phát triển phương pháp định lượng APX trong dạng bào chế bằng phương pháp HPLC. Sử dụng cột Agilent C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm; 5 μ m) với nhiệt độ cột 30°C. Pha động là dung dịch acid trifluoroacetic 0.1% và acetonitril (tỷ lệ 65:35), với tốc độ dòng không đổi là 1.0 mL/min và thể tích tiêm mẫu là 20 μ L. Việc phát hiện được thực hiện ở bước sóng 276 nm. Quy trình định lượng đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [8].

Từ năm 2026, bằng sáng chế đối với APX sẽ chính thức hết hiệu lực, kéo theo dự báo rằng Công ty Pfizer - công ty nắm giữ thuốc phát minh, có thể đối mặt với mức sụt giảm doanh thu lên tới 20 tỷ USD [3]. Việc mất hiệu lực bằng sáng chế sẽ mở ra cơ hội lớn cho các doanh nghiệp dược phẩm trên toàn thế giới, trong đó có Việt Nam, tham gia sản xuất và cung ứng các thuốc generic chứa apixaban. Đây là hoạt chất có hiệu quả điều trị cao và tiềm năng kinh tế lớn, đặc biệt trong bối cảnh nhu cầu phòng ngừa và điều trị huyết khối ngày càng gia tăng. Thị trường thuốc generic tại Việt Nam đang phát triển nhanh, chiếm tỷ trọng lớn trong tiêu thụ thuốc. Thuốc generic được nhà nước khuyến khích phát triển nội địa, giảm phụ thuộc nhập khẩu. Tuy nhiên vẫn còn những thách thức về chất lượng, cạnh tranh giá và niềm tin người tiêu dùng.

Trong quy trình kiểm soát chất lượng dược phẩm, chỉ tiêu định lượng hoạt chất đóng vai trò cốt lõi nhằm bảo đảm tính an toàn, hiệu quả và đồng nhất của sản phẩm lưu hành trên thị trường. Tuy nhiên, hiện nay các Dược điển của các nước tiên tiến trên thế giới chưa có tiêu chuẩn chất lượng viên nén bao phim apixaban. Trong khi đó, một số nghiên cứu trước đây về định lượng apixaban chủ yếu sử dụng phương pháp HPLC với dung môi pha động là acetonitril - một dung môi có chi phí cao và độc tính đáng kể, gây lãng phí trong sản xuất cũng như yêu cầu an toàn phòng thí nghiệm [6 - 8].

Bài báo với mục tiêu xây dựng quy trình phân tích có độ chính xác và độ đúng cao, đồng thời hướng đến việc sử dụng methanol - dung môi có độc tính

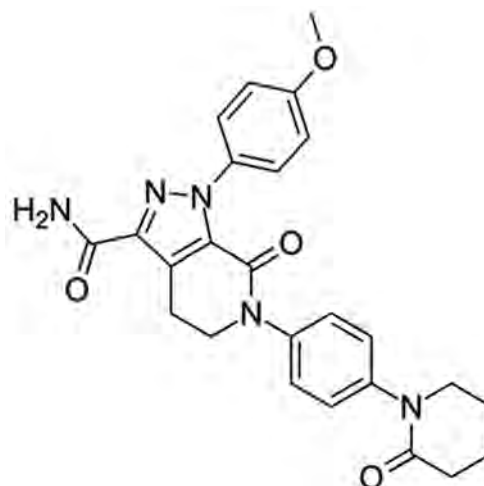
thấp hơn và dễ mua với giá thành thấp hơn so với acetonitril - nhằm tối ưu hóa chi phí. Phương pháp phân tích lựa chọn là HPLC-PDA (sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp đầu dò dây diod quang), một kỹ thuật được chấp nhận rộng rãi trong các Dược điển quốc tế nhờ khả năng cung cấp độ nhạy, độ chọn lọc và độ tin cậy cao, phù hợp với yêu cầu kiểm nghiệm dược phẩm hiện đại.

Việc xây dựng và thẩm định quy trình định lượng apixaban bằng HPLC-PDA không chỉ có ý nghĩa thực tiễn trong kiểm soát chất lượng thuốc chứa apixaban, mà còn góp phần bổ sung cơ sở khoa học cho việc hoàn thiện tiêu chuẩn chất lượng của viên nén bao phim apixaban trong Dược điển và các tiêu chuẩn cơ sở.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: APX trong viên nén bao phim (VNBP).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của apixaban

Thuốc thành phẩm:

VNBP Eliquis 5 mg, sản xuất tại Mỹ, do Công ty TNHH Pfizer (Việt Nam) phân phối. Lõi viên: Lactose khan, cellulose vi tinh thể, natri croscarmellose, natri lauryl sulfat, magnesi stearat. Vỏ bao phim: Lactose monohydrat, hypromellose, titan dioxid, triacetin và oxid sắt đỏ.

VNBP Eliquis 2.5 mg, sản xuất tại Ireland, do Công ty TNHH Pfizer (Việt Nam) phân phối. Lõi viên: Lactose khan, cellulose vi tinh thể, natri croscarmellose, natri lauryl sulfat, magnesi stearat.

