Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

مقاله پژوهشی

اندازه‌گیری اکسی‌توسین در فرآورده‌های داروئی موجود در بازار داروئی ایران به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC)

اعظم اکبری[1]، امیر حیدری[2]*

تاریخ دریافت 1392/08/04 تاریخ پذیرش 1392/10/28

چکیده

پیش زمینه و هدف: کنترل کمی و کیفی اشکال داروئی از حیث دارا بودن مقدار ماده مؤثره جهت پایش اثرات درمانی و سمیت آن، حائز اهمیت می‌باشد. پروژه حاضر جهت اندازه‌گیری مقدار اکسی‌توسین در اشکال داروئی موجود در بازار داروئی ایران طراحی گردید.

مواد و روش: اشکال داروئی اکسی‌توسین موجود در بازار داروئی ایران با دوز ۵ و ۱۰ واحدی(IU) تهیه گردید. روش اندازه‌گیری شامل کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) به‌عنوان روش ترجیحی در این پروژه به‌کار گرفته شد. در این سیستم جداسازی تحت شرایط ایزوکراتیک و با استفاده از ستون C_{18} و محلول فاز متحرک شامل (V/V) ٪۲۰ استونیتریل در بافر فسفات ۸۰ میلی مولار (pH=۵) با سرعت جریان ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و آشکار ساز UV در طول موج ۲۲۰nm انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این آزمایش نشان دهنده وجود یک رابطه خطی بین غلظت ماده مؤثره و شدت پاسخ آشکارساز در محدوده غلظتی IU/ml ۱۲-۰/۱۵ بود. مقدار ضریب همبستگی R^2=۰/۹۹ و معادله منحنی A=۱۳۳/۱C −۲/۱۹۳ حاصل شد. نتایج آنالیز نمونه‌ها نشان دادند که برای ۳ غلظت ذکر شده،درصد ضریب تغییرات درون روزی بین ۹/۹۳-۱/۹۷ و ضریب تغییرات بین روزی، بین ۱/۷۶-۱/۱۰ قرار داشت. همچنین درصد دقت ۱۰۷/۵-۹۶/۴ و ۹۹/۶۰-۹۳ به‌ترتیب برای تغییرات درون روزی و تغییرات بین روزی به‌دست آمد. حد تشخیص روش نیز IU/ml ۰/۲۵ حاصل گردید. پس از اندازه‌گیری میزان اکسی‌توسین در فرآورده‌های دارویی، مقدار این ماده مؤثره برای آمپول‌های ۱۰ واحدی بین ۱۲۰-۱۰۷ درصد و برای آمپول‌های ۵ واحدی بین ۲۱۶/۶-۱۱۴/۲ درصد تعیین گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از آزمایش، مشاهده می‌گردد که بعضی از مقادیر اکسی‌توسین در فرآورده‌هایی دارویی موجود در بازار دارویی ایران، بیش از مقادیر عنوان شده در برچسب مورد ادعای کارخانه سازنده، است. این نتایج ضرورت کنترل کیفی و کمی اشکال داروئی را هر چه بیشتر مورد تاکید قرار می‌دهد.

کلید واژه‌ها: اکسی‌توسین، روش کروماتوگرافی، فراورده داروئی،آشکار ساز فرابنفش

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوازدهم، ص ۹۶۵-۹۵۶، اسفند ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، تلفن ۲۷۵۴۹۹۱-۰۴۴۱

Email: heydari.866@gmail.com

مقدمه

کنترل کیفیت از سابقه‌ای طولانی معادل عمر صنعت داروسازی برخوردار است. کیفیت فراورده‌های دارویی به‌ویژه از نظر مقدار ماده مؤثره، باتوجه به‌وجود اثرات جانبی و عوارض سمّی اهمیت زیادی دارد. در یک کارخانه داروسازی پس از ارائه فرمولاسیون‌های مختلف برای یک دارو جهت رسیدن به اثرات درمانی مطلوب و کاستن معایب درمانی، کنترل فراورده و بررسی اثرات بیولوژیک دارو اغلب در طی مراحل تولید، انجام می‌گیرد. تفاوت‌های موجود در فراورده‌های دارویی تولید شده از یک ماده مؤثره توسط شرکت‌های داروسازی مختلف از جمله مواد اولیه، نوع و میزان مواد جانبی همراه در هر فرمول و نیز فرایند تولید محصول نهایی باعث ایجاد اختلالاتی در غلظت‌های پلاسمایی حاصل از دارو می‌شود که ممکن است منجر به بروز عوارض ناخواسته و یا کاهش اثر درمانی مورد نظر گردد.

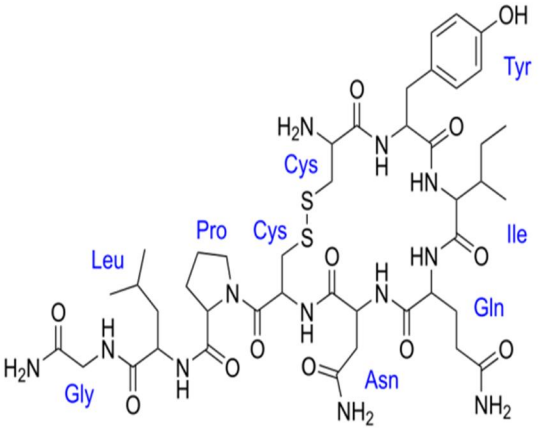
[1] کارشناس ارشد شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[2] استادیار گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

از جمله ترکیبات دارویی که امروزه مصرف آن‌ها حائز اهمیت بوده و توجه خاصی را می‌طلبد، «اکسی‌توسین» می‌باشد که در پی ارائه گزارشی مبنی بر عدم کارائی فرمولاسیون‌های داروئی موجود در کلینیک‌های درمانی، توجه ما را به تجزیه ترکیبات در فرمولاسیون داروئی آن جلب نمود.

