



توسعه و معتبر سازی روش اندازه گیری همزمان تتوفیلین و گایافنژین بوسیله HPLC در اشکال دارویی

نرگس علیشاهی^۱ | گیتا باقری^{۲*}

گروه شیمی دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار، شهریار، ایران^۱
گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار، شهریار، ایران^۲

چکیده: هدف از انجام این پژوهش تعیین مقدار موثره و اعتبارسنجی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کم هزینه (HPLC) برای آنالیز همزمان تتوفیلین (TH) و گایافنژین (GF) که دارای همپوشانی طیفی گسترده ای هستند، در فرم شربت تتوفیلین جی است. در روش ارائه شده از ستون C8 به طول ۲۵۰ میلیمتر، قطر ۴/۶ میلیمتر و اندازه ذره‌های ۵ میکرون و از فاز متحرک شامل ۶۰ حجم از آب (گرید HPLC) و ۴۰ حجم از متانول جهت آنالیز استفاده شده است. برای معتبرسازی روش آنالیز از پارامترهای انتخابی بودن، منحنی کالیبراسیون، دامنه، خطی بودن، دقت، صحت، حد تشخیص و حد اندازه گیری استفاده شده است. زمان بازداری تتوفیلین و گایافنژین به ترتیب ۳/۳ و ۶/۵ دقیقه بود. حداقل غلظت قابل تشخیص و حداقل غلظت قابل اندازه گیری بدست آمده به ترتیب ۱/۹۴ و ۴/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. روش پیشنهادی بسیار انتخابی، حساس و دقیق بوده و درصد انحراف معیار نسبی برای بررسی صحت و دقت کمتر از ۲٪ بدست آمد، لذا این روش از دقت و تکرارپذیری مناسب برای آنالیز همزمان TH و GF در فرم شربت برخوردار است. عدم وجود بافر و استفاده از مقدار کمی از حلالهای آلی باعث افزایش طول عمر ستون و کاهش هزینه آنالیز تتوفیلین و گایافنژین در صنعت می شود. علاوه بر آن روش پیشنهادی موجب کاهش هزینه های معمول آنالیز تتوفیلین جی و زمان آنالیز در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی LC و کاهش زمان آماده سازی نمونه و تلفیق روشهای نوین آماده سازی نمونه و افزایش طول عمر ستون گردیده است.

*bagheri.gita@yahoo.com

سمیت و غیر درمانی آن ها اهمیت زیادی دارد. تفاوت های موجود در فرآورده های دارویی تولید شده از یک ماده موثره توسط شرکت های داروسازی مختلف از جمله مواد اولیه، نوع و میزان مواد جانبی همراه در هر فرمول و نیز فرآیند تولید محصول نهایی باعث بروز اختلالاتی در غلظت های پلاسمایی حاصل از دارو می شود که ممکن است منجر به بروز عوارض ناخواسته و

۱- مقدمه

کنترل کیفیت از سابقه ای طولانی معادل عمر صنعت برخوردار می باشد. کیفیت فرآورده های دارویی به ویژه از نظر مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی باتوجه به وجود اثرات جانبی و عوارض

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۶/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۲۰

زمستان ۱۴۰۳ | شماره ۴ | سال یازدهم

یا کاهش اثر درمانی مورد نظر گردد. واضح است که تعیین مقادار دارو در آزمایشات درون و برون تنی مستلزم در اختیار داشتن یک روش حساس و با دقت و صحت کافی می باشد.

از جمله ترکیبات دارویی که امروزه مصرف فراوانی دارند ترکیبی از تئوفیلین (TH) و گایافنزین (GF) در فرم شربت است که این ترکیب برای درمان بیماری برونشیت و آسم استفاده می شود [۱،۲]. گایافنزین با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O_4$ و با وزن مولکولی $198/21$ به عنوان خلط آور برای تسکین علائم مشکلات تنفسی به کار می رود.

روش هایی همچون طیف سنجی ماورای بنفش، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارسازی ماورای بنفش، کروماتوگرافی گازی، طیف سنجی جرمی، الکتروفورز موئینه و روش های الکتروشیمیایی برای تعیین مقدار ماده موثره در فرمولاسیون دارویی و محیط های بیولوژیک استفاده می شود که هر کدام 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 می باشند. اخیراً با راه اندازی و معتبرسازی یک روش آنالیز الکتروشیمیایی مبتنی بر ولتامتری چرخه ای، اندازه گیری ماده موثره در فرآورده دارویی در حد پیکو مولار گزارش شده است.