Vỏ bao phim: Lactose monohydrat, hypromellose, titan dioxid, triacetin và oxid sắt vàng

Chất đối chiếu: Apixaban, số lô QT434 0324, hàm

lượng 99.9% tính trên nguyên trạng, do Viện kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

Dung môi hóa chất: Methanol HPLC, số lô I1351707 426, do công ty Merck sản xuất

Thiết bị nghiên cứu:

Máy HPLC-PDA, Prominence-i LC-2030, Shimadzu.
Cột sắc ký C18 (250 x 4.6 mm; 5 m), Shimadzu.

Cân phân tích MS205 (d = 0.01 mg), Mettler Toledo.

Bể siêu âm Elma. Vial, đầu lọc mẫu 0.45 m, ống tiêm và các dụng cụ thủy tinh thông thường.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký phù hợp

Bằng cách thay đổi các điều kiện sắc ký nhằm đảm bảo quy trình phân tích được thực hiện nhanh chóng, có hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết phù hợp. Các điều kiện sắc ký được khảo sát bao gồm: Tốc độ dòng, tỷ lệ pha động, nhiệt độ cột.

Tiêu chí lựa chọn điều kiện sắc ký:

Hệ số đối xứng: 0.8 - 1.5 [9].

Pic apixaban phải tinh khiết, tức là: Similarity = 0.99999.
Thời gian lưu (t_R) ngắn.

2.2.2. Thẩm định quy trình định lượng (theo hướng dẫn của ASEAN)

Tính tương thích hệ thống.

Tính đặc hiệu.

Tính tuyến tính.

Độ đúng.

Độ chính xác (độ lặp lại và độ chính xác trung gian) [10].

2.2.3. Ứng dụng quy trình đã thẩm định để định lượng APX trong chế phẩm Eliquis

Tính toán kết quả

Hàm lượng APX có trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$X\% = \frac{S_t}{S_c} \times m_c \times \frac{HLNT}{100} \times \frac{DPL_t}{DPL_c} \times \frac{m_{TB}}{m_t} \times \frac{100}{HLN}$$

Trong đó

X%: Hàm lượng APX thực có trong mẫu so với hàm lượng nhãn.

S_t ; S_c : Diện tích pic APX trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn.

m_t ; m_c : Khối lượng cân của mẫu chuẩn và mẫu thử (mg).

HLNT: Hàm lượng nguyên trạng của chuẩn APX là 99.9%.

DPL_t ; DPL_c : Độ pha loãng của mẫu thử và mẫu chuẩn.

m_{TB} : Khối lượng trung bình của bột thuốc trong một viên (mg).

HLN: Hàm lượng của APX ghi trên nhãn (mg).

2.2.4. Các quy trình xử lý mẫu

Lựa chọn bước sóng phát hiện: Cân chính xác khoảng 48.0 mg APX cho vào bình định mức 50 mL, thêm 30 mL dung môi pha động và siêu âm trong 10 phút. Bổ sung dung môi đến vạch, đậy kín và lắc đều. Lấy chính xác 5.0 mL dung dịch thu được, chuyển vào bình định mức 50 mL khác, thêm dung môi pha động đến vạch, lắc đều và lọc qua màng lọc 0.45 μ m.

Tính tương thích hệ thống: Chuẩn bị dung dịch theo cùng quy trình như trên: Cân 48.0 mg APX, hòa tan trong dung môi pha động, siêu âm, định mức đủ thể tích, sau đó pha loãng 5.0 mL dung dịch gốc thành 50 mL, lắc đều và lọc qua màng lọc 0.45 μ m.

Tính đặc hiệu: Mẫu trắng: Trộn 6 mL methanol với 4 mL nước, lọc qua màng lọc 0.45 μ m. Mẫu chuẩn: Chuẩn bị như dung dịch dùng cho mục "tính tương thích hệ thống". Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0.2080 g bột thuốc (tương ứng 5 mg APX), cho vào bình định mức 50 mL, thêm 30 mL dung môi pha động, siêu âm 10 phút. Định mức đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0.45 μ m. Mẫu thử thêm chuẩn: Cân khoảng 0.2072 g bột thuốc (tương ứng 5 mg APX) cùng 5.0 mg chất chuẩn APX, xử lý theo quy trình tương tự mẫu thử, sau đó lọc qua màng 0.45 μ m.

Tính tuyến tính: Chuẩn bị dung dịch gốc APX (48.0 mg trong bình định mức 50 mL, hòa tan bằng dung môi pha động, siêu âm và định mức đến vạch). Từ dung dịch này, lấy lần lượt 4.0; 4.5; 5.0; 5.5 và 6.0 mL, mỗi thể tích cho vào bình định mức 50 mL, thêm dung môi pha động đến vạch, lắc đều và lọc qua màng 0.45 μ m.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