نام«اکسی‌توسین» برگرفته از یک کلمه یونانی به معنای تولد سریع[1] است که به بیش از ۷۰۰ میلیون سال قبل مربوط می‌شود (۱). اکسی‌توسین[2] (9-amino-acid cyclic peptide) یک نوناپپتید با ساختار هورمونی است که یک پیوند دی سولفیدی بین دو اسید آمینه سیستئن وجود دارد. این هورمون به‌طور طبیعی توسط هیپوتالاموس تولید شده و از طریق لوب خلفی غده هیپوفیز ترشح می‌گردد (۲و۳). خصوصیات فیزیولوژیکی ترکیب استخراج شده فوق از هیپوفیز برای اولین بار توسط Henry Hallett Dale در سال ۱۹۰۲کشف گردید. ۳۰ سال بعد Vincent du Vigneaud و همکاران او مطالعات خود را در زمینه اکسی‌توسین شروع کردند و در سال ۱۹۵۳موفق به شناسایی ساختار، پیوند دی‌سولفیدی بین دو اسید آمینه و سنتز این ترکیب شدند (۴). ساختمان شیمیایی اکسی‌توسین در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل (۱): ساختمان شیمیائی اکسی‌توسین

فعالیت فیزیولوژیکی اکسی‌توسین عمدتاً در رحم و ترشح شیر در بدن انسان می‌باشد. این هورمون باعث انقباض عضلات صاف رحم به‌ویژه در لحظه تولد نوزاد و ترشح شیر از طریق انقباض عضلات صاف غدد مولد شیر بعد از زایمان می‌گردد (۵). کاربرد عمده اکسی‌توسین در کلینیک‌های درمانی جهت القاء و تشدید انقباضات عضلات رحمی هنگام زایمان، جلوگیری و کنترل خونریزی در مراقبت‌های بعد زایمان (که عمده‌ترین علت مرگ مادران در کشورهای توسعه یافته است) می‌باشد (۵). این دارو توسط سیستم گوارشی تخریب می‌شود و شکل داروئی در دسترس آن به‌صورت محلول تزریقی با دوز ۵ و ۱۰ واحدی در بازار دارویی ایران وجود دارد که توسط دو شرکت داروسازی داخلی تولید می‌گردد. تجویز مقادیر بیش از حد این دارو ممکن است باعث انقباضات نامنظم عضلات رحم، پارگی رحم، هیپوکسی جنین و حتی مرگ مادر و جنین را به همراه داشته باشد (۴).

همان‌طور که مشخص است؛ میزان اثربخشی یک ترکیب دارویی به مقدار ماده مؤثره دارو بستگی دارد. میزان ماده مؤثره اکسی‌توسین نیز مهم‌ترین عاملی است که سلامت مادران را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در برخی موارد ممکن است مقدار ماده مؤثره موجود در شکل دارویی کمتر و یا بیشتر از مقدار ادعای کارخانه سازنده طبق برچسب دارو باشد. از طرفی این دارو یک ترکیب شیمیایی سنتزی بوده و پایداری آن وابسته به دمای محیط است. به گونه‌ای که در دماهای بالاتر از ۸ درجه سانتی‌گراد، تخریب می‌گردد. بنابراین کنترل کمّی و کیفی فرآیندهای مختلف تولیدی، بسته بندی و عرضه آن و همچنین دمای نگهداری فراورده بسیار ضروری است.

تاکنون فن‌های گوناگونی به این منظور مورد استفاده قرار گرفته است که رایج‌ترین روش، فن رادیوایمنواسی[3] می‌باشد (۶). این فن قابلیت اندازه‌گیری مقادیر بسیار اندک اکسی‌توسین را داراست و برای انجام آزمایش به مقادیر کمتر نمونه نیاز می‌باشد. روش دیگر، فن الکتروفورز است (۷). در این روش، ترکیب اکسی‌توسین به کمک روش الکتروفورز جداسازی شده و توسط آشکارسازهای فلورسانس و فرابنفش آنالیز گردیده است. روش دیگری که اخیراً استفاده از آن رواج یافته، فن کروماتوگرافی مایع می‌باشد. در این فن ابتدا نمونه توسط ستون کروماتوگرافی جداسازی شده و سپس توسط جریان فاز متحرک به آشکار ساز منتقل می‌شود. در این آزمایشات از ستون‌های مختلف و فازهای متحرک با ترکیبات متفاوت و روش‌های آشکارسازی مختلف از جمله فرابنفش، جرمی و کولون سنجی استفاده شده است (۱۳،۴-۸).

هرکدام از فن‌های فوق از نظر داشتن دقت و صحت کافی، پیچیدگی دستگاهی، صرف زمان طولانی جهت انجام آزمایش، گران بودن دستگاه و نیاز به نیروی متخصص دارای محدودیت می‌باشند. در این طرح از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و آشکار ساز فرابنفش استفاده شده است که یک روش

[1] ōkytokínē
[2] Oxytocin
[3]-Radioimmunoassay(RIA)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

دقیق، حساس و با سرعت پاسخ‌دهی بالا می‌باشد (۳) و با توجه به شکل تزریقی دارو، نیازی به فرآیندهای استخراج، جداسازی و پیش تغلیظ آنالیت نیست.

هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری مقدار ماده مؤثره اکسی‌توسین در اشکال داروئی موجود در بازار داروئی ایران می‌باشد که به این منظور از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز فرابنفش استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

ترکیبات بکار رفته در این پژوهش از مواد خالص با در جه خلوص در حد کروماتوگرافی بوده که عبارتند از: اورتو فسفریک اسید (۸۵% W/W) تهیه شده از شرکت GPR، استو نیتریل و متانول تهیه شده از شرکت Merck. هیدروکسید سدیم ساخت شرکت Merck و اکسی‌توسین استات تهیه شده از شرکت Aldrich-Sigma با درجه خلوص ۹۹%

دستگاه‌های مورد استفاده:

تجهیزات آزمایشگاهی بکار رفته در این پژوهش عبارتند از:

- دستگاه HPLC ساخت شرکت CECIL دارای تجهیزات: (Biotech 2003 degasser, UV detector CE 4300 Chromatography system manager CE 4900)
- ترازوی دیجیتال ساخت شرکت ACCULAB (مدل ALC) با دقت ۰،۰۰۰۱ گرم
- همزن مغناطیسی مدل ST 04 و شیکر مدل SH 02 ساخت شرکت Pars Azma Co
- دستگاه آب دیونیزه ساخت شرکت ELGA مجهز به فیلتر LC 136
- دستگاه pH متر ساخت شرکت Metrohm مدل 827 pHlab

نمونه‌های داروئی:

باتوجه به هدف مطالعه و محدودیت تولید اکسی‌توسین در داخل کشور توسط دو کارخانه داروسازی و همچنین محدودیت تجویز و مصرف اکسی‌توسین در بیمارستان‌های مرتبط، فقط امکان انتخاب تعداد ۵ بسته نمونه اکسی‌توسین تجاری موجود در بازار داروئی ایران با شماره سریال‌های متفاوت در زمان انجام این طرح، از داروخانه‌ها و مراکز پخش داروئی سطح شهر ارومیه میسر گردید. همچنین یک نمونه اکسی‌توسین ساخت کارخانه Rotexmedica از کشور آلمان غربی جهت مقایسه با نمونه‌های تولید داخل انتخاب شد. نمونه‌ها شامل ۳ نوع بسته بندی از آمپول‌های تزریقی ساخت کارخانجات تولیدی داخل و خارج از کشور بودند که مشخصات هرکدام به تفصیل در جدول (۱) آورده شده است.

جدول (۱): مشخصات نمونه‌های داروئی اکسی‌توسین موجود در بازار داروئی ایران

شماره سریال	مقدار دارو	شرکت سازنده
00582	10 IU/ml	Rotexmedica
۹۰۸۹	۱۰IU/ml	ابوریحان
۷۰۰۶	۵ IU/ml	ابوریحان
۲۹۱	۱۰IU/ml	کاسپین
۰۳۰	۵ IU/ml	کاسپین

(هر ۱۲/۵ واحد IU (International Unit) حاوی ۲۱/۴ میکروگرم اکسی‌توسین سنتتیک می‌باشد[1])

[1] Martindale, Thirty third edition, 2002

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

محلول مادر اکسی‌توسین:

به این منظور ابتدا محلول مادر اکسی‌توسین با انحلال مقدار یک میلی‌گرم از نمونه اکسی‌توسین استات خالص در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه تهیه گردید. غلظت محلول حاصل، برابر۵۰۰IU/ml و به‌عنوان محلول مادر اکسی‌توسین در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد در داخل یخچال نگهداری گردید.

تهیه نمونه‌های استاندارد:

برای رسم منحنی کالیبراسیون، نیاز به غلظت‌های مختلفی از محلول اکسی‌توسین خالص بود که به عنوان نمونه استاندارد با غلظت معین مورد استفاده قرار گیرند. بدین منظور با رقیق سازی این محلول توسط مقادیر مشخص آب دیونیزه، غلظت‌های کاهشی مختلفی از محلول اکسی‌توسین استاندارد در محدوده غلظتی ۰/۱۵-۱۲IU/ml آماده شد.

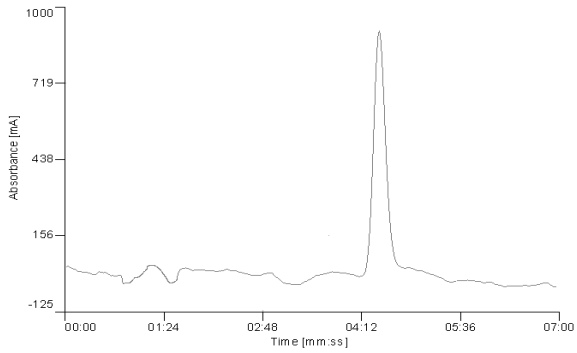
روش تعیین مقدار ماده مؤثره:

در پژوهش حاضر، پس از بررسی مقالات متعدد نمایه شده در منابع علمی، روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (۴) با توجه به امکان اجرای آن در آزمایشگاه با اعمال تغییرات جزئی، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور انجام آزمایش‌های مربوط به تعیین مقدار ماده مؤثره اکسی‌توسین در هر یک از فرآورده‌های دارویی، از سیستم HPLC مجهز به ستون Hypersil C_{18} با ابعاد (۴/۱۶× ۱۵۰ mm،۵µm) استفاده گردید. با کمک این سیستم جداسازی تحت شرایط ایزوکراتیک و با استفاده از محلول فاز متحرک شامل (V/V) ۲۰% استونیتریل در بافر فسفات ۸۰ میلی مولار (pH=۵) با سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه و آشکار ساز UV در طول موج ۲۲۰ nm انجام گرفت. حجم تزریقی نمونه‌های ۱۰ واحدی، ۱۰ میکرولیتر و برای نمونه‌های ۵ واحدی ۲۰ میکرولیتر انتخاب گردید و از ارتفاع پیک‌های کروماتوگرام جهت سنجش کمّی استفاده شد که داده‌های حاصل توسط نرم افزار Excel پردازش گردید. لازم به توضیح است که اکسی‌توسین تنها به شکل دارویی تزریقی تولید و عرضه می‌گردد، لذا نیازی به مراحل استخراج و خالص‌سازی ماده مؤثره قبل از فرآیند اندازه‌گیری بر اساس تعریف فارماکوپه آمریکا (USP) نمی‌باشد.

یافته‌ها

کروماتوگرام ترکیب اکسی‌توسین:

بعد از فراهم نمودن شرایط انجام آزمایش، ۲۰ میکرو لیتر از نمونه اکسی‌توسین خالص به ستون تزریق گردید و خروج نمونه از ستون توسط آشکارساز فرابنفش در طول موج ۲۲۰ نانومتر ردیابی شد. تصویر کروماتوگرام مربوط به ترکیب اکسی‌توسین خالص در شکل (۲) آورده شده است که به‌صورت یک پیک تیز با زمان بازداری ۴/۲۰ دقیقه مشاهده می‌شود.

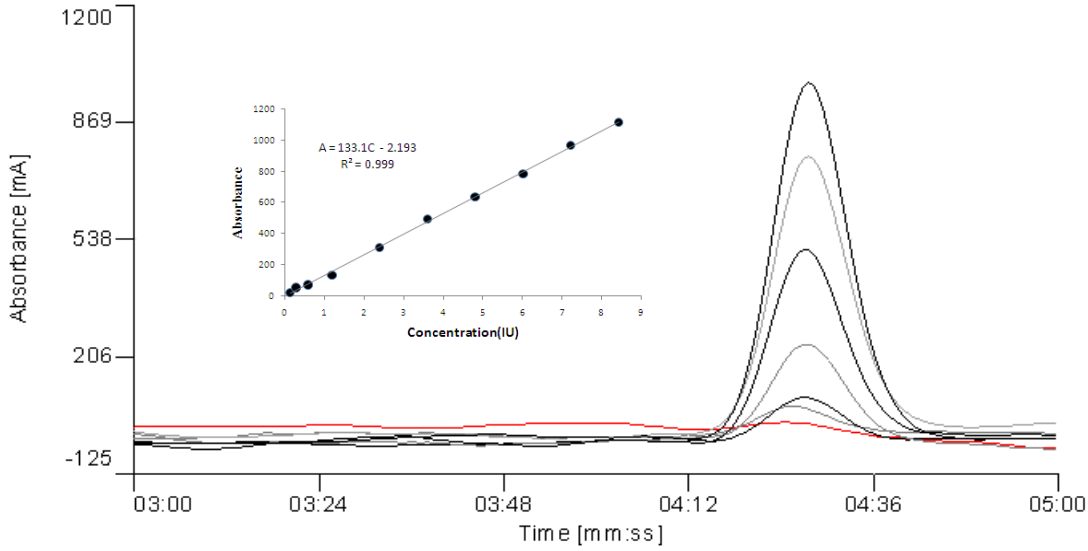


شکل(۲): تصویر کروماتوگرام مربوط به اکسی‌توسین خالص (زمان بازداری= ۴/۲ دقیقه، غلظت ۱۰ IU)

بررسی خطی بودن منحنی استاندارد:

پس از رسم منحنی استاندارد (شکل (۳)) بر اساس شدت پاسخ آشکارساز نسبت به غلظت‌های مختلف محلول استاندارد اکسی‌توسین، نتایج مربوطه نشان دهنده وجود یک رابطه خطی بین غلظت ماده مؤثره و شدت پاسخ آشکارساز در محدوده غلظتی ۰/۱۵-۱۲ IU/ml است. مقدار ضریب همبستگی R^2=۰/۹۹ و معادله منحنی A=۱۳۳/۱C – ۲/۱۹۳ حاصل شد. بنابراین باتوجه به دوزهای تجاری داروی اکسی‌توسین، این منحنی یک منحنی کاملاً ایده‌آل و قابل اطمینان جهت ارزیابی مقدار اکسی‌توسین در آمپول‌های موجود در بازار داروئی می‌باشد.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017



شکل (۳): منحنی کالیبراسیون نمونه‌های استاندارد اکسی‌توسین در محدوده غلظتی ۱۲-۰/۱۵ IU/ml

تعیین حد حساسیت روش اندازه گیری:

برای تعیین حد حساسیت روش، مقادیر متفاوت از غلظت‌های کاهشی محلول استاندارد تهیه و به‌ترتیب به ستون کروماتوگرافی تزریق می‌گردد تا حد تشخیص نمونه توسط آشکارساز مشخص گردد. در این روش حد تشخیص ۰/۲۵ IU/ml حاصل گردید.