روش های آزمایشگاهی باید از حیث کیفیت بررسی گردند، به صورتیکه میزان صحت و درستی کار و قابل اعتماد بودن روش برای فعالیت های بعدی کاملاً مشخص گردد؛ به این ترتیب بر اساس میزان صحت و اعتبار بدست آمده، در زمان الگو گیری تصمیم بر استفاده از این روش ها و یا عدم استفاده از آن ها اتخاذ می گردد. شاخص های مختلفی در این زمینه معرفی شده اند که هر کدام می تواند میزانی از اعتبار را مشخص کند؛ در مقاله ارائه شده انواع این پارامترها و روش های رسیده به آن آمده است و می تواند برای پژوهشگران به عنوان یک مرجع در محاسبات عمل کند. اندازه گیری مقدار ماده موثره یکی از عوامل مهم تعیین کیفیت دارو می باشد که با توجه به نتایج آن می توان به اثربخشی و کاهش عوارض دارو پی برد. واضح است که روشهای آزمایش که برای ارزیابی کیفیت محصولات بکار می روند، باید از صحت و اعتبار لازم برخوردار باشند.

روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با فاز معکوس (HPLC) برای آنالیز یک یا دو ماده موثره به طور همزمان در دوزهای حاوی TH و GF یا سایر مواد موثره بطور گسترده ای مورد استفاده قرار گرفته است [۳-۸]. از این روش برای

تجزیه و تحلیل همزمان تئوفیلین، گایافنزین و دیفن هیدرامین هیدروکلراید و مخلوط متانول-آب (۱:۱، v/v، pH 3.0) به عنوان فاز متحرک، سرعت جریان ۱.۰ میلی لیتر در دقیقه و آشکارساز UV در 218 نانومتر استفاده شده است [9]. از روش HPLC نیز برای آنالیز همزمان این دو ماده فعال در مخلوط با برخی از مواد موثره یا مواد جانبی دیگر با استفاده از استونیتریل و بافر فسفات pH 3.2 به عنوان فاز متحرک استفاده شده است [10]. توسعه و اعتبارسنجی روشی ساده، اقتصادی و قابل تکرار برای تعیین تئوفیلین در اشکال دارویی با استفاده از ستون C18 فاز معکوس گزارش گردیده است. فاز متحرک از مخلوط آب: استونیتریل: متانول در نسبت ۰.۷:۳:۰.۳ و pH روی ۴.۶ تهیه گردیده است [11].

توسعه و اعتبار سنجی کروماتوگرافی مایع جفت یونی برای تعیین سالبوتامول و تئوفیلین در شکل دوز دارویی، ارائه شده و جداسازی داروها با ستون C18 و فاز متحرک مخلوط اسید استیک ۱٪: متانول (۴۰:۶۰:۰ v/v) انجام شده است [12]. استونیتریل یک حلال عالی برای فاز متحرک HPLC است. با این حال، حلال نسبتاً گران قیمتی است و گاهی اوقات تهیه آن دشوار است؛ بنابراین لازم است یک روش HPLC جایگزین با استفاده از حلال دیگری به عنوان فاز متحرک طراحی شود. متانول حلال جایگزین مناسبی برای استونیتریل است، این حلال ارزان تر و قطبی تر از استونیتریل است. با این حال، متانول دارای قدرت نفوذ ضعیفتر و فشار بالاتری است [13]. هدف از انجام این پژوهش راه اندازی و معتبرسازی یک روش جدید HPLC با استفاده از مخلوطی از متانول-آب به عنوان فاز متحرک است که بتوان توسط آن آنالیز همزمان تئوفیلین و گایافنزین در فرم دارویی شربت در آزمایشات برون تنی با دقت و صحت زیاد و حساسیت کافی انجام داد. بدین ترتیب می توان کیفیت فرآورده تولیدی را از نظر میزان ماده مؤثره و مقدار یکنواختی دارو در قرص کنترل نموده و با نمونه های استاندارد مقایسه کرد.

2-بخش تجربی

مواد و واکنش دهنده ها

استاندارد TH و GF از آژانس ملی مواد دارویی و کنترل مواد غذایی (NA-DFC) جمهوری اندونزی تهیه شد. نمونه شربت حاوی TH و GF از منبع تجاری ($Tusapress^{\circledR}$)

خریداری شد. تمام واکنشگرهای مورد استفاده ساخت کمپانی مرک آلمان بوده و تمام حلال ها از خلوص کروماتوگرافی برخوردار بوده اند.

