فصلنامه‌ی پژوهشهای نوین در شیمی تجزیه، بهار ۱۳۹٤، دوره‌ی ۱، شماره‌ی۲/ ۱۰٦-۹۹
Journal of Advanced Researches in Analytical Chemistry, Spring 2015, Vol. 1, No. 2/ 99-106

انحلال مقایسه‌ای و اندازه‌گیری تربینافین هیدروکلراید در کرم های دارویی با کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

شهلا مظفری[۱]، الهام غندالی[۲،*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۱۴**

چکیده

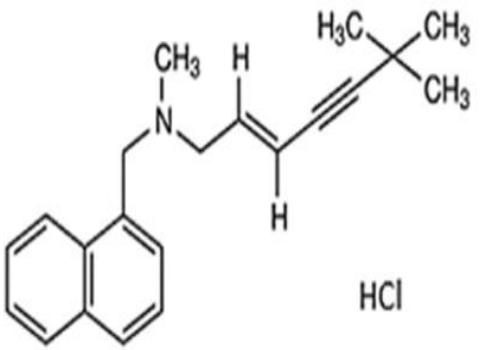
داروی تربینافین هیدروکلرید از گروه دارویی ضد قارچ‌ها و برای درمان انواع عفونت‌های قارچی است و لازم است ماده مؤثره موجود در فرمولاسیون آن با دقت تعیین گردد. در این تحقیق یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا که روشی سریع، ساده، دقیق، صحیح، تکرارپذیر و حساس است برای تعیین مقدار تربینافین هیدروکلرید آزاد شده از کرم، به کاربرده شده است. جداسازی بر روی ستون (waters C۸–RPC۸، ۱۵۰× ۳/۹ mm، ۵ µm) به روش ایزوکراتیک و با استفاده از مخلوط ۳ حجم محلول (۰/۸۵گرم در لیتر مونوبازیک پتاسیم فسفات (۰/۰۰۶مولار) به همراه یک گرم سدیم ۱-هگزان سولفونات با pH برابر ۳) و۲ حجم استونیتریل به عنوان فاز متحرک و با سرعت جریان ۱/۸ میلی‌لیتر در دقیقه و در طول موج ۲۲۰ نانومتر انجام شد که زمان بازداری حدود ۴ دقیقه بود. این روش برای تربینافین هیدروکلرید انتخابی است وگستره خطی این روش ۰/۰۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، دقت در یک روز، دقت در بین روزها، صحت، حد تشخیص ۰/۰۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، حد اندازه گیری ۰/۰۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد. در قسمت دوم مطالعه بر روی محیط آزادسازی مناسب برای کرم انجام شد و به این نتیجه رسیدیم که محیط ۵۰ حجم اتانول و۵۰ حجم آب مناسب می‌باشد. سپس مقایسه نمونه ایرانی با نمونه خارجی (مرجع) صورت گرفت. طبق محاسبات نتایج حاصل از این دو نمونه بر هم منطبق بودند.

واژه‌های کلیدی: تربینافین هیدروکلرید، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، آزادسازی کرم، روش اعتباریابی

[۱]. استادیار شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران (شرق)؛
Email: sh_mozafari@pnu.ac.ir
[۲،*]. **نویسنده‌ی مسئول**: کارشناس ارشد شیمی، دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق

۱- مقدمه

در صنعت داروسازی برای تبدیل داروی تربینافین به شکل فرآورده‌ای قابل استفاده برای بیماران از ماده اولیه تربینافین هیدروکلراید استفاده می‌شود که توضیح مختصری درباره آن داده می‌شود. تربینافین هیدروکلراید نمک هیدروکلراید ترکیب (E)-N-(6,6-dimethyl-2-heptan-4-ynyl)-N-methyl-1-naphthalenemethylamine,hydrochloride می‌باشد و ساختمان مولکولی آن در شکل ۱ نشان داده شده است (ماتیسوا[1] و همکاران، ۲۰۰۶). این دارو برای درمان انواع عفونت‌های قارچی موضعی ناخن و پوست به کار می رود. تربینافین اثر ضد قارچی دارد و از طریق مهار اسکوالن اپوکسیداز، یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز استرول قارچ‌ها، عمل می‌نماید. این عمل باعث کاهش ارگوسترول و تجمع اسکوالن در سلول‌های قارچ و مرگ سلولی آن می‌گردد. اشکال دارویی آن به صورت قرص ۲۵۰ میلی‌گرمی، محلول و اسپری ۱ درصد و کرم ۱ درصد می‌باشد. (ایوانس[2] و همکاران، ۱۹۹۳). تربینافین هیدروکلراید جامدی سفید تا زرد کمرنگ است و نقطه ذوب آن ۲۰۴ تا ۲۰۸ درجه سانتیگراد می‌باشد. در الکل و متانول به راحتی حل می‌شود ولی در استن کم محلول و در آب نامحلول می‌باشد (مانسکیو[3] و همکاران، ۲۰۱۱).