بررسی دقت و صحت روش:

میزان دقت و صحت (تکرارپذیری نتایج) روش تجزیه‌ای انتخاب شده در این آزمایش نیز با محاسبه دقت و صحت نتایج حاصل شده ارزیابی گردید. به این منظور میزان تغییرات درون روزی و بین روزی از طریق محاسبه مقدار انحراف معیار، ضریب واریانس و درصد دقت مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بررسی تغییرات درون روزی:

به‌منظور پایش تغییرات درون روزی، ۳ غلظت مختلف محلول اکسی‌توسین(۱/۲،۲/۵،۵IU/ml)مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ۳ بار تکرار اندازه‌گیری هر یک از نمونه‌های فوق در یک روز در جدول (۲) آورده شده است.

جدول (۱): نتایج مربوط به بررسی تغییرات درون روزی غلظت‌های مختلف محلول استاندارد اکسی‌توسین

غلظت استاندارد(IU/ml)	میانگین غلظت اندازه گیری شده(IU/ml)	SD	CV %	Accuracy %
۱/۲	۱/۲۹	۰/۱۲	۹/۹۳	۱۰۷/۵
۲/۵	۲/۶۴	۰/۱۱	۴/۲۷	۱۰۵/۶
۵	۴/۸۲	۰/۰۹	۱/۹۷	۹۶/۴

بررسی تغییرات بین روزی:

به منظور پایش تغییرات بین روزی، این‌بار نیز۳ غلظت متفاوت محلول اکسی‌توسین (۱/۲،۲/۵،۵ IU/ml) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تکرار اندازه گیری هر یک از نمونه‌های فوق در ۳ روز متوالی در جدول (۳) آورده شده است.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

جدول (۳): نتایج مربوط به بررسی تغییرات بین روزی غلظت‌های مختلف محلول استاندارد اکسی‌توسین

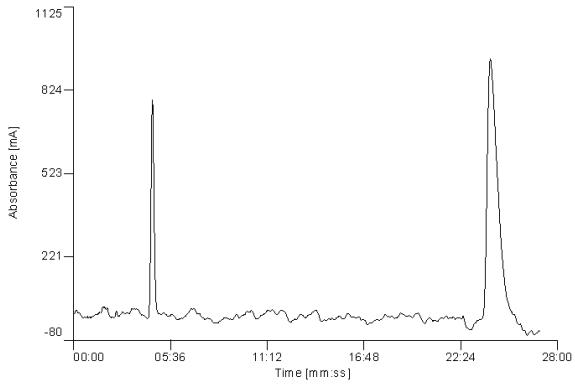
غلظت استاندارد(IU/ml)	میانگین غلظت اندازه گیری شده(IU/ml)	SD	CV %	Accuracy %
۱/۲	۱/۱۹	۰/۰۱	۱/۱۰	۹۹/۱۷
۲/۵	۲/۴۹	۰/۰۸	۴/۹۶	۹۹/۶۰
۵	۴/۶۵	۰/۰۸	۱/۷۶	۹۳

نتایج تعیین مقدار ماده مؤثره:

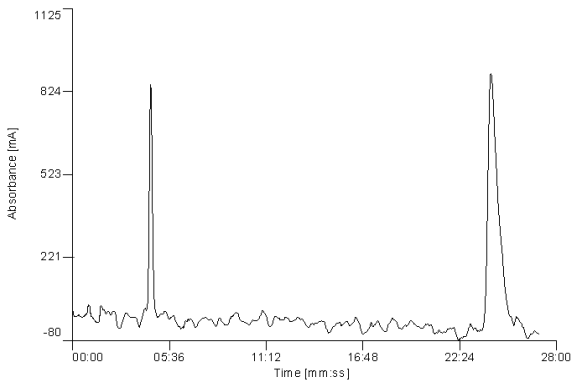
همان‌طور که در مقدمه اشاره شد، روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری اکسی‌توسین در اشکال دارویی معرفی شده‌اند که پس از مطالعه و بررسی این روش‌ها و استفاده از متون علمی منابع معتبر و مراجع بین‌المللی فارماکوپه USP مناسب‌ترین روش اندازه‌گیری انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت (۸). در این آزمایشات نمونه‌ها با استفاده از رسم منحنی کالیبراسیون مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. به منظور بررسی تکرارپذیری (دقت و صحت) سیستم و روش تجزیه‌ای، تغییرات درون روزی و بین روزی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آنالیز نمونه‌ها نشان دادند که برای ۳ غلظت ذکر شده،ضریب تغییرات درون روزی بین ۹/۹۳-۱/۹۷ و ضریب تغییرات بین روزی، بین ۱/۷۶-۱/۱۰ قرار داشت. همچنین درصد دقت به ترتیب بین ۱۰۷/۵-۹۶/۴ و ۹۹/۶۰-۹۳ برای تغییرات درون روزی و تغییرات بین روزی بدست آمد. باتوجه به مقادیر فوق و اطمینان از دقت و صحت روش، نمونه‌های اکسی‌توسین تجاری مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده از این آزمایشات در جدول (۴) و کروماتوگرام‌های مربوطه در اشکال (۴)-(۹) آورده شده است.

