مقاله پژوهشی

اندازه‌گیری اکسی‌توسین در سرم انسانی و فراورده‌های دارویی موجود در بازار ایران به روش میکرواستخراج

مائده اسکندری آذر[1]، محمدرضا وردست[2]*

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: با توجه به اهمیت و کاربرد بالای اکسی‌توسین در سرم و فرآورده دارویی و تأثیری که مقادیر کم یا زیاد آن براثر دارو و همچنین عوارض جانبی ناخواسته دارو می‌گذارد، ازاین‌رو هدف از این مطالعه توسعه و اعتبارسنجی روش میکرواستخراج حلال پخشی (DLLME) برای اندازه‌گیری سریع و دقیق اکسی توسین در سرم و فراورده‌های دارویی است.

مواد و روش کار: در این مطالعه از روش میکرواستخراج حلال پخشی با ترکیب مناسب تتراکلریدکربن به‌عنوان حلال استخراج‌کننده و استونیتریل به‌عنوان حلال پخش‌کننده انتخاب و بهینه شد و سایر پارامترها ازجمله دما، سرعت هم زدن و ... بررسی و بهینه شد و آنالیزها با کروماتوگرافی گازی با دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای صورت گرفت. مواد مورداستفاده: اکسی‌توسین، حلال اتانول، حلال متانول، استون، دی کلرومتان، تتراکلریدکربن، استونیتریل، کلسی‌تونین (استاندارد داخلی) می‌باشند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت اکسی‌توسین در سرم و ویال‌های دو شرکت A,B در دو دوز ۱۰IU/mL و ۵ نشان می‌دهد که نمونه‌های شرکت A دارای نتایج قابل‌قبول‌تری نسبت به B در خصوص دوز اسمی بر روی ویال بوده و غلظت آن در شرکت B پایین‌تر از شرکت A است. در ضمن نمونه خارجی اکسی‌توسین از شرکت آلمانی (Rotexmedia) هم برای بررسی روش و مقایسه با ویال‌های داخلی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و نتایج نمونه‌های داخلی قابل‌مقایسه با این برند خارجی بوده است و تفاوت معناداری ازنظر آماری ندارند. روش بکار رفته دارای محدوده خطی ۰/۰۲ IU/mL – ۶۰ و معادله خطی A=190731C-21483 با ضریب همبستگی R^2= 0.999 است.

بحث و نتیجه‌گیری: روش میکرواستخراج حلال پخشی توسعه‌یافته ابزاری ساده، کم‌هزینه و کارا برای کنترل کیفی ویال‌های اکسی‌توسین بوده و روشی کارآمد در اندازه‌گیری‌های سطح سرمی اکسی توسین را فراهم می‌کند و نتایج نشان‌دهنده تفاوت در غلظت بین برندهای موجود در بازار و امکان اندازه‌گیری دقیق آن در نمونه سرم بود.

کلیدواژه‌ها: اکسی‌توسین، بهینه‌سازی، حلال پخش‌کننده، حلال استخراج‌کننده، میکرواستخراج

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره دوازدهم، ص ۱۰۴۴-۱۰۳۵، اسفند ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۴۹۹۰ داخلی ۱۵۲

Email: mrvardast@gmail.com, vardast.mr@umsu.ac.ir

مقدمه

کنترل کیفیت نقش مهمی در تضمین ایمنی، کارایی و قابلیت اطمینان محصولات دارویی ایفا می‌کند (۱). کنترل کیفیت دارویی شامل طیف وسیعی از فعالیت‌ها و رویه‌هایی است که برای نظارت و ارزیابی هر مرحله از فرآیند توسعه و تولید دارو طراحی شده‌اند. این شامل آزمایش، بازرسی و تجزیه‌وتحلیل دقیق است تا اطمینان حاصل شود که محصولات دارویی با مشخصات، دستورالعمل‌های نظارتی و استانداردهای صنعت مطابقت دارند. هدف اصلی کنترل کیفیت در داروسازی جلوگیری از توزیع داروهای نامرغوب یا بالقوه مضر برای بیماران است (۲). با اجرای اقدامات کنترل کیفیت قوی، شرکت‌های داروسازی می‌توانند خطرات را به حداقل برسانند، ثبات محصول را حفظ کنند. اکسی‌توسین تزریقی، درمان استاندارد طلایی برای مدیریت خونریزی پس از زایمان، چالش خاصی در این زمینه ایجاد می‌کند که در بسیاری از موارد جلوی خونریزی منجر

[1] دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[2] استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