شرایط HPLC

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به ستون Target C8-3 column (250 x 4.6 mm, 5 μm) پمپ UV-Vis (Shimadzu LC-10AD)، (Shimadzu SPD-10A) و سرنگ (Hamilton Co. Nevada) ۲۰ μL و آشکارساز ۲۱۸ نانومتر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. متغیرهای مربوط به این روش آنالیز به طور تجربی و بر اساس آزمایشات اولیه تعیین شدند. برای بدست آوردن شرایط بهینه سازی، نسبت های مختلفی از فازهای متحرک مورد بررسی قرار گرفت. در مراحل اولیه بهینه سازی شرایط جداسازی، فاز متحرک شامل: (1) آب: استونیتریل (۱۰:۹۰) با طول موج ۲۷۱، (2) آب: استونیتریل: متانول (۵:۵:۹۰) با طول موج ۲۷۱، (3) استونیتریل: متانول (۱۰:۵:۸۵) با طول موج ۲۷۱، (4) اسید استیک: متانول (۶۰:۴۰) با طول موج ۲۷۱، (5) آب: متانول (۵۰:۵۰) با طول موج ۲۱۸، (6) آب: متانول (۴۰:۶۰) با طول موج ۲۱۸ استفاده گردید اما قدرت جداسازی و همچنین زمان بازداری در کروماتوگرام های حاصل قابل قبول نبود و نتایج رضایت بخشی بدست نیامد. بمنظور دسترسی به بهینه ترین و بهبود شرایط جداسازی، اسید استیک از مخلوط آب و متانول حذف گردید. مخلوط آب و متانول با نسبت ۴۰:۶۰ بعنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت. در این روش با ترکیب درصد مشخص، جداسازی مناسبی نشان داد و در نهایت فاز متحرک به صورت مخلوطی از متانول و آب (۴۰:۶۰) تهیه گردید و با افزودن اسید استیک ۰.۰۵٪ در pH حدود ۳ تنظیم گردید و با غشای ۰.۴۵ میکرومتر فیلتر شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ ml/min در نظر گرفته شد. زمان بازداری (R_t) و جداسازی (R) پیک های کروماتوگرافی حاصل از تزریق محلول مخلوط ۲ ماده موثره در HPLC است. یکی از ترکیبات فاز متحرک که بهترین ویژگی ها را برای جداسازی ارائه می دهد انتخاب شد و سپس تزریق به HPLC با شرایط انتخاب شده برای ارزیابی دقیق انجام گردید. در مطالعه حاضر زمان بازداری تئوفیلین حدود ۳.۴ دقیقه و زمان بازداری گایافنزین در ۵.۶ دقیقه بوده و متانول با حجم ۴۰٪ و آب خالص با حجم ۶۰٪ جهت تهیه فاز

متحرک مورد استفاده قرار گرفت. در حالیکه در روش توسعه یافته برای تشخیص همزمان سالیوتامول سولفات و تئوفیلین در اشکال دارویی از فاز متحرک با ترکیب استونیتریل و فسفات بافر (۶۵:۳۵) مورد استفاده قرار گرفت و زمان حدودی بازداری تئوفیلین در ۱۳ دقیقه بود. روش پیشنهادی حاضر در این مطالعه به دلایل زیر می تواند الهام بخش توسعه روش HPLC بهتری در فرم دارویی شربت تئوفیلین جی باشد.

۱- هزینه کمتر جهت تهیه فاز متحرک (متانول ارزانتر از استونیتریل)

۲- کوتاهتر شدن زمان آنالیز

۳- طول عمر بیشتر ستون بدلیل استفاده نکردن از بافر فسفات [14].

از دیگر پارامترهای مهم دمای سیستم HPLC بوده که نقش مهمی در دستیابی به تکرارپذیری عالی و جداسازی کارآمد دارد. دما بر حلالیت آنالیت، انتشار و برهمکنش با ستون و فاز متحرک تأثیر می گذارد. دماهای بالاتر به طور کلی نرخ انتقال جرم را افزایش داده و کارایی جداسازی را بهبود می بخشد و همچنین زمان تجزیه و تحلیل را کاهش می دهد اما حساسیت دما بسته به ترکیب و مواد ستون متفاوت است. با توجه به پایداری آنالیت ها و مواد ستون، انتخاب دقیق دمای مناسب برای آنالیز ضروری است. با افزایش دمای فاز متحرک، فشار در دستگاه کاهش می یابد. در این مطالعه برای بهینه سازی فشار از تنظیم سرعت جریان فاز متحرک استفاده شده است و در نهایت اثر دما و سرعت جریان بر زمان ماند مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به ویسکوزیته کم فاز متحرک، جداسازی در ۲۵ درجه سانتی گراد برای همه آنالیت ها به دست آمد.

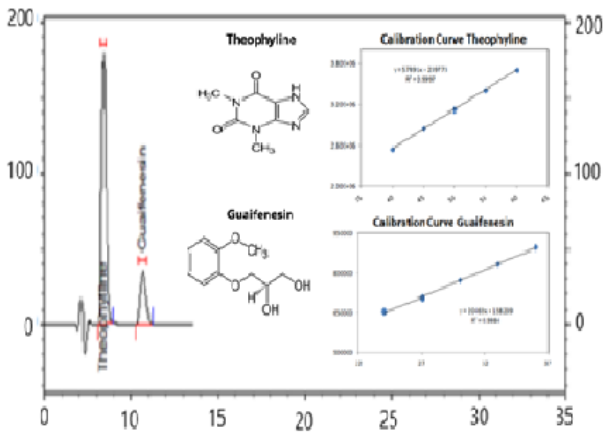
آماده سازی محلول استاندارد و نمونه

برای تهیه محلول استوک آنالیت ها، ۱۰ میلی گرم TH و ۶ میلی گرم GF را در مقداری فاز متحرک حل نموده و سپس فیلتراسیون گردیده و با فاز متحرک رقت سازی انجام داده تا محلول نمونه با غلظت های ۵۰ و ۳۰ μg / mL به ترتیب TH و GF تهیه گردید.