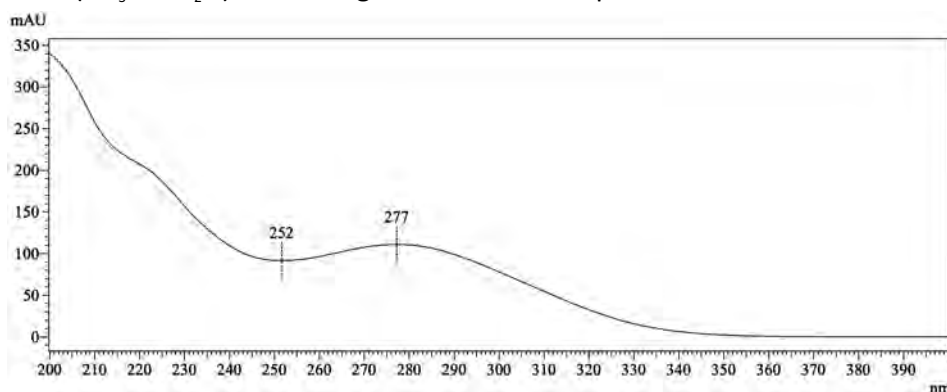
3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Tiến hành: Tiêm mẫu đã chuẩn bị như mục 2.2.4 trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao và quan sát phổ UV để lựa chọn bước sóng phát hiện phù hợp.

Kết quả phổ hấp thụ UV cho thấy APX có cực đại hấp thụ tại 277 nm; do đó, bước sóng này được lựa chọn làm bước sóng phát hiện trong phân tích HPLC. Phân tích được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu Prominence-i LC-2030 với đầu dò PDA, sử dụng cột C18 (250 x 4.6

mm; 5 μ m, Shimadzu). Pha động gồm hỗn hợp methanol và nước ($\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$). Các thông số sắc

ký khác được khảo sát nhằm xác định điều kiện tối ưu cho phân tích APX.



Hình 2. Phổ hấp thụ UV của APX

3.1.2. Khảo sát tìm điều kiện sắc ký phù hợp cho phương pháp định lượng

Tiến hành: Tiêm mẫu đã chuẩn bị như mục 2.2.4 trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao. Bằng cách thay đổi các điều kiện sắc ký: Tỷ lệ pha động, nhiệt độ cột, tốc độ dòng để lựa chọn điều kiện sắc ký phù hợp cho phương pháp định lượng.

Tiêu chí lựa chọn điều kiện sắc ký:

Pic apixaban phải tinh khiết, tức là: Similarity = 0.99999
Thời gian lưu (t_R) ngắn.

Nhận xét: Các điều kiện sắc ký 1,6,7,8,10 có độ tinh khiết pic đạt yêu cầu (Similarity = 0.99999). Tuy nhiên,

ở điều kiện sắc ký số 10 có thời gian lưu ngắn nhất.

Kết luận: Chọn điều kiện sắc ký số 10.

Điều kiện sắc ký hoàn chỉnh:

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu Prominence-i LC-2030, đầu dò PDA.

Cột sắc ký Shimadzu C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m).

Pha động: $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (60:40).

Bước sóng phát hiện: 277 nm.

Tốc độ dòng: $F = 1.0$ mL/min.

Nhiệt độ cột: 25°C.

Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L.

Thời gian phân tích: 10 phút.

Bảng 1. Các điều kiện sắc ký được khảo sát và thông số sắc ký tương ứng

Điều kiện	Tỷ lệ pha động ($\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$)	Nhiệt độ cột (°C)	Tốc độ dòng (mL/min)	Thời gian lưu (phút)	Độ tinh khiết pic (Similarity)
1	50:50	30	1.0	12.87	0.99999
2	60:40	30	1.0	5.88	0.99412
3	70:30	30	1.0	3.87	0.97788
4	60:40	30	1.2	4.96	0.97808
5	60:40	30	0.8	7.30	0.99442
6	50:50	30	0.8	15.83	0.99999
7	50:50	30	1.2	10.83	0.99999
8	40:60	30	1.2	39.79	0.99999
9	60:40	35	1.0	5.55	0.99184
10	60:40	25	1.0	6.20	0.99999

3.1.3. Quy trình xử lý mẫu

Pha dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 50.0 mg APX cho vào bình định mức 50 mL, thêm 30 mL dung môi pha động, siêu âm 10 phút. Thêm pha động đến vạch, đầy nút, lắc đều. Hút chính xác 5.0 mL dung dịch trên cho vào bình định mức 50 mL, thêm pha động đến vạch, đầy nút, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0.45 μ m. Nồng độ dung dịch chuẩn sau khi pha khoảng 0.1 mg/mL.

Pha dung dịch thử: Cân xác định khối lượng của 20 viên. Tính khối lượng trung bình của viên và nghiền

thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột thuốc tương ứng với 5 mg APX cho vào bình định mức 50 mL, thêm 30 mL dung môi pha động, siêu âm 10 phút. Thêm pha động đến vạch, đầy nút, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0.45 μ m.

3.2. Thẩm định quy trình định lượng

3.2.1. Thẩm định tính tương thích hệ thống

Tiến hành: Thực hiện tiêm mẫu 6 lần liên tiếp đối với mẫu chuẩn. Ghi nhận sắc ký đồ và các thông số sắc ký. Tính toán RSD% và đánh giá kết quả.