به مرگ مادر را می‌گیرد (۳-۶). اکسی‌توسین یک هورمون پپتیدی است که از ۹ اسیدآمینه تشکیل شده است. اکسی‌توسین در هیپوتالاموس، ناحیه‌ای از مغز تولید می‌شود و توسط غده هیپوفیز خلفی وارد جریان خون می‌شود ساختار شیمیایی آن شامل یک حلقه پپتیدی حلقوی با پیوند دی‌سولفیدی است که بین دو اسیدآمینه تشکیل شده است. این پیوند دی‌سولفیدی به پایداری و فعالیت بیولوژیکی اکسی‌توسین کمک می‌کند (۷). فرمول مولکولی اکسی‌توسین $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ است (۸). وزن مولکولی اکسی‌توسین تقریباً ۱۰۰۷/۱۹ گرم بر مول است. توالی اسیدآمینه اکسی‌توسین به شرح زیر است: -Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly. این توالی خاص برای فعالیت بیولوژیکی اکسی‌توسین و اتصال به گیرنده‌های آن ضروری است (۹). ازنظر تاریخی، اکسی‌توسین برای نقش آن در زایمان و شیردهی شناخته شده است. این انقباضات را در هنگام زایمان تحریک می‌کند، به تسهیل زایمان و ترشح شیر مادر کمک می‌کند (۱۰). کاربردهای دارویی اکسی‌توسین فراتر از سلامت باروری است و شامل درمان خونریزی پس از زایمان، القای زایمان و مدیریت برخی اختلالات روان‌پزشکی نظیر اختلالات اوتیسم، اضطراب اجتماعی، افسردگی و حتی برخی اختلالات عصبی-رشدی می‌شود (۱۱، ۱۲). اندازه‌گیری دقیق اکسی‌توسین مستلزم جمع‌آوری نمونه‌های بیولوژیکی است که سطوح آن را در بدن منعکس می‌کند. شایع‌ترین منابع این نمونه‌ها شامل پلاسمای خون، بزاق، ادرار و مایع مغزی نخاعی است (۱۳). هر منبع مزایا و ملاحظات منحصربه‌فردی را ارائه می‌دهد و محققان را قادر می‌سازد تا اکسی‌توسین را در زمینه‌های مختلف بررسی کنند. چندین فن استخراج برای بازیابی کارآمد اکسی‌توسین از محصولات دارویی و نمونه‌های سرم استفاده می‌شود. انتخاب روش استخراج به عواملی مانند نوع فرمولاسیون، ماتریس نمونه، سطح خلوص موردنظر و الزامات آنالیز بعدی بستگی دارد.

Liu و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه‌ای، یک استخراج کارآمد مایع-مایع به کمک نمک برای پلاسما ایجاد کردند و سپس نمونه‌ها را با استفاده از nano-LC-MS برای تعیین کمیت اکسی‌توسین دست‌نخورده در پلاسمای انسان و موش تجزیه‌وتحلیل کردند (۱۴). Arjona و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای، یک روش جدید برای اندازه‌گیری اکسی‌توسین توسعه دادند و برای اندازه‌گیری تغییرات احتمالی اکسی‌توسین در بزاق خوک‌های ماده در روزهای مختلف پس از زایمان استفاده شد (۱۵). Moriyama و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای یک روش ساده و حساس برای تجزیه‌وتحلیل اکسی‌توسین با استفاده از میکرواستخراج خودکار فاز جامد درون لوله‌ای (SPME) همراه با کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی پشت سر هم (LC-MS/MS) ایجاد کردند (۱۶). اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای به بررسی اندازه‌گیری اکسی‌توسین در فرآورده‌های داروئی موجود در بازار داروئی ایران به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا(HPLC) پرداختند (۱۷). در این مطالعه با توجه به ضرورت‌های استخراجی روش میکرو استخراج حلال پخشی برای استخراج آنالیت از نمونه‌های دارویی و سرم خون بکار رفته است (۱۸)، که دارای مزایایی چون کاهش حجم نمونه، کاهش مصرف حلال، افزایش حساسیت و بهبود کارایی استخراج است (۱۹-۲۱). در ضمن برای آنالیز نمونه‌های استخراجی هم از کروماتوگرافی گازی استفاده شده است. که با توجه به هزینه پایین و زمان آنالیز کم و حساسیت بالا از اهمیت بالایی برخوردار بوده است. هدف این مطالعه، توسعه و اعتبارسنجی روش میکرواستخراج حلال پخشی برای اندازه‌گیری دقیق اکسی‌توسین در سرم انسانی و فرآورده‌های دارویی موجود در بازار ایران است این دارو قبلاً با کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری نشده است و با توجه به مزایای کروماتوگرافی گازی نسبت به سایر روش‌ها و تلفیق آن با میکرواستخراج حلال پخشی، این روش نوعی استخراج شیمی سبز با هزینه کم و کارایی بالا محسوب می‌گردد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی مورداستفاده:

استاندارد اکسی‌توسین استات از شرکت سیگما-آلدریچ (sigma aldich) و کلسی‌تونین از شرکت مرک (Merck)، اتانول، متانول، استون، تتراکلریدکربن، کلرفرم، دی‌کلرومتان، استونیتریل و آب دیونیزه همگی از شرکت مرک (Merck) تهیه گردید.

تجهیزات آزمایشگاهی:

ترازوی چهار صفر مدل Atiolon Acculab، حمام اولتراسونیک مدل Nohand Parsonic، هیتر و همزن مغناطیسی مدل Heidolph دماسنج الکلی، دستگاه GC مدل Shimadzu (با نرم‌افزار Labsolution).