اعتبار سنجی روش آنالیز

اعتبار سنجی روش تحلیلی بر اساس (ICH) Q2 guidelines انجام شد [۱۵]، که شامل انتخابی بودن، خطی بودن، محدودیت تشخیص (LOD)، محدودیت مقدار (LOQ)، دقت و صحت بود. کمترین غلظتی که در یک

نموده و داده‌ها دقت خوبی را در سیستم کروماتوگرافی نشان می‌دهند.



شکل ۱: کروماتوگرام HPLC از تزریق ۲۰ میکرولیتر نمونه شربت حاوی تنوفیلین (TH) و گایافنزین (GF)

این روش، انتخاب پذیری خوبی را نشان داده و منحنی کالیبراسیون بین غلظت TH و GF و پیک آنها، رابطه خطی مناسبی را در سطوح غلظت ۴۰-۶۰ $\mu\text{g/mL}$ برای TH و ۲۴-۳۶ $\mu\text{g/mL}$ برای GF نشان داده و خطی بودن به دست آمده الزامات خطی را برای اعتبارسنجی روش برآورده می‌کند زیرا مقدار ضریب همبستگی ≥ 1 وجود دارد ($r^2 = 0.999$). مقادیر LOD به ترتیب ۰/۴ و ۰/۵۵ $\mu\text{g/mL}$ و $1/23$ LOQ و $1/68$ $\mu\text{g/mL}$ به ترتیب برای TH و GF بود (جدول ۱). نشان می‌دهد که مقادیر دقت و صحت روش رضایت بخش بوده و مقادیر RSD از تکرارپذیری و دقت متوسط به دست آمده، کمتر از ۲٪ (جدول ۲) و رنج میانگین مقادیر بازیابی به دست آمده برای TH و GF به ترتیب ۱۰۰/۳۷ - ۹۹/۸۹٪ و برای ۱۰۰/۴۵ - ۱۰۰/۰۹٪ بوده است (جدول ۳).

جدول ۱: ویژگی‌های منحنی‌های کالیبراسیون، حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ) روش HPLC برای آنالیز همزمان تنوفیلین (TH) و گایافنزین (GF)

آزمایش خطی بودن	TH	GF
رنج ($\mu\text{g/ml}$)	۴۰-۶۰	۲۴-۳۶
ضریب همبستگی	۰/۹۹	۰/۹۹
شیب خط	۵۷۸۹۱	۲۰۴۶۹
عرض از مبدا	۲۳۹۷۷	۱۰۸۲۳

ماتریکس قابل تشخیص است ولی به حد دقت قابل اندازه‌گیری نمی‌رسد، به عنوان LOD و کمترین غلظتی که به دقت و صحت قابل قبول، قابل اندازه‌گیری می‌باشد به عنوان LOQ در نظر گرفته شد. برای تعیین LOD و LOQ از نسبت سیگنال به نویز با نسبت ۳:۱ برای تعیین LOD و نسبت ۱۰:۱ برای تعیین LOQ استفاده گردید. انتخابی بودن با تزریق محلول نمونه بلانک، محلول نمونه و محلولهای استاندارد در HPLC بررسی شد. در کروماتوگرام حاصل هیچ پیکی در محل خروج تنوفیلین و گایافنزین مشاهده نشد. خطی بودن روش پیشنهادی با تعیین ضریب همبستگی (r^2)، تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی در محدوده غلظت ۶۰-۴۰ $\mu\text{g/mL}$ برای TH و محدوده ۳۶-۲۴ $\mu\text{g/mL}$ برای GF ارزیابی شد و مقدار LOD و LOQ با استفاده از داده‌های پاسخ انحراف استاندارد (σ) و شیب منحنی کالیبراسیون (S) محاسبه گردید.

$$\text{LOQ} = 10 \sigma/S \quad (1)$$

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma/S \quad (2)$$

دقت با انجام تکرارپذیری آزمون محاسبه شد. تکرارپذیری (در روز) با آنالیز محلول‌های نمونه ۱۰۰٪ نسبت به برچسب نمونه در ۶ بار تکرار بررسی شد و دقت بینابینی با تعیین آنالیت‌ها در نمونه در چهار روز متوالی ارزیابی گردید. مقادیر انحراف استاندارد نسبی^۱ (RSD) برای تکرارپذیری و دقت بینابینی گزارش شد. صحت روش با تعیین مقدار بازیابی آنالیت‌ها در افزودن نمونه آنالیز شد [۱۵]. برای محاسبه صحت، استاندارد TH و GF در سه غلظت مختلف (۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰٪ از مقدار برچسب شده هر یک از نمونه‌ها) با استفاده از فاز متحرک تهیه شد و برای هر غلظت با ۳ بار تکرار محاسبه گردید.