جدول (۴): نتایج حاصل از اندازه گیری نمونه‌های آمپول اکسی‌توسین موجود در بازار دارویی ایران

شرکت سازنده آمپول اکسی‌توسین	شماره سریال	تاریخ ساخت	تاریخ انقضاء	مقدار ماده مؤثره طبق برچسب کارخانه سازنده (IU/ml)	مقدار اندازه گیری شده (IU/ml)
Rotexmedica	۰۰۵۸۲	-	10/2013	۱۰	۱۰/۶±۰/۰۸
ابوریحان	۹۰۸۹	11/2010	11/2012	۱۰	۱۲/۰۳±۰/۲۸
ابوریحان	۷۰۰۶	10/2010	10/2012	۵	۱۰/۸۳±۰/۳۵
کاسپین	۲۸۹	-	04/2014	۱۰	۱۰/۷۹±۱۰/۰۷
کاسپین	۰۳۰	-	05/2013	۵	۵/۷۱ ±۵/۷۷

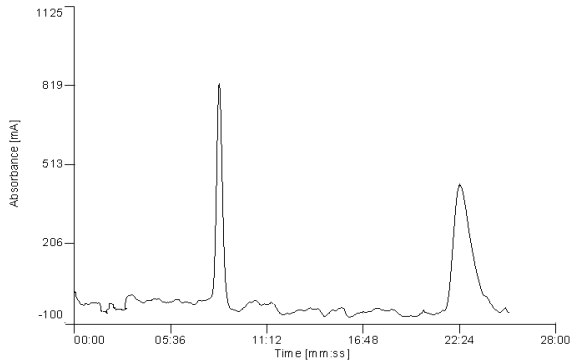


شکل(۴):ابوریحان (۵IU) شماره سریال: ۷۰۰۶ حجم تزریقی ۲۰ میکرولیتر

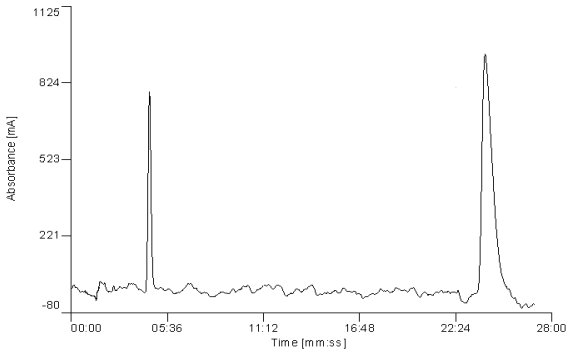


شکل(۵): ابوریحان (۱۰IU) شماره سریال: ۹۰۸۹

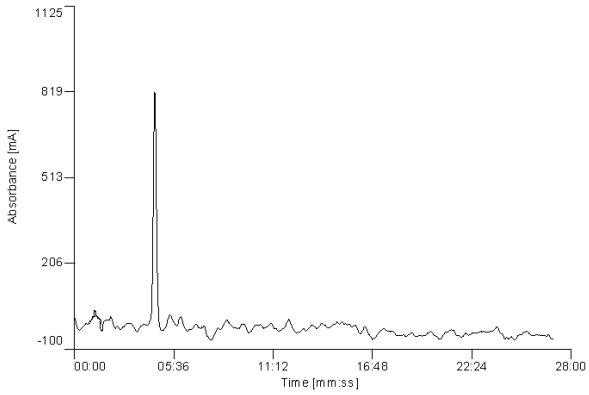
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017



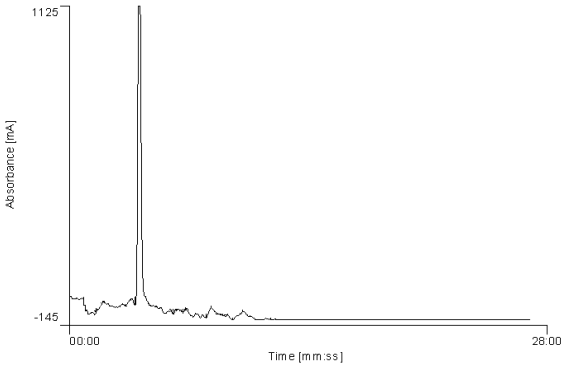
شکل(۶): نمونه کاسپین (IU ۵) شماره سریال: ۰۳۰



شکل(۷): نمونه کاسپین (IU ۱۰) شماره سریال: ۲۸۹



شکل(۸): نمونه Rotexmedica شماره سریال:00582



شکل(۹): نمونه استاندارد اکسی‌توسین(sigma)

بحث

معمولاً در واحدهای تحقیق و توسعه شرکت‌های داروسازی پس از مطالعه و ارائه فرمولاسیون‌های مختلف برای یک دارو، به منظور رسیدن به اثر درمانی مطلوب و کاستن عوارض درمانی، کنترل کیفی فرآورده دارویی در طی مراحل تولید و بررسی اثرات بیولوژیک آن اهمیت فراوانی دارد. به‌طور کلی پس از تولید یک فرآورده دارویی، با توجه به کیفیت و فرمولاسیون دارو و یا به واسطه اثرات متقابل مواد متشکله فرمولاسیون، بسته‌بندی، زمان و شرایط انبارش، نحوه حمل و نقل، توزیع، عرضه و حتی روش مصرف ممکن است تغییراتی در کیفیت یک فرآورده دارویی ایجاد شود و کیفیت فرآورده تنزل نماید. در این راستا کیفیت دارو غیر از کنترل در آزمایشگاه‌های صنایع داروسازی، در آزمایشگاه‌های ذی‌صلاح نیز قابل ارزیابی است. نظر به اهمیت و گسترش مصرف اکسی‌توسین و ضرورت کنترل دقیق دارو از نظر مقدار ماده مؤثره، پس از راه اندازی و معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با آشکارساز فرابنفش، آزمایشات اندازه‌گیری ماده مؤثره دارو انجام شد. بررسی منحنی کالیبراسیون روش تجزیه‌ای راه اندازی شده، نشان می‌دهد که این فن یک روش کاملاً مناسب و مورد اطمینان برای انجام آزمایشات اندازه‌گیری اکسی‌توسین می‌باشد. همچنین دقت و صحت روش تجزیه‌ای مورد استفاده در آزمایشات درون روزی و بین روزی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج ارائه شده در جداول (۲) و (۳) میانگین، انحراف استاندارد و درصد ضریب از مقادیر قابل قبولی برخوردار بودند.