روش کار

برای تهیه محلول مادر اکسی‌توسین و کلسی‌تونین حدود ۱ میلی‌گرم از نمونه خالص در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول HPLC-grade تهیه گردید. غلظت محلول‌های حاصل ۵۰۰IU/mL بوده و به‌عنوان محلول مادر اکسی‌توسین و کلسی‌تونین در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. محلول‌های استاندارد ۵IU/mL و ۲ و ۰/۱ از محلول مادر تهیه و به‌عنوان محلول استاندارد برای بررسی نمونه‌های حقیقی مورد استفاده قرار گرفت. و در روند کار روی سرم آماده موجود در آزمایشگاه نیز میکرواستخراج انجام شد.

در ضمن کلسی‌تونین به‌عنوان استاندارد داخلی به همراه اکسی‌توسین استفاده شد.

برای استخراج آنالیت‌ها از میکرو استخراج حلال پخشی استفاده شد حلال پخش‌کننده استونیتریل و حلال استخراج‌کننده تتراکلریدکربن انتخاب شد. در نمونه‌های سرم حدود ۷۵۰ میکرولیتر نمونه سرم انتخاب و با ۱۵۰۰ میکرولیتر استونیتریل مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید تا پروتئین‌های موجود در نمونه سرم رسوب نماید محلول شفاف رویی را برداشته پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر تتراکلریدکربن و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر با فشار توسط یک سرنگ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه محلول حاصل سانتریفوژ و سپس محلول ته‌نشین شده جمع‌آوری شد، حدود یک میکرولیتر از محلول حاصل به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-FID) تحت شرایط بهینه تزریق و مورد آنالیز قرار گرفت. در نمونه‌های دارویی هم به‌جای نمونه سرم حدود ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برداشته شد بقیه مراحل شبیه استخراج از نمونه‌های سرم بود. شرایط دستگاه کروماتوگرافی گازی بکار رفته بهینه‌سازی گردید این شرایط در جدول (۱) خلاصه شده است.

بهینه‌سازی شرایط اندازه‌گیری و استخراج

انتخاب شرایط دستگاهی برای اندازه‌گیری:

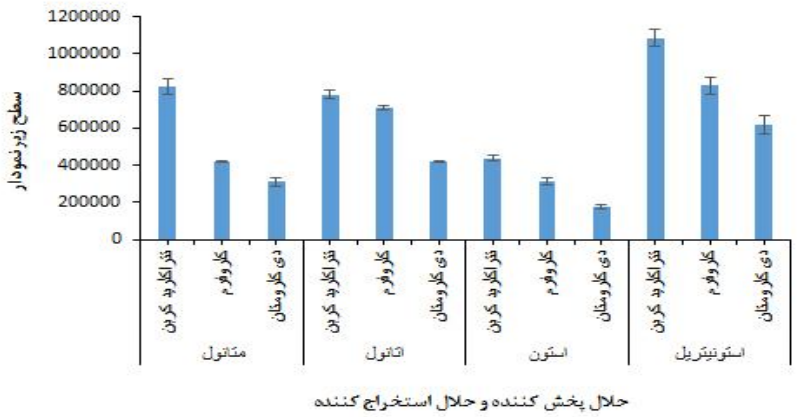
برای اندازه‌گیری اکسی توسین ابتدا شرایط دستگاهی بهینه‌سازی گردید. در خصوص دمای دریچه تزریق، دما از ۵۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد بهینه‌سازی شده و دمای ۷۰ درجه بهترین نتایج را داده است (پایین‌تر بودن دمای دریچه تزریق از دمای ستون به افزایش سطح پاسخ دتکتور منجر می‌شود). که خلاصه این شرایط دستگاهی و مقادیر بهینه‌سازی شده در جدول (۱) نمایش داده شده است.

جدول (۱): شرایط آزمایشی بکار رفته با دستگاه GC-FID

پارامتر	شرایط انتخابی
برنامه دمایی ستون	۵۰ درجه سانتی‌گراد (۲ دقیقه) با شیب ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه)
نوع ستون	Rtx 5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میلی‌متر
دریچه تزریق	۷۰ درجه سانتی‌گراد با شکافتگی ۱ به ۱۰
آشکارساز	یونیزاسیون شعله‌ای با دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد
گاز حامل	نیتروژن با خلوص ۹۹/۹۹۹٪
سوخت	هیدروژن با سرعت ۴۰ میلی‌لیتر بر دقیقه
اکسیدان	هوا با سرعت ۴۰۰ میلی‌لیتر بر دقیقه

انتخاب حلال پخش‌کننده و حلال استخراج‌کننده:

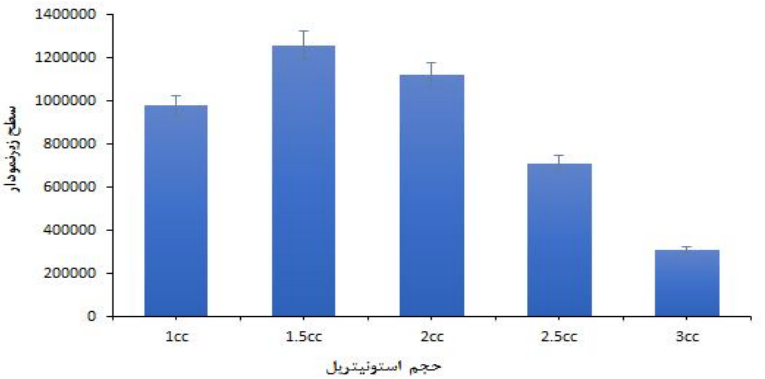
نتایج حاصل از انتخاب حلال پخش‌کننده و حلال استخراج‌کننده در نمودار زیر نشان می‌دهد که از میان حلال‌های موجود ترکیب استونیتریل به همراه حلال تتراکلریدکربن به‌عنوان بهترین ترکیب برای استخراج محسوب می‌شود.