۳- نتایج

رهیافت اولیه در این روش، انتخاب ترکیبات فاز متحرک بود و مخلوط متانول و آب (pH 3، V_1/V_2 ۴۰:۶۰) که بهترین ویژگی‌های کروماتوگرافی را ارائه می‌دهد به عنوان فاز متحرک انتخاب شد. در این شرایط، زمان بازداری^۲ TH و GF به ترتیب ۳/۴ و ۵/۶ دقیقه بوده (شکل ۱) و در پنج تزریق تکرار شده از محلول استاندارد، RSD تمام آنالیت‌ها از ۲٪ بیشتر

^۱Relative standard deviation (RSD)

^۲Retention time

TH و GF با هم همپوشانی دارند. علاوه بر این، محلول خوراکی به طور کلی حاوی ماده طعم دهنده، شیرین کننده یا رنگ است [۳]. مقالات متعددی استفاده از روش HPLC فاز معکوس را برای آنالیز همزمان این دو ماده موثره در مخلوط با برخی از مواد موثره دیگر یا مواد جانبی گزارش کرده اند. در آنالیز همزمان تئوفیلین، گایافنزین و دیفن هیدرامین هیدروکلراید از مخلوط متانول-آب (۱:۱، ۷/۷، pH 3) به عنوان فاز متحرک استفاده شده است. این روش برای انتخابی و خطی بودن، LOD-LOQ، دقت و صحت اعتبارسنجی شد. زمان ماند TH، GF و DH به ترتیب ۳.۳، ۵.۳ و ۹.۱ دقیقه بود. این روش گزینش پذیری خوبی را نشان داد، منحنی های کالیبراسیون در محدوده غلظت ۱۰۰۰ - ۱۰۰۰۰۲ میکروگرم بر میلی لیتر، ۰.۸۰۱ - ۸.۰۰۸ میکروگرم در میلی لیتر و ۰.۲۵۱ - ۲.۵۱۴ میکروگرم در میلی لیتر ($r^2 > 0.999$) خطی بودند. دقت بازیابی برای TH، GF و DH به ترتیب ۹۹.۷۷ - ۱۰۱.۱۰، ۱۰۰.۵۰ - ۱۰۱.۹۵ و ۹۹.۲۰ - ۱۰۰.۱۳ درصد بود. دقت (RSD) کمتر از ۲.۰ بود. روش پیشنهادی بسیار انتخابی، حساس و دقیق بوده و برای آنالیز همزمان TH، GF و DH در شکل دوز اکسیر مناسب است. از آنجایی که متانول ارزان تر از استونیتریل است، استفاده از این روش می تواند هزینه آنالیز را تا حدی کاهش دهد [۹]. با این حال، به دلیل هزینه یا در دسترس بودن حلال، تهیه یک روش جایگزین با استفاده از حلال دیگر به عنوان یک فاز متحرک ضروری است. قیمت متانول تقریباً ۱/۴ برابر قیمت استونیتریل است [۱۶]. علاوه، دستیابی به متانول آسانتر و قطبی تر از استونیتریل است و خطر بارش بافر جامد را کاهش می دهد [۱۱]. از این رو روش پیشنهادی برای انجام آنالیز معمول TH و GF به صورت دوز شربت در صنعت داروسازی کم هزینه تر خواهد بود. نتایج اعتبارسنجی روش نشان داد که کلیه پارامترها در حد قابل قبول بوده و حضور مواد جانبی در فرمولاسیون هیچگونه تداخلی در پیک های TH و GF ایجاد نمی کند. بنابراین این روش برای تعیین همزمان TH و GF انتخابی است. خطی بودن روش با ضریب رگرسیون ($r^2 = 0.999$) مشاهده گردید. LOD و LOQ بدست آمده نشان دهنده درجه بالایی از حساسیت است. اندازه گیری های روزانه RSD برای TH و GF بترتیب ۰/۶۱ و ۰/۳ درصد بود، در حالی که RSD متوسط TH و GF ۵۳/۰ و ۲۷/۰ درصد بود. مقادیر RSD بدست آمده کمتر از RSD حداکثر بود، که نشان دهنده حساسیت بیشتر روش

خط	۰/۴	۰/۵۵
LOD (µg/ml)		
LOQ (µg/ml)	۱/۲۳	۱/۶۸

جدول ۲: نتایج ارزیابی دقت روش

اجزاء	سطوح (%)	تکرار پذیری (n=۶)			
		غلظت (µg/ml)	میانگین غلظت (µg/ml)	انحراف معیار	درصد انحراف معیار نسبی
TH	۱۰۰	۵۰	۳۱۳۹۹۹۶۴	100/37	0/17
GF	۱۰۰	۳۰	۶۱۸۱۸۶۷	100/12	0/77

