

# Ứng dụng phương pháp sắc kí lỏng pha đảo (Rp-HPLC) định lượng viên nén ticagrelor

Dương Đình Chung<sup>1,\*</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Yến<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Khánh Quan<sup>1</sup>, Trương Thị Thu Thảo<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thủy<sup>1</sup>, Lê Thị Yến Chi<sup>1</sup>, Ca Thị Thúy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Cơ bản, Đại học Y Dược TPHCM

\*ddchung@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, viên nén ticagrelor được xác định lượng bằng phương pháp sắc kí lỏng pha đảo (Rp-HPLC). Điều kiện sắc kí đã được khảo sát và lựa chọn thông số tối ưu cho: bước sóng, pha động, pha tĩnh, tốc độ dòng, thể tích tiêm mẫu. Qui trình phân tích đã xây dựng được thẩm định theo hướng dẫn của Thông tư 32/2018/TT-BYT về qui định việc đăng kí lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc. Kết quả điều kiện sắc kí để định lượng viên nén ticagrelor: cột Pursuit XRs C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Bước sóng phát hiện 301 nm. Pha động là hỗn hợp của acetonitril và 0,1 % acid photphoric với tỉ lệ 77 : 23 (tt/tt); Tốc độ dòng 1 mL/ phút; Thể tích tiêm mẫu 10 µL và nhiệt độ cột 40 °C. Khoảng tuyến tính ticagrelor thiết lập từ (5 – 50) µg/mL (Hệ số tương quan R2 > 0,999). Phương pháp Rp-HPLC để xác định ticagrelor đã xây dựng và thẩm định thành công (tuyến tính, đúng, chính xác) và có thể áp dụng trong việc xác định hàm lượng của viên nén ticagrelor như một tiêu chuẩn cơ sở.

Nhận 30.11.2020  
Được duyệt 12.12.2020  
Công bố 30.12.2020

Từ khóa  
Ticagrelor, ADP, viên nén, Rp-HPLC, thẩm định phương pháp

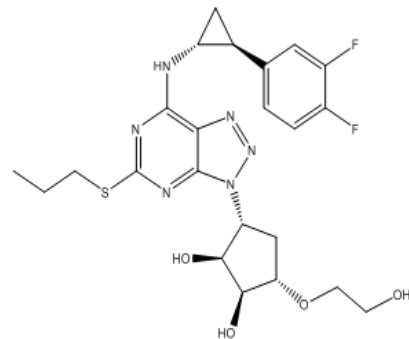
© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Giới thiệu

Ticagrelor (TG) là hợp chất mới đầu tiên của một nhóm trong nhóm nonthienopyridin của các thuốc chống kết tập tiểu cầu được sử dụng để ngăn ngừa biến cố huyết khối (nhồi máu cơ tim, đột quỵ) ở bệnh nhân hội chứng mạch vành cấp [1,2]. TG có cấu trúc cyclopentyl triazolopyrimidin, một hợp chất thơm đa vòng có chứa một vòng triazol hợp nhất với vòng pyrimidin; về mặt cấu trúc vòng cyclopentan tương tự như ribose đường và hệ thống vòng thơm giống như purin nucleobase, tạo cho phân tử một sự tương đồng về thụ thể với adenosin [2,3]. TG cạnh tranh với adenosin diphosphat bằng cách ức chế thụ thể P2Y12 của tiểu cầu và có thể phục chức năng của tiểu cầu khi ngưng sử dụng thuốc trong khoảng 3 ngày [4]. Cấu trúc hóa học của Ticagrelor được trình bày trong [2].

TG được Cơ quan Dược phẩm Châu Âu và Cục Quản lí Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ chấp nhận sử dụng từ năm 2010 và 2011 [2].

Khảo sát tài liệu cho thấy TG có thể được định lượng bằng phương pháp quang phổ UV [5,6], phương pháp RP-HPLC [7-10].



(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[[[(1R,2S)-2-(3,4-difluorophenyl)cyclopropyl]amino]-5-propylsulfanyl]triazolo[5,4-d]pyrimidin-3-yl]-5-(2-hydroxyethoxy)cyclopentane-1,2-diol

**Hình 1** Công thức cấu tạo của ticagrelor

Tuy nhiên, trong ở Việt Nam chưa có công bố nào báo cáo định lượng TG bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao. Do đó, đề tài này nhằm mục tiêu xây dựng và thẩm định qui trình định lượng TG trong viên nén bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao. Kết quả của đề tài này có thể cung cấp thêm một phương pháp kiểm nghiệm nhằm đảm bảo kiểm soát tốt chất lượng dược phẩm khi lưu hành.