شکل ۱. ساختمان مولکولی تربینافین هیدروکلراید

---

1. Matysová & et al
2. Evans & et al
3. Mănescu & et al

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

از کرم تربینافین هیدروکلراید ۱ درصد ساخت شرکت داروسازی تهران شیمی با شماره ساخت ۰۶۸ و از کرم تربینافین هیدروکلراید ۱ درصد ساخت شرکت داروسازی لایف استار کشور هندوستان با شماره ساخت ALL001 استفاده شده است. استونیتریل با خلوص HPLC و سایر مواد و حلّال‌ها با خلوص تجزیه ای می‌باشند.

۲-۲- مطالعه آزادسازی کرم تربینافین هیدروکلراید

آزادسازی تربینافین هیدروکلراید از کرم توسط یک غشاء سلولزی و دستگاه Diffusion cells (Franz cells) انجام شده است. غشاء سلولزی به مدت یک شبانه روز در محیط انحلال خیسانده شده تا عمل تر شدن غشا کامل شده و تغییرات لازم در منافذ آن صورت پذیرد. این دستگاه شیشه‌ای می‌باشد و از سه قسمت تشکیل شده است. اولین قسمت محلی است که دارو در آنجا قرار می‌گیرد، قسمت بعدی محفظه محلول گیرنده می‌باشد و این دو قسمت توسط غشاء از هم جدا می‌شوند. حدود ۷۵۰ میلی گرم از کرم در روی غشاء قرار داده شده است و محلول گیرنده نیز شامل مخلوط مساوی از آب و اتانول می‌باشد. نمونه برداری در شش ساعت انجام شد و در هر بار نمونه برداری محیط انحلال جدید جایگزین شد. سپس غلظت تربینافین هیدروکلراید توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[1] اندازه-گیری شد. (موصطفی[2] و همکاران، ۲۰۱۰؛ لایبنبرگ[3] و همکاران، ۲۰۰۴ ؛ سایورت[4] و همکاران، ۲۰۰۳).

۲-۳- شرایط کروماتوگرافی

از دستگاه HPLC مدل Alliance ساخت کشور آمریکا با مدل دتکتور ۴۸۶ و مدل پمپ ۲۶۹۰ استفاده شده است. ستون مورد استفاده Symmetry - C۸، ۱۵۰× ۳/۹ mm،۵ µm می‌باشد. فاز متحرک شامل مخلوط دو حجم استونیتریل و سه حجم محلول زیر می‌باشد. محلول مورد نظر شامل مخلوط ۰/۸۵ گرم در میلی‌لیتر نمک پتاسیم دی هیدروژن فسفات و

---

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. Mustapha & et al
3. Liebenberg & et al
4. Siewert & et al

یک گرم نمک سدیم هگزان سولفونات می‌باشد که pH آن با اسید فسفریک روی ۳ تنظیم شده است. سرعت جریان فاز متحرک ۱/۸ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر می‌باشد. طول موج نیز ۲۲۰ نانومتر می‌باشد (فلوریا[1] و همکاران، ۲۰۰۹).

۲-٤- معادلات آزادسازی دارو

آزادسازی داروی تربینافین هیدروکلراید به وسیله معادله هیگوچی[2] محاسبه می‌شود:

$$Q/A=2C_0v\ (D\times t/\pi) \quad (۱)$$

در جاییکه Q، مقدار داروی آزاد شده و D، ضریب انتشار است که نشان دهنده میزان داروی منتشر شده در دستگاه می‌باشد و t، زمان و A، مساحت غشاء وC_0 غلظت اولیه دارو در دستگاه و π عدد ثابت می‌باشد. رابطه ۱ می تواند به رابطه ۲ ساده شود:

$$Q/A=kt^{1/2} \quad (۲)$$

در جاییکه k، ثابت سرعت آزادسازی دارو می‌باشد که توسط شیب خط منحنی مقدار آزادسازی دارو در واحد سطح در مقابل ریشه دوم زمان بدست می‌آید.