نمودار (۱): انتخاب حلال پخش‌کننده و حلال استخراج‌کننده

بهینه‌سازی حجم حلال پخش‌کننده:

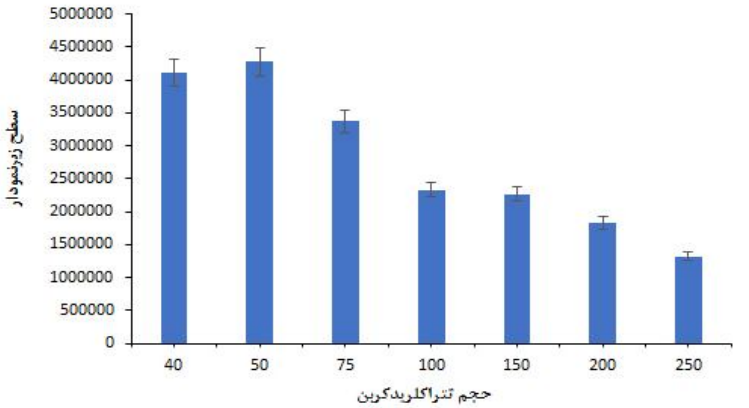
انتخاب حلال مناسب مهم‌ترین مرحله استخراج حلال پخشی است، حلال پخش‌کننده باید قابلیت امتزاج با حلال استخراج‌کننده و نیز محلول آبی را داشته باشد. چهار حلال اتانول، متانول، استونیتریل و استون در این مطالعه به‌عنوان حلال پخش‌کننده موردبررسی قرار گرفتند. از بین حلال‌هایی که انتخاب کردیم استونیتریل به‌عنوان حلال پخش‌کننده انتخاب شد ازاین‌رو برای بهینه‌سازی حجم استونیتریل حجم‌های ۱ تا ۳ با حدفاصل نیم میلی‌لیتر موردبررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان می‌دهد که حجم ۱/۵ بالاترین نتیجه را داشت. طبق این نتایج حجم ۱/۵ سی‌سی استونیتریل بهینه و انتخاب شد.



نمودار (۲): بهینه‌سازی حجم حلال پخش‌کننده

انتخاب حلال استخراج‌کننده و بهینه‌سازی حجم فاز استخراج‌کننده:

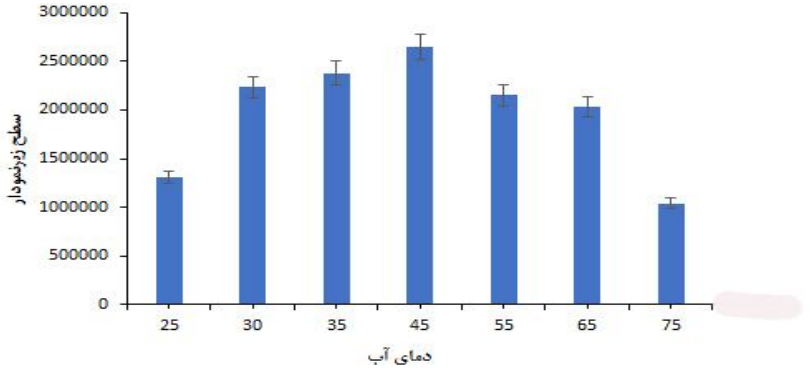
حلال استخراج‌کننده که از اهمیت بالایی برخوردار است بایستی دارای ۳ ویژگی باشد: الف) آنالیست در آن بیشتر از فاز آبی حل شود. ب) از آب سبک‌تر یا سنگین‌تر باشد. ج) هنگام افزودن به فاز آبی به همراه حلال پخش‌کننده به‌صورت قطرات ریز درآید. تمام حلال‌های کلردار سنگین‌تر از آب بوده و می‌توانند به‌عنوان حلال استخراج‌کننده استفاده شود ازاین‌رو حلال‌های تتراکلریدکربن، کلروفرم، دی کلرومتان انتخاب شد. از بین حلال‌هایی که انتخاب کردیم تتراکلریدکربن به‌عنوان حلال استخراج‌کننده انتخاب شد. برای بهینه‌سازی حجم حلال استخراج‌کننده هم ۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۷۵-۵۰-۴۰ میکرو لیتر از تتراکلریدکربن موردبررسی قرار گرفت و به همراه ۱.۵ میلی‌لیتر حلال استونیتریل برای استخراج استفاده شد و نتایج به‌صورت نمودار زیر است که نشان‌دهنده حجم بهینه ۵۰ میکرولیتر است.