## 2 Vật liệu và phương pháp

### 2.1 Nguyên liệu, hóa chất, thuốc thử:

**Mẫu thử:** Viên nén chứa 90 mg hoạt chất ticagrelor.

**Thiết bị:** Hệ thống sắc kí Agilent 1260, đầu dò PDA, sử dụng phần mềm ChemStation phiên bản B.04.32 (Agilent)

**Hóa chất:** Methanol, acetonitril (tiêu chuẩn cho sắc kí cung cấp bởi hãng Merck - Đức) và nước đạt chất lượng sử dụng cho sắc kí từ hệ thống lọc nước siêu sạch Pall (Mỹ), và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích (Merck – Đức). Mẫu trắng (placebo) hỗn hợp gồm: mannitol, dicalci phosphat, hypromellose 606, natri starch glycolat, magnesium stearat, macrogol 6000.

**Chất đối chiếu:** Ticagrelor số lô T437700 do Công ty Toronto Research Chemicals (Canada) cung cấp.

**Chuẩn bị các dung dịch chuẩn:**

**Dung dịch chuẩn gốc:** Hòa tan chất chuẩn đối chiếu trong methanol để có được nồng độ 1000 µg/mL. Từ dung dịch chuẩn gốc trên thực hiện pha loãng để thu được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ (5 - 50) µg/mL.

### 2.2 Quy trình xử lý mẫu:

**Chuẩn bị mẫu:** Xác định khối lượng trung bình của 20 viên, nghiền mịn trong cối sứ, cân một lượng bột thuốc tương ứng 50 mg ticagrelor vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 50 mL methanol siêu âm 30 phút, bổ sung vừa đủ methanol đến vạch. Hỗn hợp được quay li tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút, lấy dung dịch lớp trên. Hút chính xác 2 mL dịch lọc cho vào bình định mức 50 mL, thêm pha động vừa đủ đến vạch lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm, dịch lọc dùng để phân tích sắc kí.

### 2.3 Phương pháp nghiên cứu

**Khảo sát điều kiện sắc kí:**

Ticagrelor là chất phân cực trung bình và hấp thụ bức xạ tử ngoại, vì vậy sắc kí pha đảo được áp dụng. Lựa chọn điều kiện ban đầu theo tài liệu tham khảo [7-10]. Khảo sát và điều chỉnh một số điều kiện: Cột sắc kí, hệ pha động, tốc độ dòng, bước sóng phát hiện, thể tích tiêm mẫu để chọn được điều kiện sắc kí thích hợp thỏa mãn các yêu cầu sau: Số đĩa

lí thuyết ( $N > 3.000$ ), hệ số bất đối ( $As$ ) của peak phải nằm trong khoảng 0,8 đến 1,5.

**Thẩm định phương pháp:**

Phương pháp phân tích được thẩm định các chỉ tiêu: Độ đúng, độ chính xác, tính tuyến tính, tính tương thích hệ thống và giới hạn định lượng theo các hướng dẫn của thông tư 32/2018/TT-BYT về việc qui định việc đăng kí lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc.

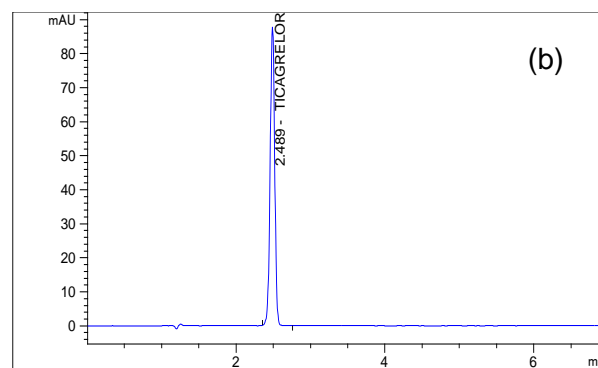
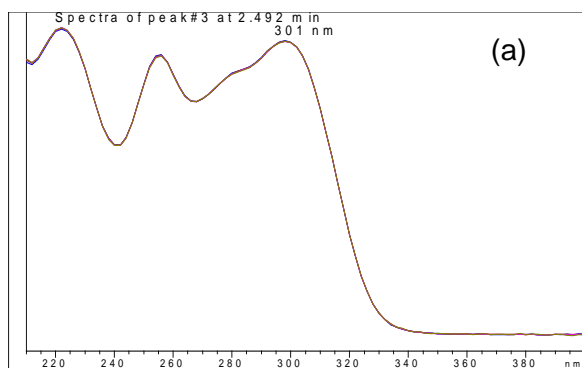
**Phương pháp thống kê:**