نتیجه‌گیری

بررسی نتایج مربوط به معتبرسازی روش تجزیه‌ای نشان می‌دهد که این روش از حد تشخیص مطلوب، دامنه خطی نسبتاً گسترده، دقت و صحت کافی، توانمندی دستیابی به جداسازی

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

روی پایه پلیمری ستونRP فاز معکوس در زمان کوتاه و از استحکام کافی برخوردار است. به‌گونه ای که استفاده از آن را می‌توان برای تعیین مقدار غلظت‌های پلاسمایی دارو و انجام مطالعات کینتیک دارو پیشنهاد نمود.

بررسی کروماتوگرام‌های حاصل از اشکال داروئی کارخانجات داخل کشور و مقایسه آن با نمونه مشابه خارجی و همچنین نمونه خالص کمپانی سیگما نشان می‌دهد که در نمونه‌های داخلی یک پیک اضافی در زمان بازداری ۲۳ دقیقه ظاهر می‌گردد، در حالی که در نمونه خارجی و نمونه خالص سیگما چنین پیکی مشاهده نشده است. در رابطه با ماهیت این پیک در نمونه‌های داخل نمی‌توان اظهار نظر نمود مگر اینکه به فن‌های پیشرفته از جمله کروماتوگرافی گازی با آشکارساز جرمی (GC-Mass) متوسل شویم که نیاز به وجود مراکز مجهزتر را می‌طلبید.

اگر این پیک اضافی به‌عنوان یک ماده ناخالص فرض گردد، شاید دلیل پایین بودن کارائی داروهای موجود را بتوان توجیه نمود. یعنی همان گزارشی که ما را وادار به انجام این پژوهش نمود. (این گزارش از بخش بیمارستان زنان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در رابطه با کارائی نامناسب اشکال داروئی اکسی‌توسین مورد استفاده در بخش‌های بستری بود.)

بالا بودن غلظت اکسی‌توسین ۵ واحدی در یک سری از کارخانه داروسازی ابوریحان لزوم پیگیری موضوع را از واحد کنترل کارخانه فوق را می‌طلبد، البته ناگفته نماند که جهت بررسی موضوع می‌بایست نمونه‌های زیاد با شماره سریال‌های مختلف ساخت را جمع آوری نموده و نسبت به مقدار اکسی‌توسین در این نمونه‌ها اظهار نظر قطعی نمود. متأسفانه با توجه به محدودیت تولید آمپول اکسی‌توسین و عرضه و مصرف کم آن در مراکز مورد مصرف، امکان پی‌گیری و تکرار اندازه‌گیری نمونه‌ها ممکن نگردید.

برای توجیه ناکافی بودن کارائی بالینی اکسی‌توسین بر اساس گزارش ذکر شده، به نظر می‌رسد که آزمایش آمپول‌های اکسی‌توسین در محیط‌های با ارگان‌های زنده حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند مفید واقع گردد.این موضوع به عنوان یکی از اهداف آینده پژوهش فوق در نظر گرفته خواهد شد.

با تمامی اوصاف فوق، لزوم کنترل‌های کمی و کیفی داروهای ساخته شده در لابراتوارهای داروسازی ایران توسط آزمایشگاه‌های کنترل به‌طور مرتب و منظم ضروری به‌نظر می‌رسد. در ضمن لازم است نتایج کنترل‌های داروئی به صورت گزارش به اطلاع مراکز دست‌اندرکار رسانده شود تا در برنامه‌های تولید داروها مد نظر قرار بگیرد. همچنین تدوین دستورالعمل‌ها و ضوابط کنترل کمی و کیفی داروها بر اساس فارماکوپه‌های بین‌المللی و مقالات علمی جزء برنامه واحدهای داروئی در نظر گرفته شود. طراحی پژوهش‌های کاربردی و ارائه نتایج آن‌ها جهت ارتقای کیفیت، پیشنهاد فرمولاسیون‌های جدید، روش‌های انبارش مناسب، آموزش کارشناسان و توزیع مطلوب دارو با در نظر گرفتن استاندارهای رایج، همواره باید مد نظر مسئولین امر قرار بگیرد.

لازم به توضیح است که از آنجائی‌که تعداد نمونه‌های داروئی اکسی‌توسین در بازار داروئی ایران محدود بوده و در حال حاضر تنها دو کارخانه داخلی این فراورده داخلی را تولید می‌نمایند و در ضمن به خاطر محدودیت مصرف این دارو نمی‌توان از سریال‌های تولیدی بیشتری نمونه جمع‌آوری نمود. نهایتاً ما در این پروژه محدودیت نمونه با توجه به ذکر دلائل فوق داشته‌ایم.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه جهت حمایت مالی در اجرای پروژه حاضر در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، قدردانی می‌نماییم.