اجزاء	سطوح (%)	نتایج بررسی دقت در چند روز (n=۴)			
		غلظت (µg/ml)	میانگین غلظت (µg/ml)	انحراف معیار	درصد انحراف معیار نسبی
TH	۱۰۰	۵۰	۳۱۶۸۸۰۶۷۵	۱۶۶۶۸/۶۶	0/۵۳
GF	۱۰۰	۳۰	۷۷۷۲۸۵/۲۵	۲۰۷۰/۹۵	0/۲۷

جدول ۳: نتایج ارزیابی صحت روش با استفاده از بازیافت^۲

اجزاء	غلظت (µg/ml)	نتایج آنالیز (n=3)			
		میانگین غلظت (µg/ml)	غلظت (ppm)	درصد بازیافت	درصد انحراف معیار نسبی بازیافت
TH	۴۰	۲۵۰۷۳۸۴	۳۹/۱۷	100/37	0/17
	۵۰	۳۱۱۹۴۵۳	۴۹/۷۴	99/89	0/07
	۶۰	۳۷۵۶۲۶۸	۶۰/۷۴	100/24	0/29
GF	۲۴	۶۱۸۱۸۶۷	۲۴/۰۲	100/12	0/77
	۳۰	۷۷۲۴۷۷	۳۰/۰۶	100/09	0/40
	۳۶	۹۳۰۳۲۹/۷	۳۶/۱۳	100/45	0/94

بحث

تئوفیلین (TH) و (GF) ترکیبی از ترکیبات موثره به شکل دوز شربت برای تجویز خوراکی هستند [۱]. طیفهای جذب UV از

^۲Recovery

نسبت به روش های قبلی می باشد. توصیه میشود که RSD برای LOQ باید کمتر یا مساوی 15% باشد. RSD کوچک نشان دهنده دقت روش است.

مقادیر بازیابی برای TH و GF به ترتیب ۱۰۰/۳۷-۹۹/۸۹ و ۱۰۰/۴۵-۱۰۰/۰۹ به دست آمد. به طور کلی، داده ها نشان می دهد که این روش به عنوان یک روش جایگزین برای تعیین همزمان TH و GF در فرم شربت مناسب است.

در روش پیشنهادی حدود ۴ میلی لیتر از متانول برای یک بار آنالیز مصرف گردیده، در حالی که روش قبلی با استفاده از استونیتریل و بافر فسفات حدود ۳ میلی لیتر از استونیتریل مصرف کرده و با توجه به اینکه متانول ارزانتر از استونیتریل است، این نتیجه می تواند الهام بخش توسعه روش های HPLC با هزینه پایین برای تعیین TH و یا GF در سایر فرم ها باشد.

مقایسه نتایج مربوط به معتبر سازی روش اندازه گیری TH و GF با نتایج سایر محققین نشان می دهد که روش به کار رفته، روش مناسب و قابل اعتمادی برای اندازه گیری محتوای همزمان TH و GF در فرم شربت می باشد. ضریب همبستگی نزدیک به یک نشان دهنده خطی بودن منحنی کالیبراسیون در سطح غلظت های تهیه شده است.

روشی ساده، اقتصادی برای تعیین تئوفیلین در اشکال دارویی با استفاده از ستون C18 فاز معکوس ارائه گردیده است. فاز متحرک شامل مخلوط آب: استونیتریل: متانول در نسبت ۰۷:۰۳:۹۰ بوده است. این روش به لحاظ خطی بودن، بازیابی، دقت، صحت و همچنین پایداری بین روز تحت شرایط آزمایشگاهی تایید شده است. زمان ماندگاری ۵.۵ دقیقه و LOD و LOQ به ترتیب ۱۲.۵ ngmL-1 و ۱۰۰ ngmL-1 بوده است. دقت بازیابی (%) برای غلظت های مختلف از ۱۰۰.۰۵ تا ۱۰۲.۴۳ متغیر بوده و ضریب رگرسیون (R²) 0.994; دقت RSD < 2.0 گزارش گردیده است. این روش ساده، سریع، بسیار خاص و مناسب برای تعیین تئوفیلین است. عدم وجود بافر و استفاده از مقدار کمی از حلال های آلی باعث افزایش طول عمر ستون و کاهش هزینه آنالیز معمول تئوفیلین در صنعت می شود [11].

روش کروماتوگرافی مایع جفت یونی برای تعیین سالبوتامول و تئوفیلین متشکل از فاز متحرک مخلوط اسید استیک ۱٪: متانول (۴۰:۷/۶۶) به صورت ایزوکراتیک ارائه گردیده است. روش توسعه یافته از نظر خطی بودن، دقت، صحت و

انتخاب پذیری و حساسیت تایید شد. دقت روش با استفاده از روش تکرارپذیری با مقادیر انحراف استاندارد نسبی (RSD) 0.41-0.70% برای تئوفیلین و ۰.۰۸-۰.۲۴% برای سالبوتامول ارزیابی شد. درصد بازیابی در محدوده ۹۸.۲۸-۱۰۱.۰۲% (تئوفیلین) و ۱۰۰.۷۱-۱۰۱.۶۰% برای سالبوتامول بود. روش توسعه یافته نیاز اعتبارسنجی برای تجزیه و تحلیل سالبوتامول و تئوفیلین را به طور همزمان در شکل دوز شربت برآورده کرد. علاوه بر این، این روش نتایج قابل قبولی را برای شربت ها و شکل های دارویی قرص حاوی تنها سالبوتامول و تئوفیلین و قرص حاوی ترکیب سالبوتامول و تئوفیلین ارائه کرد [12].