Số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý bằng thuật toán thống kê ANOVA trên phần mềm Microsoft Excel. Số liệu được biểu diễn dưới dạng  $\bar{X} \pm SD$ . Kiểm định các giá trị bằng t-test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p \leq 0,05$ .

## 3 Kết quả và bàn luận

### 3.1 Khảo sát các điều kiện sắc kí:

Thử nghiệm ban đầu, được thực khảo sát các pha tĩnh khác nhau (Gemini C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); cột Pursuit XRs C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) và cột Zorbax C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), hiệu quả tách TG phù hợp trên cả ba cột sắc kí được khảo sát. Tuy nhiên, cột Pursuit XRs C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) được lựa chọn do có thời gian phân tích ngắn. Pha động được thay đổi tỉ lệ acetonitril (75 % - 85 %), tốc độ dòng (0,7 - 1,3) mL/phút và thể tích tiêm mẫu (5 - 30) µL sao cho chất phân tích tách hoàn toàn khỏi các tạp chất hay tá dược và peak sắc kí đạt được các yêu cầu (số đĩa lí thuyết ( $N > 3.000$ ), hệ số đối xứng ( $0,8 < As < 1,5$ ), thời gian phân tích hợp lí. Kết quả phổ hấp thụ tử ngoại tại đỉnh peak (Hình 2a) và bước sóng 301 nm được lựa chọn để định lượng TG trong viên nén. Điều kiện sắc kí thích hợp được xác định như sau: Pha động acetonitril và 0,1 % acid phosphoric tỉ lệ 77 : 23 (tt/tt). Pha tĩnh: Pursuit XRs C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), tiền cột C18 (10 x 4,6 mm; 5 µm). Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút. Nhiệt độ sắc kí: 40 °C. Thể tích tiêm mẫu: 10 µL. Dung môi pha loãng: Acetonitril, nước cất dùng cho HPLC tỉ lệ 50 : 50 (tt/tt). Sắc kí đồ chất đối chiếu trong điều kiện sắc kí lựa chọn (Hình 2b).



**Hình 2** Phổ hấp thụ UV của TG (a); Sắc kí đồ dung dịch chuẩn của TG (b)

Kết quả thẩm định phương pháp:

*Khảo sát tính tương thích hệ thống:*

Thực hiện tiêm 6 lần dung dịch chuẩn ở nồng độ định lượng. Ghi lại các thông số sắc kí: Thời gian lưu, diện tích peak, số đĩa lí thuyết. Bảng 11 cho thấy các giá trị %RSD

của thời gian lưu, diện tích peak < 2 %, hệ số kéo đuôi đạt yêu cầu  $0,8 < A_s < 1,5$  và số đĩa lí thuyết lớn hơn qui định ( $N > 3.000$ ). Điều này chứng tỏ hệ thống sắc kí phù hợp để định lượng TG trong viên nén.

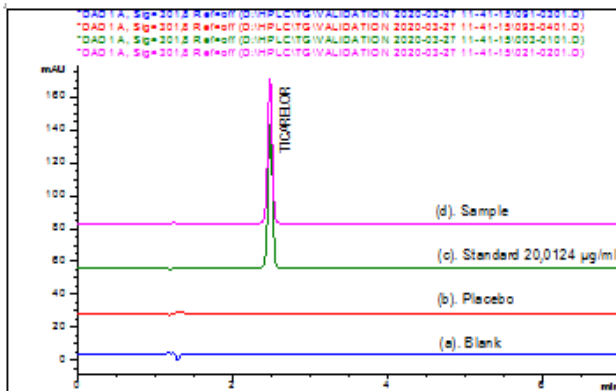
**Bảng 11** Kết quả đánh giá tính tương thích hệ thống