Bảng 2. Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống của mẫu chuẩn APX

Lần tiêm mẫu	t_R	S	A_s	N
1	6.089	1,576,173	1.110	4650
2	6.089	1,573,012	1.110	4629
3	6.095	1,573,460	1.110	4635
4	6.101	1,573,305	1.110	4623
5	6.112	1,574,548	1.110	4624
6	6.109	1,573,134	1.109	4603
TB	6.099	1,573,939	1.110	4627
RSD (%)	0.16	0.08	0.04	0.33

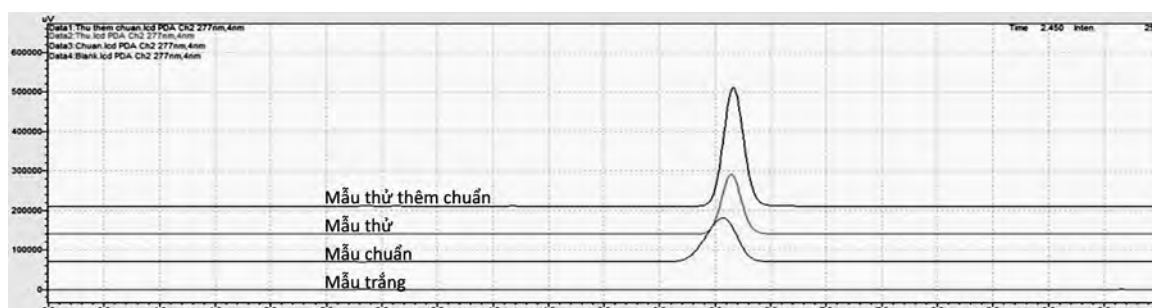
Nhận xét: Độ lệch chuẩn tương đối của các thông số đều nhỏ hơn 2.0 %, cho thấy hệ thống sắc ký lỏng có tính tương thích cao với phương pháp phân tích.

Kết luận: Phương pháp phân tích có tính tương

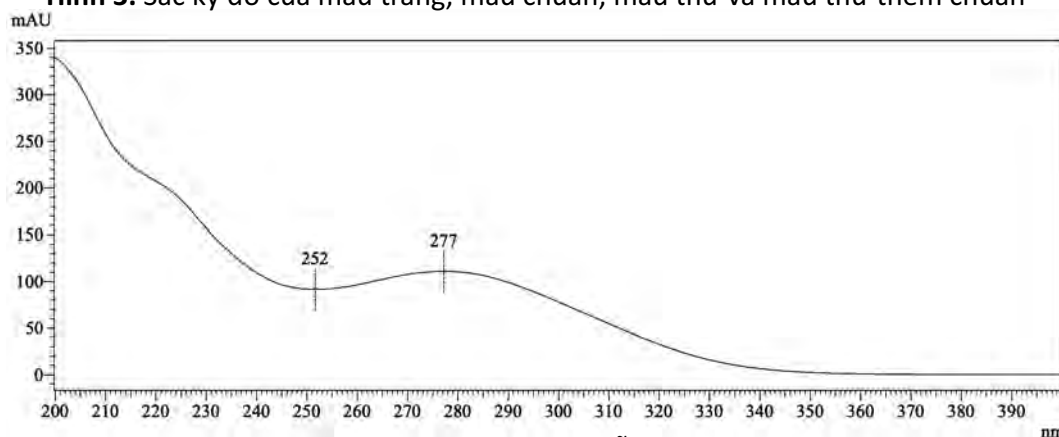
thích hệ thống cao.

3.2.2. Thẩm định tính đặc hiệu

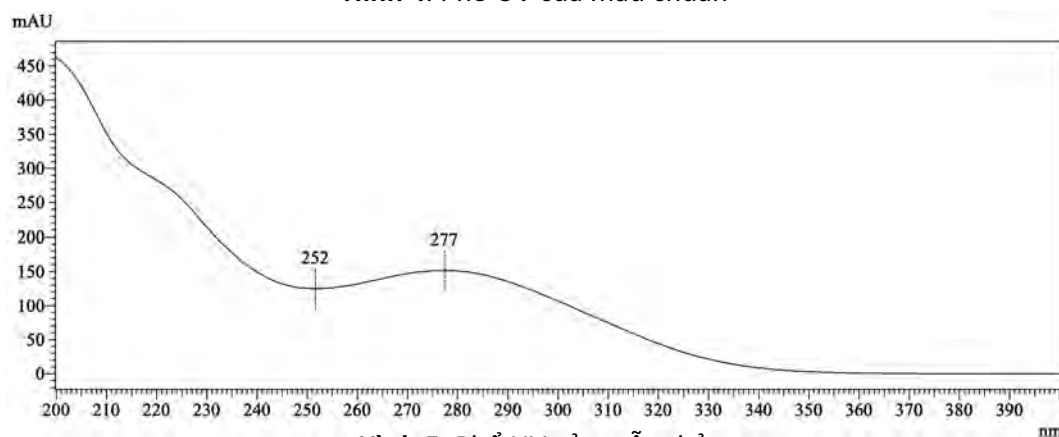
Tiến hành: Thực hiện tiêm mẫu đối với mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Nhận xét kết quả trên sắc ký đồ.