نمودار (۳): بهینه‌سازی حجم حلال استخراج‌کننده

بهینه‌سازی دمای استخراج:

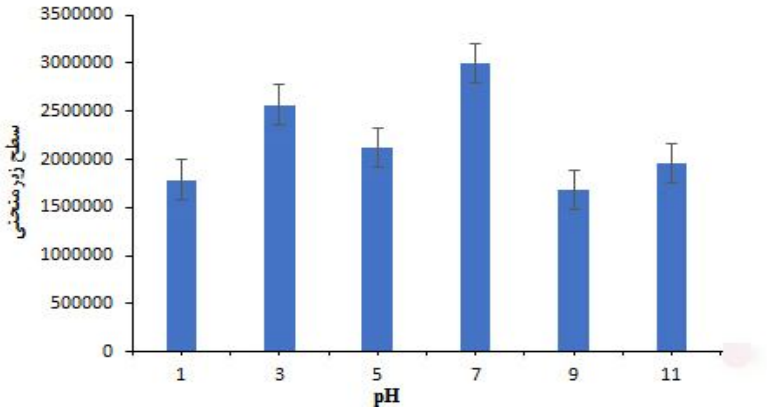
دما هم یکی از پارامترهای مهم در افزایش میزان استخراج است. دما در اکثر استخراج‌ها باعث افزایش راندمان استخراج می‌گردد. ازاین‌رو استخراج در محدوده دمایی ۷۵- ۲۵ درجه سانتی‌گراد (با حدفاصل ۵ درجه سانتی‌گراد)مورداستفاده قرار گرفت. و دمای ۴۵ درجه با توجه به نتایج به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد.



نمودار (۴): بهینه‌سازی دمای استخراج

بهینه‌سازی pH استخراج:

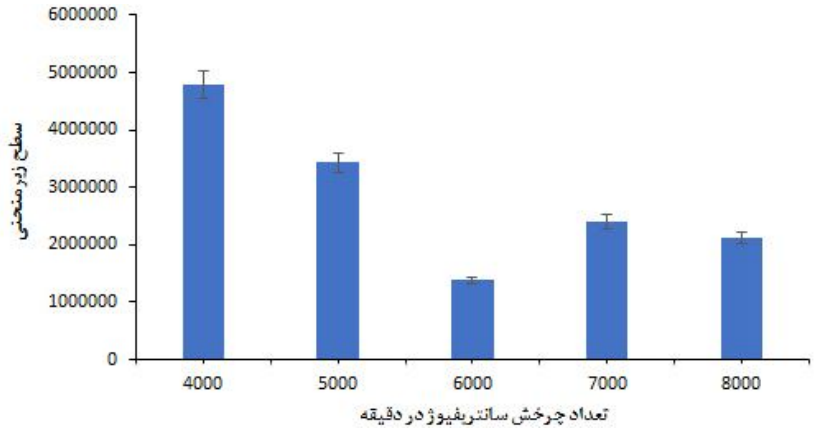
برای بررسی و انتخاب pH مناسب لازم است محدوده‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد چراکه pH نقش مؤثری در استخراج اکثر ترکیبات از محیط آبی دارد برای این منظور pH محیط استخراج در مقادیر مختلف تنظیم و بهترین pH مناسب برای استخراج انتخاب گردید. برای انتخاب pH بهینه، pH های ۱۱-۷-۵-۳-۱ موردبررسی قرار گرفت و طی آزمایش‌های مختلف، pH=۷ بیشترین سطح زیر پیک را می‌دهد پس pH=۷ به‌عنوان مقادیر بهینه انتخاب شد.



نمودار (۵): بهینه‌سازی pH محلول استخراجی

بهینه‌سازی سرعت و زمان سانتریفیوژ:

برای حصول نتیجه مناسب لازم است سرعت و زمان سانتریفیوژ بررسی گردد ازاین‌رو برای انتخاب تعداد دور چرخش سانتریفیوز در دقیقه، تعداد چرخش ۴۰۰۰ تا ۸۰۰۰ دور بر دقیقه با حدفاصل ۱۰۰۰ موردبررسی قرار گرفت. و برای بررسی زمان هم زمان‌های ۱ تا ۷ دقیقه با حدفاصل ۱ دقیقه موردبررسی قرار گرفت و مقادیر با توجه به نتایج حاصل بهترین نتیجه در ۴۰۰۰rpm به دست آمد و زمان سانتریفیوژ هم که از ۱ تا ۷ دقیقه موردبررسی قرار گرفت و بهترین زمان ۵ دقیقه بود. ازاین‌رو زمان ۵ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰rpm به‌عنوان مقادیر بهینه برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد.



نمودار (۶): بهینه‌سازی سرعت سانتریفوژ

یافته‌ها

روش بکار رفته دارای محدوده خطی ۰/۰۲IU/mL – ۶۰ و معادله خطی A= 190731C-21483 با ضریب همبستگی R^2=0.999 بوده و به ترتیب دارای حد تشخیص و حد اندازه‌گیری ۰/۰۰۶ و ۰/۰۱۸ (IU/mL) است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت اکسی‌توسین در ویال‌های دو شرکت A,B در دو دوز ۵ و ۱۰ (IU/mL) نشان می‌دهد که نمونه‌های شرکت A دارای نتایج قابل‌قبول‌تری نسبت به B بوده و غلظت آن در شرکت B پایین‌تر از شرکت A است. در ضمن نمونه خارجی اکسی‌توسین از شرکت آلمانی (Rotexmedia) هم برای بررسی روش و مقایسه با ویال‌های داخلی در غلظت IU/mL ۱۰ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و نتایج نمونه‌های داخلی قابل‌مقایسه با این برند خارجی بوده است جدول (۲).