STT	Mẫu chuẩn ticagrelor						Mẫu thử ticagrelor					
	$t_R$	$k'$	S	H.w	As	N	$t_R$	$k'$	S	H.w	As	N
1	2,49	1,22	372,40	0,07	1,02	7825	2,49	1,22	372,41	0,07	1,02	7892
2	2,49	1,22	371,99	0,07	1,01	7865	2,49	1,22	374,07	0,07	1,01	7892
3	2,49	1,23	373,34	0,07	1,01	7824	2,49	1,23	373,04	0,07	1,02	7907
4	2,49	1,23	373,84	0,07	1,02	7801	2,50	1,23	372,40	0,07	1,02	7924
5	2,49	1,22	374,47	0,07	1,02	7880	2,49	1,22	374,21	0,07	1,02	7770
6	2,49	1,22	373,43	0,07	1,01	7855	2,49	1,22	373,03	0,07	1,01	7869
TB	2,49	1,22	373,24	0,07	1,02	7842	2,49	1,22	373,2	0,07	1,02	7876
SD	0	0	0,92	0	0	30	0	0	0,79	0	0	55
RSD%	0,09	0,16	0,25	0,17	0,29	0,38	0,1	0,19	0,21	0,3	0,32	0,7

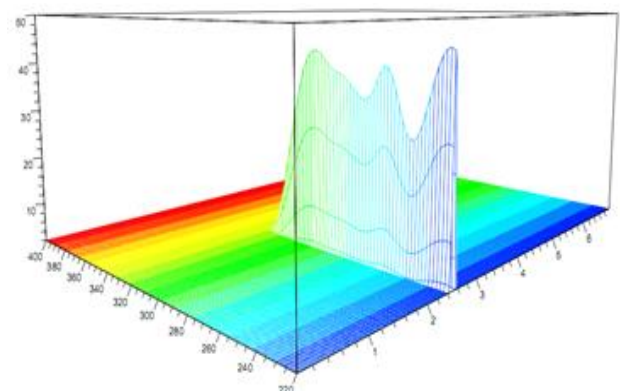
**Ghi chú:** Retention time ( $t_R$ ); Capacity factor ( $k'$ ); Peak area (S); Half width (H,w); Asymmetry (As); Theoretical plate number (N)

*Độ đặc hiệu:*

Kết quả khảo sát cho thấy dung môi và tá dược không ảnh hưởng đến peak của hoạt chất cần phân tích. Sắc kí đồ của mẫu thử cho các peak có thời gian lưu tương ứng với các peak của chất phân tích trên sắc kí đồ của mẫu chuẩn, các peak tách nhau hoàn toàn và tinh khiết. Kết quả phổ 3D trình bày trong:



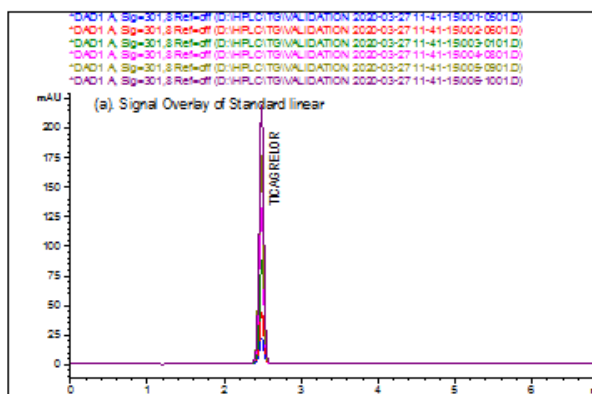
**Hình 3** Sắc kí đồ: (a) mẫu trắng; (b) placebo; (c) mẫu chuẩn và (d) mẫu thử.



**Hình 4** Sắc kí đồ 3D của TG, kết quả thẩm định tính đặc hiệu

*Tính tuyến tính:*

Thiết lập các điều kiện sắc kí như đã mô tả, khoảng tuyến tính phương pháp xây dựng trong khoảng nồng độ (5 – 50) µg/mL. và **Error! Reference source not found.** trình bày dữ liệu tính tuyến tính và sắc kí đồ các dung dịch chuẩn của phương pháp.