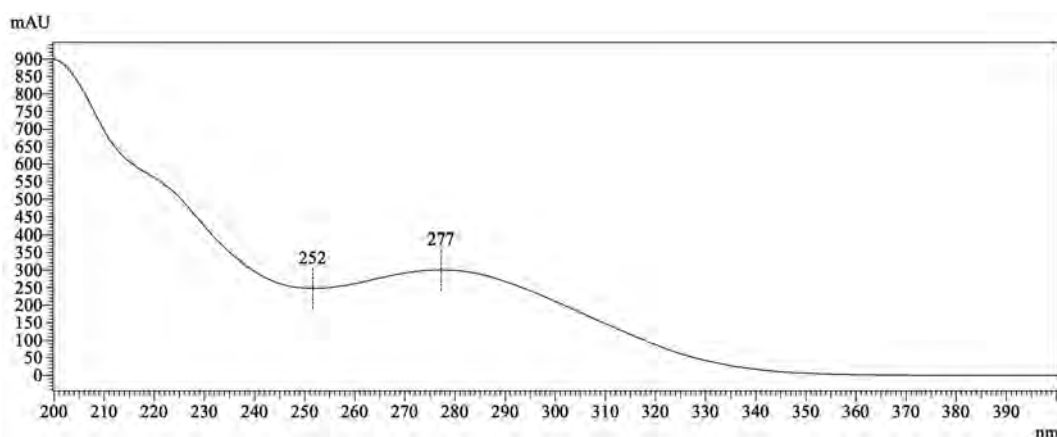
Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn



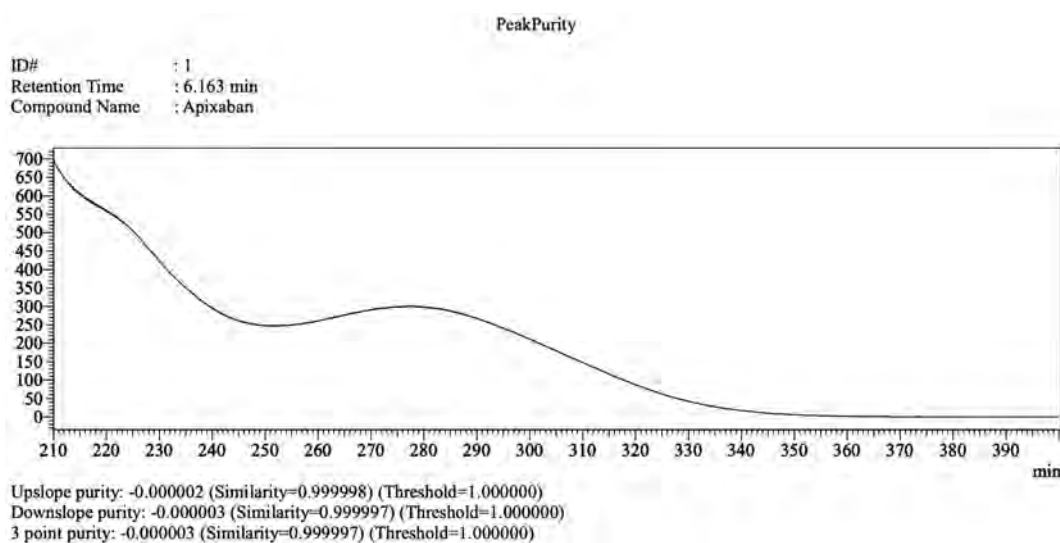
Hình 4. Phổ UV của mẫu chuẩn



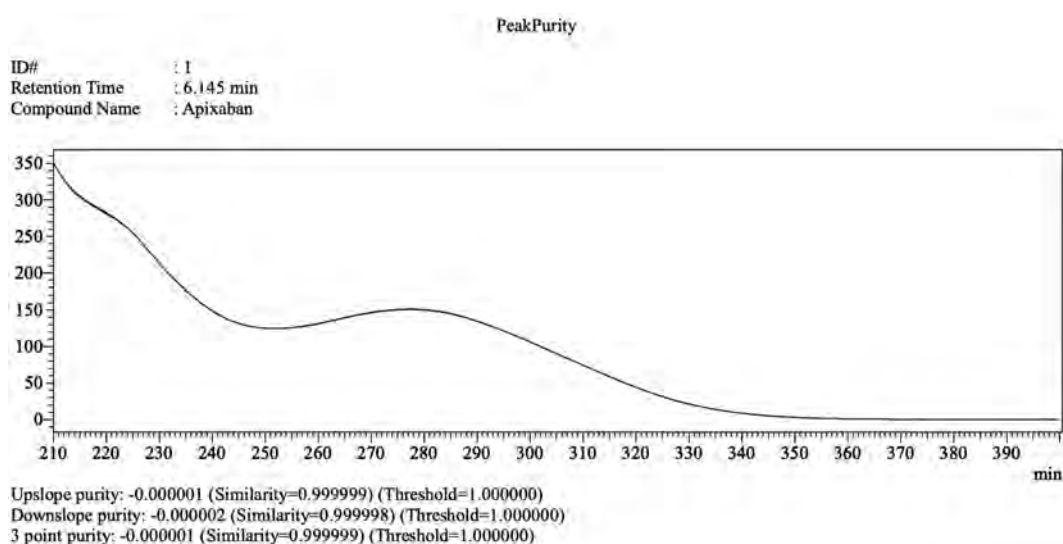
Hình 5. Phổ UV của mẫu thử



Hình 6. Phổ UV của mẫu thử thêm chuẩn



Hình 7. Độ tinh khiết của pic APX trong mẫu chuẩn



Hình 8. Độ tinh khiết của pic APX trong mẫu thử

Nhận xét:

Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic nào có thời gian lưu trùng với pic của APX.