جدول (۲): نتایج حاصل از آنالیز ویال‌های شرکت‌های مختلف

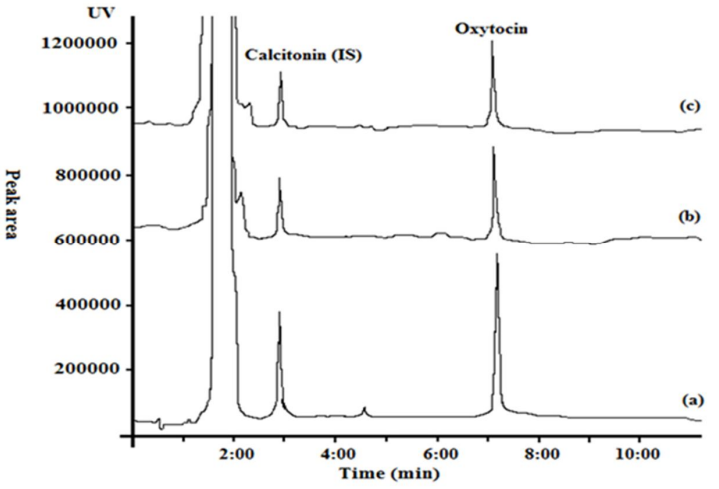
شرکت سازنده	تاریخ ساخت	تاریخ انقضاء	شماره سریال	لیبل ویال (IU/ml)	مقدار اندازه‌گیری شده (IU/ml)
A	۲۰۲۱/۰۲	۲۰۲۴/۰۳	۲۲۱۲۲۰۲۹	۱۰	۱۱/۰۴ ± ۰/۳۲
A	۲۰۲۲/۰۴	۲۰۲۵/۰۴	۲۳۰۲۲۰۲۰	۵	۴/۱۸ ±۰/۷۵
B	۲۰۲۱/۰۶	۲۰۲۴/۰۵	۱۲۵۴۵۲۲۲	۱۰	۸/۲۱ ± ۰/۶۵
B	۲۰۲۲/۰۴	۲۰۲۵/۰۴	۱۳۲۶۲۶۶۲	۵	۴/۰۸ ± ۰/۴۱
Rotexmedica	۲۰۲۱/۰۲	۲۰۲۵/۰۲	۰۲۱۳۹۵۶۱	۱۰	۱۰/۷ ± ۰/۵۸

در منحنی کروماتوگرام حاصل از اندازه‌گیری اکسی‌توسین در کنار کلسی‌تونین که به‌عنوان استاندارد داخلی مورداستفاده قرار گرفته است.

-در کروماتوگرام اول (a) حاصل از استاندارد اکسی توسین و کلسی‌تونین به ترتیب در غلظت‌های ۱۰ IU/mL و ۵ IU/mL به دست آمده است. که نشان‌دهنده سطح زیر پیک بسیار خوبی برای هر دو ماده است.

-کروماتوگرام دوم (b) که از نمونه‌های ویال اکسی‌توسین و کلسی‌تونین به ترتیب در غلظت‌های ۵ و ۲/۵ واحد بر میلی‌لیتر بدون میکرواستخراج و به‌صورت مستقیم به دست آمده است.

کروماتوگرام آخری ((cهم که از نمونه سرم خون حاوی اکسی‌توسین و کلسی‌تونین به ترتیب در غلظت‌های IU/mL ۲ و IU/mL ۱ به دست آمده که نشان‌دهنده پیک‌های بسیار خوب باوجود غلظت تقریباً ۲۵ برابر کمتر از نمونه‌های ویال است که نشان از کارایی خوب متد استخراجی است.



نمودار (۷): کروماتوگرام نمونه‌های ویال، استاندارد و سرم

در ضمن نتایج حاصل از تکرارپذیری درون روزی و بین روزی برای سه غلظت از اکسی توسین در سرم انسانی جدول (۳) نشان‌دهنده تکرارپذیری، دقت و صحت بسیار خوب متد پیشنهادی است.

جدول (۳): نتایج حاصل از بررسی تغییرات درون روزی و تغییرات بین روزی حاصل از متد موردنظر در مطالعه سرم حاوی مقادیر مختلف اکسی توسین

غلظت اکسی توسین در سرم (IU/mL)	تغییرات درون روز			تغییرات بین روز		
	انحراف استاندارد±میانگین (IU/mL)	دقت (٪)	صحت (٪)	انحراف استاندارد±میانگین (IU/mL)	دقت (٪)	صحت (٪)
۰/۱	۰/۰۹۷ ± ۰/۰۰۶	۵/۲۱	۹۳/۵	۰/۰۹ ± ۰/۰۰۳	۳/۴۲	۹۷
۲	۲/۱۵ ± ۰/۰۸	۳/۱۸	۱۰۷/۵	۱/۹۲ ± ۰/۰۹	۲/۶۸	۹۶
۵	۴/۷۸ ± ۰/۳۱	۴/۵۷	۹۵/۶	۵/۲۱ ± ۰/۲۸	۵/۱۱	۱۰۴/۲