یک روش زیست تحلیلی سریع، اختصاصی و قابل اعتماد مبتنی بر LC-MS/MS در پلاسمای موش صحرایی برای کمی سازی همزمان تئوفیلین و چهار متابولیت آن شامل: ۱،۳-دی متیلوریک اسید (۱،۳-DMU)، متیل گزانتین (3-MX)، ۱-متیل گزانتین (1-MX) و ۱-متیلوریک اسید (1-MU) توسعه و اعتبارسنجی شد. جداسازی کروماتوگرافی این آنالیت ها بر روی ستون با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس به دست آمد. آنالیت ها با یونیزاسیون الکترواسپری در حالت نظارت بر واکنش چندگانه یون منفی کنترل شدند. اصلاح انرژی های برخورد به موازات جداسازی کروماتوگرافی برای حذف بیشتر پیک های تداخل انجام شد. روش از ۰.۰۵ تا ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر برای 1-MX، 1،۳-DMU، 1-MU و تئوفیلین و از ۰.۱ تا ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر برای 3-MX با استفاده از ۰.۲ میلی لیتر نمونه پلاسمای تایید شد. دقت و صحت درون و بین روز نمونه های کنترل کیفیت در سطوح غلظت کم، متوسط و بالا انحراف استاندارد نسبی (RSD) کمتر از ۱۳ درصد و با مقادیر خطای نسبی (RE) از ۸.۸- تا ۹.۷% را نشان داد. این روش با موفقیت برای کمی سازی تئوفیلین و متابولیت آن در نمونه پلاسمای موش استفاده شد [17].

۴- نتیجه گیری

یک روش HPLC آنالیز همزمان TH و GF تهیه و اعتبار سنجی شده است. روش پیشنهادی، انتخابی، حساس و دقیق است، بنابراین یک جایگزین مناسب برای آنالیز همزمان TH و GF فرم شربت است. با توجه به آنکه زمان آماده سازی نمونه ها و زمان اجراء نیز کوتاه بوده، روش حاضر را برای آنالیز نمونه مقرون به صرفه و کاربردی می سازد. همچنین عدم وجود بافر و استفاده از مقدار کمی حلالهای آلی باعث افزایش طول عمر

6. M. Figus, Y. V. Kazakevich, "Nondestructive chromatographic determination of surface area in reverse phase chromatographic columns," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 47,89-103, 2024.
7. S.S. Abd El-Hay, R. Sheikh, M. Ali, A. A. Gouda, H. M. El-Sayed, "An eco-friendly HPLC method for concurrent determination of carbocisteine, guaifenesin, and oxomemazine in their combined formulations," *Talanta Open*, 8,100233, 2023.
8. S. Vemireddy, G. Kumaraswamy, B. Jyothsna, M. Bindu M, "validated RP-HPLC method for quantitative estimation of guaifenesin in bulk and pharmaceutical dosage forms," *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16, 111-4, 2023.
9. Y. H. Hayun, M. O. Puspasari, "Development of a high-performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of theophylline, guaifenesin and diphenhydramine in an elixir," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 2501-6, 2017.
10. M. T. Ragab, N. K. Ramadan, N. A. El-Ragehy, B. A. El-Zeany, "Thin layer chromatography–Spectro densitometric determination of a three-component mixture of propyphenazone, caffeine, ergotamine tartrate, and two of their impurities with application to tablets, spiked human plasma, and green profile assessment," *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC*, 36, 295-305, 2023.
11. M. K. Mahibub, A. M. Aman Shah, A. S. Munavvar Zubaid, A. Noor Shahida, A. M. Malik Shah, "Buffer-Free High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Theophylline in Pharmaceutical Dosage Forms," *Trop J Pharm Res*, 13, 149-153, 2014.
12. S. L. Sophi, S. Martono, A. Rohman, "Validation and quantification of theophylline and salbutamol using ion pair liquid chromatography," *Indones. J. Pharm.* 27, 190 – 195, 2016.
13. C. Jung-woo, K. Dong-hyun, L. Byung-yo, K. Eun jung, K. Kwang-il, "Development and validation of a sensitive

ستون گردیده و استفاده از متانول نیز هزینه آنالیز را کاهش می دهد با توجه به آنکه ضریب رگرسیون بزرگ تر از ۰/۶۶۷ است، خطی بودن رابطه غلظت و پاسخ برای نمونه اثبات گردیده و میانگین بازیافت ۹۹/۸۹ تا ۱۰۰/۴۵ است. این روش نتیجه اعتبارسنجی و دقت و گزینش پذیری خوبی را نشان می دهد و با توجه به آسان بودن این روش می توان از آن برای سنجش دو ترکیب بطور همزمان استفاده کرد و بسیار سریع، دقیق، انتخابی است [18].