**Hình 5** Sắc kí đồ của các dung dịch chuẩn ticagrelor trong khoảng nồng độ 5 – 50  $\mu\text{g/mL}$

#### Độ đúng và độ chính xác:

Độ đúng được đánh giá qua giá trị độ phục hồi bằng cách thêm chuẩn chuẩn ở 3 mức nồng độ 80 %, 100 % và 120 % so với mức nồng độ định lượng (20  $\mu\text{g/mL}$ ) của TG. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu, mỗi mẫu tiến hành sắc kí 1

Bảng 12 trình bày tóm tắt kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác của phương pháp.

**Bảng 12** Kết quả thẩm định độ đúng, độ chính xác

Mẫu (%)	Nồng độ thêm vào ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nồng độ tìm lại ( $\mu\text{g/mL}$ )	Phục hồi (%)	Phân tích ANOVA	
80	16	16,05	100,33	Mean	100,65
80	16	16,09	100,55	Standard	0,15
80	16	16,05	100,3	Standard Deviation	0,44
100	20	20,04	100,2	Sample Variance	0,19
100	20	20,09	100,45	Minimum	100,2
100	20	20,09	100,47	Maximum	101,53
120	24	24,37	101,53	Relative standard deviation	0,44
120	24	24,23	100,97	Count	9
120	24	24,25	101,05	Confidence Level (95 %)	0,34

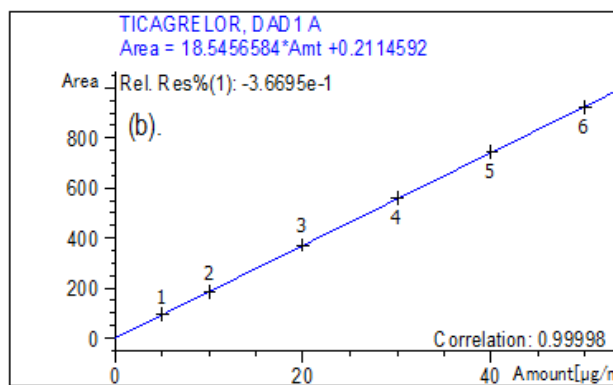
**Bảng 13** Kết quả áp dụng phương pháp để định lượng ticagrelor trong mẫu thử

Mẫu	Trong ngày			Khác ngày			Phân tích ANOVA
	Diện tích (mAU*S)	Nồng độ đo được ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hàm lượng so với nhãn (%)	Diện tích (mAU*S)	Nồng độ đo được ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hàm lượng so với nhãn (%)	
1	372,79	20,13	100,64	374,28	20,21	101,04	TB = 100,61; F > Fcrit (12,84 > 4,96); P-value (0,0041); Df = 10.
2	369,63	19,96	99,78	375,49	20,27	101,37	
3	371,57	20,06	100,31	375,49	20,27	101,37	
4	370,9	20,03	100,13	375,5	20,27	101,37	
5	371,72	20,07	100,35	370,9	20,03	100,13	
6	371,16	20,04	100,2	374,21	20,2	101,02	
RSD%			0,28	RSD%			0,48

#### Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:

Kết quả được xác định thông qua giá trị thống kê từ đường tuyến tính: LOD và LOQ cho TG tương ứng lần lượt là 0,437  $\mu\text{g/mL}$  và 1,327  $\mu\text{g/mL}$ .

Áp dụng qui trình phân tích để xác định hàm lượng mẫu thử viên nén đang lưu hành trên thị trường.



**Hình 6** Đồ thị biểu diễn tính tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak của ticagrelor.

lần. Kết quả độ phục hồi của phương pháp dao động từ 100,2 % đến 101,53 % và nằm trong giới hạn (98 – 102) %. Giá trị RSD (%) không quá 2 % (0,44 %). Do đó, qui trình định lượng TG đạt yêu cầu về độ đúng.

Xử lý mẫu và phân tích 6 mẫu thử độc lập đã được đồng nhất, lặp lại trong 2 ngày. Hàm lượng ticagrelor (so với nhãn) đạt yêu cầu Phụ lục 11 Dược Điển Việt Nam V. Giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu thử trong 2 ngày  $\leq 2\%$  chứng tỏ qui trình ổn định và chính xác. Kết quả trình bày trong Bảng 13.