Sắc ký đồ của mẫu thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của APX trong mẫu chuẩn.

Diện tích pic của APX trên sắc ký đồ mẫu thử tăng lên tương ứng với lượng chất chuẩn APX thêm vào. Phổ UV tại thời gian lưu của pic APX trên sắc ký đồ của mẫu thử và mẫu chuẩn có cực đại hấp thụ trùng lặp nhau (277 nm).

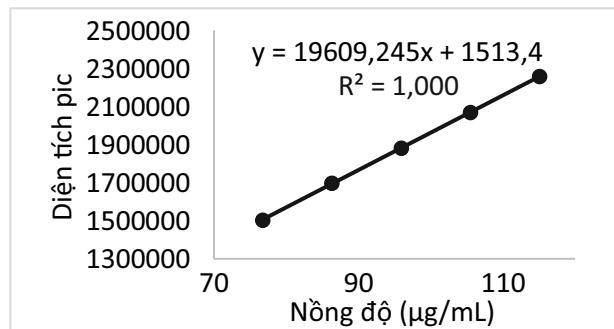
Kết luận: Phương pháp phân tích có tính đặc hiệu cao.

3.2.3. Thẩm định tính tuyến tính

Tiến hành: Thực hiện tiêm mẫu đối với 5 dung dịch chuẩn. Ghi nhận sắc ký đồ và các thông số sắc ký. Dựa trên phần mềm Microsoft Excel để xác định đường tuyến tính, hệ số tương quan R^2 , giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

Bảng 3. Tương quan nồng độ và diện tích pic chuẩn APX

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic
76.72	1,503,811
86.31	1,697,258
95.90	1,882,172
105.49	2,069,217
115.08	2,258,134



Hình 9. Mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ

Phương trình hồi quy: $y = 19609.245x + 1513.4$.

Hệ số tương quan: $R^2 = 1.000$.

Kết luận: Có sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic APX trong khoảng nồng độ từ 76.72 đến 115.08 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.4. Thẩm định độ chính xác

- Độ lặp lại

Tiến hành: Thực hiện tiêm mẫu đối với 6 dung dịch thử. Ghi nhận sắc ký đồ và các thông số sắc ký. Nồng độ APX được tính theo phương trình hồi quy.

$$\text{Hàm lượng APX}(\%) = C_i \times DPL_i \times \frac{m_{TB}}{m_i} \times \frac{100\%}{HLN}$$

Tính toán RSD% để đánh giá kết quả.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại đối với mẫu thử APX

STT	Khối lượng cân bột thuốc (g)	Diện tích pic	Nồng độ APX ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng APX (%)
1	0.2004	1,894,727	96.55	101.2
2	0.2040	1,932,147	98.46	101.4
3	0.2118	2,001,736	102.00	101.2
4	0.2028	1,936,295	98.67	102.2
5	0.2005	1,893,297	96.47	101.1
6	0.2039	1,937,210	98.71	101.7
$\bar{X}$				101.5
RSD (%)				0.42

Kết luận: Phương pháp phân tích có độ lặp lại cao.

- Độ chính xác trung gian

Tiến hành: Thực hiện tiêm mẫu đối với 6 dung dịch thử bởi kiểm nghiệm viên thứ hai. Ghi nhận sắc ký đồ và các thông số sắc ký. Nồng độ APX được tính

theo phương trình hồi quy.

$$\text{Hàm lượng APX}(\%) = C_i \times DPL_i \times \frac{m_{TB}}{m_i} \times \frac{100\%}{HLN}$$

Tính toán RSD% để đánh giá kết quả.

Bảng 5. Kết quả thẩm định độ chính xác trung gian được thực hiện bởi 2 KNV

STT	Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2		
	Lượng cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	Lượng cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
1	0.2004	1,894,727	101.2	0.2036	1,952,338	102.7

STT	Kiểm nghiệm viên 1			Kiểm nghiệm viên 2		
	Lượng cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	Lượng cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
2	0.2040	1,932,147	101.4	0.2110	1,984,501	100.7
3	0.2118	2,001,736	101.2	0.2039	1,945,489	102.2
4	0.2028	1,936,295	102.2	0.2001	1,881,116	100.7
5	0.2005	1,893,297	101.1	0.2039	1,959,691	102.9
6	0.2039	1,937,210	101.7	0.2101	1,986,376	101.2
n=6	TB		101.5			101.7
	RSD		0.42			0.97
n=12	TB	101.6				
	RSD	0.73				

Kết luận: Phương pháp phân tích có độ chính xác trung gian cao.