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از کلیه مراکز تحقیقاتی که در این پژوهش همکاری کرده اند، اعلام می دارند.

مراجع

1. N.A. Puspita, M.M. Rissa, "Tingkat Pengetahuan Masyarakat Tentang Obat Generik, Obat Bermerk, Dan Obat Paten," *Jurnal Farmasi Higea*, 14,141-50, 2023.
2. S. Kondra, A. K. Pawar, A. T. Bapuji, P. D. Shankar, "Development of a rapid and validated stability-indicating UPLC-PDA method for concurrent quantification of impurity profiling and an assay of ipratropium bromide and salbutamol sulfate in inhalation dosage form," *In Annales Pharmaceutiques Françaises*, 81, 300-314, 2023.
3. A. Mohamed, M. A. Korany, O. T. Fahmy, H. Mahgoub, H. M. Maher, "High performance liquid chromatographic determination of some guaifenesin-containing cough cold preparations," *Journal of Advanced Research*, 2, 121–130, 2011
4. M.S. Ali, A. E. Karim, M. Z. Mohye, A. M. Almetwali, S. N. Ibrahim, "Simultaneous determination of Guaifenesin, codeine phosphate, phenylephrine hydrochloride, and sodium benzoate in pharmaceutical form by RP-HPLC," *Journal for Pure Sciences*, 7,173-83, 2023.
5. Y. Du, Q. Yan, M. Zhan, Q. Zhang, D. Huang, P. Zhang, J. Yan, J. Wang, X. Huang, L. Han, "Evaluation and clinical application of a bracketing calibration-based isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference measurement procedure for serum theophylline," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2,1-10, 2024.

LC–MS/MS method for the simultaneous quantitation of theophylline and its metabolites in rat plasma,” *Journal of Chromatography B*, 889, 44–49, 2012.

14. P. K. Gaddey, R. Sundararajan, “Development of a stability indicating method and study of forced degradation pathway of choline theophyllinate and salbutamol by liquid chromatography–mass spectrometry,” *Chemistry Africa*, 7,777-98, 2024.

15. M. Mukesh, S. Ranjit, “Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Salbutamol Sulphate and Theophylline in Pharmaceutical Dosage Forms,” *Analytical & Bioanalytical Techniques*. Maithani and Singh *J Anal Bioanal Techniques*, 2,1,2011.

16. L. Wang, T. S. George, G. Feng, “Concepts and consequences of the hyphosphere core microbiome for arbuscular mycorrhizal fungal fitness and function,” *New Phytologist*, 242, 1529-33, 2024.

17. J. W. Chae, D. H. Kim, B. Y. Lee, E. Jung Kim, K. I. Kwon, “Development and validation of a sensitive LC–MS/MS method for the simultaneous quantitation of theophylline and its metabolites in rat plasma,” *J. Chromatogr. B Biomed. Appl*, 889, 44–49,2012.

18. S. R. Alla, R. Seemaladinne, S. Cheemalapati, O. P. Doshi, “A quick and standard pharmaceutical industrial approach to develop a robust analytical method by HPLC,” *Journal of Scientific and Engineering Research*, 11,168-73, 2024.



Development and validation of the simultaneous measurement method of theophylline and guaifenesin by HPLC in pharmaceutical forms

N. Alishahi¹, G. Bagheri^{2*}

¹Department of Medicinal Chemistry, Islamic Azad University, Shahriar Branch, Shahriar, Iran

²Department of chemical engineering, Islamic Azad University, Shahriar Branch, Shahriar, Iran

Abstract: The purpose of this research is to determine the effective amount and validate the high-performance and low-cost liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous analysis of theophylline (TH) and guaifenesin (GF), which have a wide spectrum overlap, in the form of theophylline G syrup. In the presented method, the C8 column with a length of 4.6 mm and a particle size of 5 microns and the parameters of selectivity, calibration curve, range, linearity, precision, accuracy, detection limit and measurement limit were used to validate the analysis method. Is. The inhibition time of theophylline and guaifenesin was 3.3 and 6.5 minutes, respectively. The minimum detectable concentration and the minimum measurable concentration obtained were 1.94 and 4.05 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The proposed method is very selective, sensitive and accurate and is suitable for the simultaneous analysis of TH and GF in syrup form. The absence of buffer and the use of a small amount of organic solvents increase the life of the column and reduce the cost of theophylline and guaifenesin analysis in the industry.

Keywords: Liquid chromatography, theophylline G, guaifenesin, validation, buffer.