بحث

هدف از این مطالعه، توسعه و به‌کارگیری یک روش میکرواستخراج حلال پخشی (DLLME) به‌منظور اندازه‌گیری اکسی‌توسین در نمونه‌های سرم انسانی و ویال‌های دارویی موجود در بازار ایران بود. در این راستا، پارامترهای کلیدی روش DLLME شامل نوع و حجم حلال استخراج‌کننده (تتراکلریدکربن، ۵۰ میکرولیتر) و پخش‌کننده (استونیتریل، ۱.۵ میلی‌لیتر)، دمای استخراج (۴۵ درجه سانتی‌گراد) و pH (7) بهینه‌سازی گردید. روش DLLMEبه دلیل مزایایی چون سادگی، سرعت، کاهش مصرف حلال‌های آلی و افزایش فاکتور تغلیظ، به‌عنوان یک فن آماده‌سازی نمونه مناسب، به‌خصوص برای آنالیت‌های با غلظت پایین، مطرح است (۱۹).

در بخش یافته‌ها، نتایج حاصل از به‌کارگیری این روش استخراج بر روی ویال‌های اکسی‌توسین دو شرکت داخلی (A و B) و یک نمونه خارجی (Rotexmedica) ارائه گردید (جدول ۲). داده‌های اولیه حاکی از آن است که میانگین غلظت اندازه‌گیری شده در نمونه‌های شرکت A (به‌خصوص در دوز ۱۰ IU/mL) به مقدار اسمی روی لیبل نزدیک‌تر از نمونه‌های شرکت B بود. همچنین، غلظت اندازه‌گیری شده در بیشتر نمونه‌های داخلی (حدود ۸۱-۸۴درصد مقدار اسمی) کمتر از نمونه خارجی (حدود ۱۰۷درصد مقدار اسمی) به دست آمد. البته در یک مورد ۱۱۰درصد بوده و نتیجه از نمونه خارجی بهتر بود. این مشاهدات اولیه، پتانسیل وجود تفاوت در کیفیت ویال‌های موجود در بازار را مطرح می‌کند که با یافته‌های برخی مطالعات پیشین در مورد اهمیت کنترل کیفی فرآورده‌های اکسی‌توسین هم‌خوانی دارد (۱، ۳، ۱۷). مطالعه اکبری و همکاران

(۱۷) نیز که با روش HPLC به بررسی ویال‌های اکسی‌توسین در بازار ایران پرداخته بود، بر اهمیت پایش مستمر این فرآورده‌ها تأکید داشت. نتایج اندازه‌گیری در نمونه‌های سرم هم حاکی از کارایی این روش در محیط بیولوژیکی در حضور ماتریکس این محیط دارد که راندمانی در حدود ۹۳-۱۰۷درصد را نشان داد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، روش میکرواستخراج حلال پخشی (DLLME) برای استخراج اکسی‌توسین از نمونه‌های دارویی و سرم انسانی توسعه داده شد و پارامترهای مؤثر بر آن بهینه‌سازی گردید. نتایج اولیه حاصل از آنالیز ویال‌های تجاری، تفاوت‌هایی را در غلظت اکسی‌توسین بین برندهای مختلف نشان داد. همچنین تلاش شد تا تکرارپذیری و صحت روش در ماتریکس سرم ارزیابی شود. با توجه به هزینه کم و سادگی و کارایی بالای روش و استفاده حداقلی از حلال‌های آلی برای استخراج این روش با شیمی سبز سازگار بوده و به دلیل استفاده از کروماتوگرافی گازی با دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است. چراکه تمام اندازه‌گیری‌های کروماتوگرافیک این ماده با کروماتوگرافی مایع بوده است.

تشکر و قدردانی

از تمامی افرادی که ما را در ا ین مطالعه یاری نمودند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

حمایت مالی تحقیق

ندارد.

تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در این مطالعه نداشته‌اند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه حاصل از نتایج پایان‌نامه دکترای عمومی داروسازی با کد اخلاق IR.UMSU.REC.1400.395 که در دانشکده داروسازی ارومیه ثبت و به انجام رسیده است.

References:

1. Haleem RM, Salem MY, Fatahallah FA, Abdelfattah LE. Quality in the pharmaceutical industry - A literature review. Saudi Pharm J 2015;23(5):463-9. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.004
2. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis. Cengage Learning; 2017.
3. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res 1995;12(3):413-20. https://doi.org/10.1023/A:1016212804288
4. Beg S, Hasnain S, Rahman M, Swain S. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications. Pharm Qual Des 2019. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815799-2.00001-0
5. D'Atri V, Fekete S, Clarke A, Veuthey J-L, Guillarme D. Recent advances in chromatography for pharmaceutical analysis. Anal Chem 2019;91(1):210-39. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05026
6. Lambert P, Nguyen T-H, Oliver V, McArthur A, Goodall C, Teklu A, et al. Oxytocin injection quality in Ethiopia: a post-marketing surveillance study in public and private facilities across three regions. J Forensic Odontostomatol 2019;3. https://doi.org/10.29392/joghr.3.e2019081
7. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. Physiol Rev 2001;81(2):629-83. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629
8. Ivell R, Russell JA. Oxytocin: cellular and molecular approaches in medicine and research. Rev Reprod 1996;1(1):13-8. https://doi.org/10.1530/ror.0.0010013
9. Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ. Central effects of oxytocin. Physiol Rev 1991;71(2):331-70. https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.2.331
10. Macdonald K, Macdonald TM. The peptide that binds: a systematic review of oxytocin and its prosocial effects in humans. Harv Rev Psychiatry