3.2.5. Thẩm định độ đúng

Tiến hành: Dùng phương pháp thêm chuẩn vào mẫu thử trước khi xử lý mẫu. Nồng độ mẫu chuẩn thêm vào lần lượt là 80%, 100% và 120% so với nồng độ mẫu thử. Thực hiện 9 lần tiêm mẫu trên

các mẫu đã chuẩn bị (mỗi nồng độ 3 mẫu). Tính toán % tỷ lệ phục hồi và đánh giá kết quả.

$$\text{Hàm lượng lý thuyết} = m_t \times \frac{HLN}{m_{TB}} \times 101.5\% + m_c \times HLNT$$

Trong đó: HLN = 5 mg, m_{TB} = 0.21012 g, HLNT = 99.9%.

Hàm lượng thực tế được tính dựa vào phương trình hồi quy.

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng đối với APX

Nồng độ (%)	Khối lượng cân của bột thuốc (g)	Chất chuẩn thêm vào (mg)	Hàm lượng lý thuyết (mg)	Diện tích pic	Hàm lượng thực tế (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80	0.2044	4.02	8.95	1,775,914	9.05	101.1
	0.2049	4.11	9.05	1,788,511	9.11	100.6
	0.2032	4.09	8.99	1,780,669	9.07	100.9
100	0.2118	5.03	10.14	1,995,334	10.17	100.3
	0.2111	5.19	10.28	2,008,204	10.23	99.5
	0.2105	5.08	10.16	1,987,416	10.13	99.7
120	0.2028	6.01	10.90	2,159,891	11.01	101.0
	0.2021	6.09	10.97	2,185,826	11.14	101.6
	0.2036	6.15	11.06	2,169,222	11.05	99.9
Tỷ lệ phục hồi trong khoảng: 99.5 - 101.6 %. Tỷ lệ phục hồi trung bình: 100.5 %						

Kết luận: Phương pháp phân tích có độ đúng cao.

3.3. Định lượng APX trong một số chế phẩm

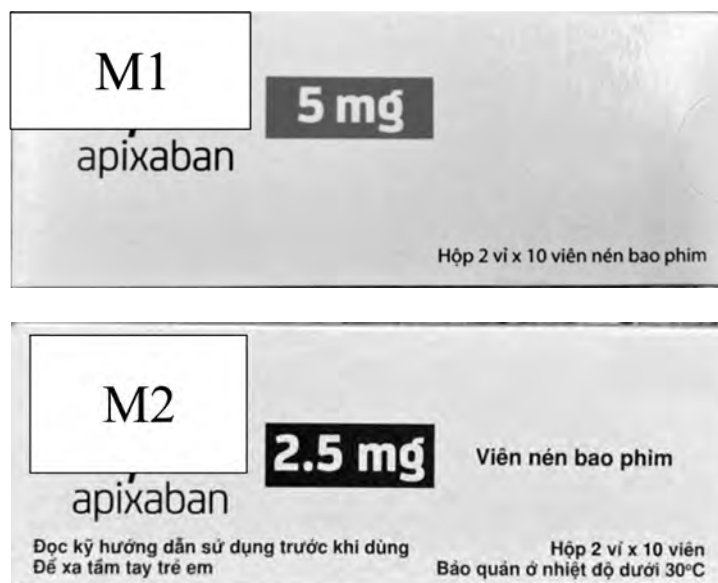
Tính toán kết quả định lượng theo công thức đã được thiết lập, với $S_c = 2112255$.

Bảng 7. Tính toán kết quả định lượng APX

Khối lượng bột thuốc (g)	Khối lượng chuẩn (mg)	KLTB bột thuốc (g)	HLN (mg)	Diện tích pic	Kết quả (%)
0.2006	51.5	0.21012	5	1,921,427	98.0
0.2008				1,919,709	97.9
0.2022		0.10550	2.5	1,913,428	97.3
0.2048				1,935,056	97.1

Bảng 8. Kết quả định lượng APX trong một số chế phẩm tại Việt Nam

Mẫu	Hoạt chất, hàm lượng	Số lô	Hạn dùng	Kết quả định lượng
M1	APX 5 mg	LL9858	02/11/2026	98.0 %
M2	APX 2.5 mg	8035429	08/2025	97.2 %



Hình 10. Các mẫu thử sử dụng trong định lượng

Nhận xét: Hàm lượng hoạt chất APX trong hai mẫu thuốc lần lượt là 98.0 % và 97.2 %.

Kết luận: Quy trình phân tích đã xây dựng áp dụng định lượng được APX trong thuốc thành phẩm viên nén bao phim.

4. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp đầu dò PDA đã được xây dựng và tối ưu hóa nhằm định lượng hoạt chất APX trong chế phẩm viên nén bao phim với hai hàm lượng 5 mg và 2.5 mg. Phương pháp được thực hiện trên cột sắc ký Shimadzu C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m) với pha động là hỗn hợp methanol và nước theo tỷ lệ 60:40, tốc độ dòng 1.0 mL/phút. Điều kiện phân tích được lựa chọn đáp ứng đầy đủ các tiêu chí thẩm định phương pháp phân tích. Đầu dò PDA phát hiện ở bước sóng 277 nm, đây là bước sóng đặc trưng cho APX, giúp nâng cao độ chọn lọc trong phân tích.