References:

1. MacDonald K, Marie MacDonald T. The Peptide That Binds: A Systematic Review of Oxytocin and its Prosocial Effects in Humans. Harv Rev Psychiatry. 2010; 18: 1-21
2. Karbiwnyk ChM, Faul KC, Turnipseed ShB, Andersen WC, Miller K E. Determination of oxytocin in a dilute IV solution by LC–MS. J Pharm Biomed Anal. 2008; 48: 672–677
3. Patil JT, Jain RS, Sharma MR, Shah RR. Development and validation of high performance liquid chromatography method for quantification of oxytocin in injectable formulation. Ars Pharm 2005; 46 (4): 399-410
4. Chaibva FA, Walker RB. Development and validation of a stability-indicating analytical method for the quantitation of oxytocin in pharmaceutical dosage forms. J Pharm Biomed Anal. 2007; 43: 179–185
5. Hawe A, Poole R, Romeijn S, Kasper P, Heijden R, Jiskoot1 W. Towards Heat-stable Oxytocin Formulations: Analysis of Degradation Kinetics

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

and Identification of Degradation Products. Pharma Res 2009; 26(7): 1679-88.

6. Ryali S, Bobbarala V, Varadhacharyulu P. Development and validation of a stability-indicating analytica Method for the quantitation of Oxytocin. Int J Chemical and Analytical Sci 2011; 2(10): 1222-5.
7. Ban EM, Kim D, Yoo EA, Yoo YS. Separation and determination of neuropeptides in human plasma by capillary zone electrophoresis. Anal Sci 1197; 13: 489-92.
8. Ashenafi D, Hemelrijck EV, Chopra Sh, Hoogmartens J, Adams E. Liquid chromatographic analysis of oxytocin and its related substances. J Pharm Biomed Anal 2010; 51: 24–9.
9. Kannan V, Gadamsetty D, Rose M, Maria S, Mustafa I, Khedkar A, et al. Quantitative determination of oxytocin receptor antagonist atosiban in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010;878(15-16):1069–76.
10. Wang G, Miller RB, Melendez L, Jacobus R. A stability-indicating HPLC method for the determination of oxytocin acetate in oxytocin injection, USP, synthetic. J liquid chromatography& related technology 1997; 20(4): 567-81.
11. Brown DS, Jenke DR. Determination of trace levels of oxytocin in pharmaceutical solutions by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1987;410(1):157–68.
12. Kukucka MA, Misra HP. Determination of oxytocin in biological samples by isocratic high-performance liquid chromatography with coulometric detection using C18 solid-phase extraction and polyclonal antibody-based immunoaffinity column purification. J Chromatogr B, Biomed Appl 1994;653(2):139–45.
13. Matuszewski BK, Chavez-Eng CM, Constanzer ML. Development of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the determination of a new oxytocin receptor antagonist (L-368,899) extracted from human plasma and urine: a case of lack of specificity due to the presence of metabolites. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998;716(1-2):195–208.

Original Article

QUANTIFICATION OF OXYTOCIN IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AVAILABLE IN DRUG MARKET OF IRAN BY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD (HPLC)

*A'zam Akbari[1], Amir Heydari[2]**

Received: 26 Oct, 2013; Accepted: 19 Dec, 2013

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

Abstract:

***Background & Aims*:** Quality control of medicinal products- especially the amount of active ingredients of toxic side effects and complications- is important. The present study was performed to measure oxytocin (OT) in commercially available drug products in the drug market of Iran.

***Materials & Methods*:** In this study pharmaceutical dosage form of OT with different brands at a concentration of 5 and 10 IU/ml was prepared from a local pharmacy. A previously published method was optimized for the conditions in our laboratory. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used as the preferred analytical tool. The method used a C_{18} column. The mobile phase consist of acetonitrile/ phosphate buffer with (pH= 5, 0.08 M) (20:80) and UV detection at 220 nm.

***Results*:** The results of these experiments showed a linear standard curve for OT over the range of 0.5-12 IU/ml. The corresponding regression equation was A=133.1C-2.193 with an r^2 value of 0.99. The Inter-day coefficient of variation for the method ranged between 1.97 IU/ml and 9.93 IU/ml% and the Intra-day value ranged between 1.10 IU/ml and 1.76 IU/ml. The accuracy of method range was between 96.40% and 107.5% for Inter-day analysis and 93% and 99.6 % for Intra-days analysis. The lower limit of quantification was 0.25 IU/ml. The percentage content, taking one of the bulk samples as 100% references, was 107-120% and 114.2-216.6% recovery of the label claim for OT of 10IU/ml and OT of 5 IU/ml, respectively.

Conclusion: These findings confirm that the amount of oxytocin in some of dosage forms is higher than the declared amounts. This study emphasizes on the necessity of quality and accurate controls over the industrial pharmaceutical.

***Keywords*:** Oxytocin, HPLC, Pharmaceutical dosage form, Ultra violet detector

Address: Center for Cellular and Molecular Research, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, **Tel**: +98 441 2754991
Email: heydari.866@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2014: 24(12): 965 ISSN: 1027-3727

[1] *M.Sc of Analytical Chemistry, Center for Cellular and Molecular Research, UrmiaUniversity of Medical Sciences*
[2] *Assistant Professor of Pharmacology (PhD, Pharm D), Center for Cellular and Molecular Research, Faculty of Medicine, UrmiaUniversity of Medical Sciences (Corresponding Author)*