2010;18(1):1-21. https://doi.org/10.3109/10673220903523615

11. Oral E, Gezer A, Cagdas A, Pakkal N. Oxytocin infusion in labor: the effect different indications and the use of different diluents on neonatal bilirubin levels. Arch Gynecol Obstet 2003;267(3):117-20. https://doi.org/10.1007/s00404-002-0298-3
12. Lee SY, Lee AR, Hwangbo R, Han J, Hong M, Bahn GH. Is Oxytocin Application for Autism Spectrum Disorder Evidence-Based? Exp Neurobiol 2015;24(4):312-24. https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.312
13. Leng G, Sabatier N. Measuring Oxytocin and Vasopressin: Bioassays, Immunoassays and Random Numbers. J Neuroendocrinol 2016;28(10). https://doi.org/10.1111/jne.12413
14. Liu D, Han X, Liu X, Cheng M, He M, Rainer G, et al. Measurement of ultra-trace level of intact oxytocin in plasma using SALLE combined with nano-LC-MS. J Pharm Biomed Anal 2019;173:62-7. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.023
15. López-Arjona M, Mateo SV, Manteca X, Escribano D, Cerón JJ, Martínez-Subiela S. Oxytocin in saliva of pigs: an assay for its measurement and changes after farrowing. Domest Anim Endocrinol 2020;70:106384. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106384
16. Moriyama E, Kataoka H. Automated analysis of oxytocin by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chromatography 2015;2:382-91. https://doi.org/10.3390/chromatography2030382
17. Akbari AZ, Heydari A. Quantification of oxytocin in pharmaceutical dosage forms available in drug market of Iran by using high performance liquid chromatography method (HPLC). Stud Med Sci 2014;24(12):956-65.
18. Viceconti M, Pappalardo F, Rodriguez B, Horner M, Bischoff J, Musuamba Tshinanu F. In silico trials: Verification, validation and uncertainty quantification of predictive models used in the regulatory evaluation of biomedical products. Methods 2021;185:120-7. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.01.011
19. Ötles S, Kartal C. Solid-phase extraction (SPE): principles and applications in food samples. Acta Sci Pol Technol Aliment 2016;15(1):5-15. https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.1
20. Vardast MR, Ranjkeshzadeh N. New method for determination of amiodarone in serum with dispersive liquid-liquid microextraction by high-performance liquid chromatography with experimental method. Stud Med Sci 2020;31(1):7-14.
21. Vardast MR, Ranjkeshzadeh N, Ghasemlu K, Ranjkeshzadeh H. Evaluation of acrylamide in some fried products marketed in Urmia city by high performance liquid chromatographia with experimental method. Stud Med Sci 2019;30(3):207-16.

Original Article

MEASUREMENT OF OXYTOCIN IN HUMAN SERUM AND PHARMACEUTICAL PRODUCTS AVAILABLE IN THE IRANIAN MARKET BY MICROEXTRACTION METHOD

*Maede Eskandari Azar [1], Mohammad Reza Vardast[2]**

Received: 06 March, 2025; Accepted: 20 April, 2025

Abstract

Background & Aims: Given the clinical importance and frequent use of oxytocin in serum and pharmaceutical products, along with the significant impact of improper dosage on both the therapeutic efficacy and adverse effects, this study aimed to develop and validate a dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) method for the rapid and precise measurement of oxytocin concentrations in these matrices.

Materials & Methods: In this study, a DLLME method was optimized using carbon tetrachloride as the extraction solvent and acetonitrile as the dispersing solvent. Various parameters, including temperature and stirring speed, were systematically investigated and optimized. Analyses were conducted using gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). The materials utilized included oxytocin, ethanol, methanol, acetone, dichloromethane, carbon tetrachloride, acetonitrile, and calcitonin (as the internal standard).

***Results*:** Analysis of oxytocin concentrations in serum and commercial vials (5 and 10 IU/mL doses) from two domestic manufacturers (Company A and B) revealed that Company A's products more closely matched their labeled concentrations compared to those of Company B. Method validation using a German reference standard (Rotexmedica) demonstrated comparable results for domestic samples, with no statistically significant differences observed. The analytical method showed excellent performance characteristics, with a linear detection range of 0.02–60 IU/mL, a calibration equation of $A = 190731C - 21483$, and a correlation coefficient (R^2) of 0.999.

***Conclusion*:** The developed DLLME method proved to be a simple, cost-effective, and reliable technique for quality control of oxytocin pharmaceutical preparations and the measurement of serum oxytocin levels. The findings revealed significant variations in oxytocin concentrations between different commercial products available in the Iranian market and demonstrated the method's capability for accurate quantification in biological samples.

Keywords: dispersive liquid-liquid microextraction, extraction solvent, method optimization, oxytocin quantification, microextraction

Address: School of pharmacy, Urmia University of Medical Science
Tel: +984432754990 (152)
Email: mrvardast@gmail.com, vardast.mr@umsu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2025: 35(12): 1044 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] Ph. D. in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)