Kết quả thực nghiệm cho thấy phương pháp đáp ứng tốt các yêu cầu về tính tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát từ 76.72 đến 115.08 μ g/mL với hệ số tương quan $R^2 = 1.000$. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp đều đạt yêu cầu, với RSD lần lượt là 0.42% và 0.73% (giới hạn cho

phép $\leq 2.0\%$). Bên cạnh đó, độ đúng của phương pháp cũng được chứng minh với tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng 99.5 - 101.6%, hoàn toàn nằm trong giới hạn chấp nhận 98.0 - 102.0% theo các hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích.

Ngoài việc đáp ứng các tiêu chí thẩm định phương pháp phân tích, phương pháp còn có ưu điểm như sử dụng hệ pha động đơn giản, giá thành thấp và dễ tiếp cận.

5. KẾT LUẬN

Phương pháp HPLC sử dụng đầu dò PDA được xây dựng trong nghiên cứu đã chứng minh được độ tin cậy và tính khả thi cao trong việc định lượng hoạt chất APX trong chế phẩm viên nén bao phim. Các thông số thẩm định phương pháp đều đạt yêu cầu về độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng và độ lặp lại theo tiêu chuẩn phân tích hiện hành. Quy trình phân tích này phù hợp để ứng dụng trong kiểm nghiệm hoạt chất APX trong các dạng thuốc viên nén bao phim.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài nghiên cứu khoa học này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC18.48.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] American Society of Health-System Pharmacists (ASHP), "Apixaban (Monograph)", Medically reviewed by Drugs.com on Mar 23, 2023. [Online]. Available: <https://www.drugs.com/monograph/apixaban.html>, [Accessed Jul 05 2024].
- [2] FDA, "Eliquis, highlights of prescribing information", Apr 2021. [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/202155s034lbl.pdf, [Accessed Jul 05 2024].
- [3] Noah Higgins-Dunn, "The top 15 blockbuster patent expirations coming this decade", Jul 12, 2021. [Online]. Available: <https://www.fiercepharma.com/special-report/top-15-blockbuster-patent-expirations-coming-decade>, [Accessed Jul 05 2024].
- [4] ClinCalc, "ClinCalc DrugStats Database. Free U.S. Outpatient Drug Usage Statistics", 2024. [Online]. Available: <https://clincalc.com/DrugStats/>, [Accessed Jul 05 2024].
- [5] Cayman chemical, "Apixaban", 2024. [Online]. Available: <https://www.caymanchem.com/product/15427/apixaban>, [Accessed Jul 05 2024].
- [6] H. Jeong, T. Kim, K. Shin, "Quantification of apixaban in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry", *Transl Clin Pharmacol*, Vol. 27, No. 1, pp. 33 - 41, 2019, DOI: 10.12793/tcp.2019.27.1.33.
- [7] A. K. Yadav, P. Bisht, S. M. Patil, "Development and validation of RP-HPLC method for quantitative estimation of apixaban in bulk and dosage forms", *NeuroQuantology*, Vol. 20, No. 10, pp. 75 - 82, 2022, DOI: 10.14704/nq.2022.20.10.NQ55009.
- [8] E. Akbel, İ. Bulduk and S. Gökçe, "A green HPLC method for the determination of apixaban in pharmaceutical products: Development and validation", *Reviews in Analytical Chemistry*, Vol 42, 2023, DOI: 10.1515/revac-2023-0058.
- [9] Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam V*, phụ lục 5, 2017.
- [10] *Hướng dẫn của ASEAN về thẩm định quy trình phân tích*, 2012.

Development of a quantitative HPLC method for determination of apixaban in film-coated tablets

Vo Sy Nhat, Phan Nguyen Thu Xuan

ABSTRACT

Introduction: Apixaban (APX) is a selective factor Xa inhibitor commonly used for the treatment and prevention of thrombosis. However, there is currently no official pharmacopoeial standard for film-coated tablets containing APX. Moreover, some previously reported quantification methods employ acetonitrile - a solvent with higher cost and toxicity compared to methanol. Objective: To develop and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantification of APX in film-coated tablets, fully complying with the ASEAN guidelines on analytical method validation. Materials and methods: The study sample was a film-coated tablet formulation containing APX. The method employed HPLC with a photodiode array (PDA) detector, using a mobile phase of methanol-water (60:40) and a detection wavelength of 277 nm. The method was validated according to ASEAN guidelines, including specificity, linearity, accuracy, precision, and repeatability. Results: The method met all validation requirements, with a correlation coefficient $R^2 = 1.000$, repeatability RSD = 0.42%, and an average recovery rate of 100.5%. Conclusion: The HPLC-PDA method using methanol is feasible, effective, and suitable for the quantification of APX in film-coated tablets.

Keywords: apixaban, film-coated tablets, HPLC, method validation

Received: 23/5/2025

Revised: 15/9/2025

Accepted for publication: 18/9/2025