## 4 Kết luận

Đã xây dựng được qui trình định lượng đồng thời ticagrelor trong viên bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao với đầu dò dãy diod quang (Photodiode Array- PDA). Phương pháp đảm bảo độ chọn lọc, độ đúng, độ chính xác và tuyến tính trong khoảng nồng độ (5 – 50) µg/mL. Phương pháp có

thể áp dụng trong việc kiểm nghiệm thường qui hoạt chất ticagrelor chế phẩm viên nén.

### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài: 2020.01.065/HĐ-KHCN.

## Tài liệu tham khảo

1. Dhillon, S., *Ticagrelor: a review of its use in adults with acute coronary syndromes*. American Journal of Cardiovascular Drugs, 2015. 15(1): p. 51-68.
2. Dobesh, P.P. and J.H. Oestreich, *Ticagrelor: pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical efficacy, and safety*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2014. 34(10): p. 1077-1090.
3. Wallentin, L., et al., *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. New England Journal of Medicine, 2009. 361(11): p. 1045-1057.
4. Cheng, J.W., *Ticagrelor: oral reversible P2Y12 receptor antagonist for the management of acute coronary syndromes*. Clinical Therapeutics, 2012. 34(6): p. 1209-1220.
5. Pandya, D., et al., *UV-Vis spectrophotometric assay determination of oral antiplatelet ticagrelor drug in pharmaceutical formulation: Application to content uniformity*. 2016.
6. Soury, E., et al., *Spectrophotometric methods for determination of ticagrelor in dosage forms*. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2017. 3(5): p. 172-176.
7. Yaye, H.S., et al., *Identification of the major degradation pathways of ticagrelor*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. 105: p. 74-83.
8. Wingert, N.R., et al., *Application of Quality by Design to optimize a stability-indicating LC method for the determination of ticagrelor and its impurities*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. 118: p. 208-215.
9. Bueno, L.M., et al., *HPLC method for simultaneous analysis of ticagrelor and its organic impurities and identification of two major photodegradation products*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. 97: p. 22-29.
10. Ambasana, M., et al., *An improved assay method for the estimation of ticagrelor hydrochloride by reverse phase liquid chromatography*. 2016.
11. Gobetti, C., et al., *Determination of the new antiplatelet agent ticagrelor in tablets by stability-indicating HPLC method*. Current Pharmaceutical Analysis, 2014. 10(4): p. 279-283.

## Reverse phase liquid chromatography: quantitative application of ticagrelor tablets (Rp-HPLC)

Chung Duong Dinh<sup>1,\*</sup>, Yen Nguyen Thi Ngoc<sup>1</sup>, Quan Nguyen Huu Khanh<sup>1</sup>, Thao Truong Thi Thu<sup>1</sup>,  
Thuy Nguyen Thi<sup>1</sup>, Chi Le Thi Yen<sup>1</sup>, Thuy Ca Thi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

<sup>2</sup>Faculty of Basic Science, University of Medicine and Pharmacy Ho Chi Minh City

\*ddchung@ntt.edu.vn

**Abstract** In this study, ticagrelor tablets were quantified via reverse phase liquid chromatography (Rp-HPLC). Chromatographic conditions were investigated and optimal parameters were selected as following: wavelength, mobile phase, stationary phase, flow rate, and sample injection volume. The developed analytical process is evaluated in accordance with the guidance of Circular 32/2018/TT-BYT regulating the registration of circulation of drugs and medicinal ingredients. Results of chromatographic conditions for quantification of ticagrelor tablets are: Pursuit XRs C18 column (150 x 4.6 mm; 5 µm); Detection wavelength at 301 nm; The mobile phase being a mixture of acetonitrile and 0.1 % phosphoric acid with the ratio of 77:23 (v/v); Flow rate at 1 mL/min; Sample injection volume 10µL and column temperature 40 °C. Ticagrelor linear range is set from (5 – 50) µg/ml (Correlation coefficient  $R^2 > 0.999$ ). The Rp-HPLC method for ticagrelor determination has been successfully developed and validated (linearly, correctly, and accurately) and can be applied in the content determination of ticagrelor tablets as a baseline standard.

**Keywords** Ticagrelor, ADP, Rp-HPLC, Tablets, Validation.