ضریب انتشار دارو در دستگاه توسط ثابت سرعت آزادسازی دارو تخمین زده می‌شود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین پارامترهای آماری

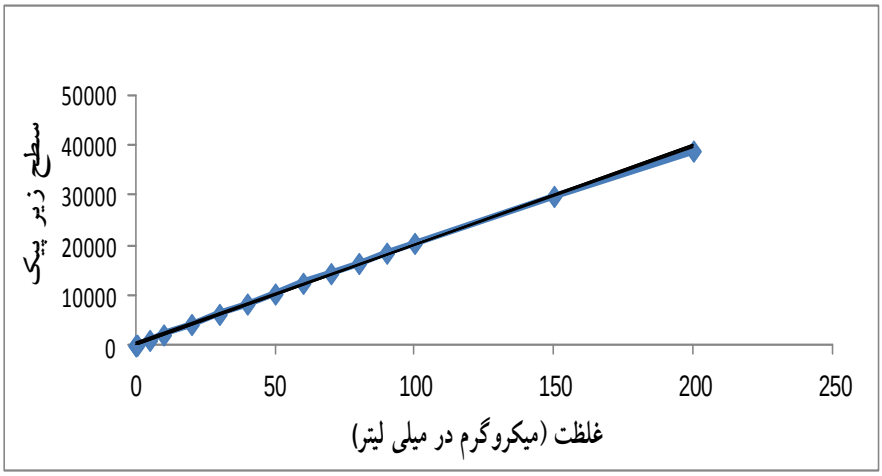
پارامترهای آماری براساس فارماکوپه آمریکا (USP ۳۵) و دستورالعمل[3] ICH می‌باشد (گایدلاین[4]، ۲۰۱۰).

۳-۱-۱- محدوده خطی بودن

محدوده خطی بودن بین ۰/۰۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. در سه روز متوالی هر نمونه سه بار تزریق شد. برای بدست آوردن منحنی کالیبراسیون میانگین سطح زیر پیک هر نمونه در مقابل غلظت تربینافین هیدروکلراید رسم شده است. معادله خط و ضریب رگرسیون نیز محاسبه شده است. منحنی آن در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

---

1. Florea & et al
2. Higuchi Equation
3. International Conference on Harmonization Gguidelines (ICH)
4. Guideline



شکل۲. منحنی سطح زیر پیک تربینافین هیدروکلراید در مقابل غلظت جهت نشان دادن محدوده خطی

۳-۱-۲- حد تشخیص و حد اندازه گیری

برای بررسی این پارامترها از روش تزریق شاهد و اندازه گیری انحراف استاندارد و جایگزینی در رابطه ۳ و ۴ استفاده شد ه است. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

$$LOD = \frac{3\times SD_{bl}}{a} \quad (۳)$$

$$LOQ = \frac{10\times SD_{bl}}{a} \quad (۴)$$

که در این رابطه ها: SD_{bl} انحراف استاندارد محلول شاهد و a شیب منحنی استاندارد در بخش محدوده خطی بودن می‌باشد.

۳-۱-۳- دقت

بر طبق ICH، دقت یک روش تجزیه‌ای به نزدیکی نتایج یک سری اندازه‌گیری‌های حاصل از چند بار نمونه برداری از یک نمونه واحد اطلاق می‌شود. که برای این پارامتر از دو روش بررسی دقت در یک روز و بررسی دقت در چند روز استفاده شد. برای روش بررسی در یک روز شش اندازه گیری سه سطح غلظتی در یک روز و برای روش بررسی در چند روز سه اندازه گیری در سه سطح غلظتی در سه روز متوالی انجام شد. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

۳-۱-٤- صحت

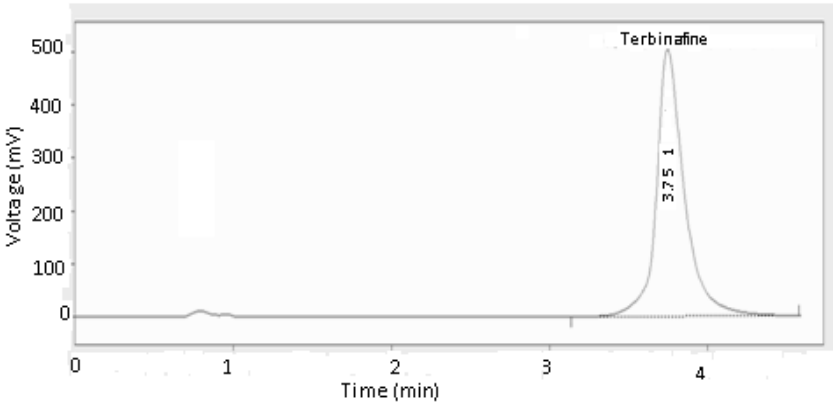
بر طبق ICH، صحت یک روش تجزیه‌ای به نزدیکی مقدار بدست آمده از یک اندازه گیری به مقدار واقعی اطلاق می‌شود. برای بررسی این پارامتر سه غلظت در سطح غلظتی ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ درصد نسبت به غلظت اصلی تهیه شد. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. پارامترهای آماری

پارامترهای آماری	معیارها		نتایج
دقت	بررسی در یک روز	(n=۶)٪۵۰	RSD = ٪۰/۱
		(n=۶)٪۱۰۰	RSD = ٪۰/۱۹
		(n=۶)٪۱۵۰	RSD =٪۰/۲۵
	بررسی در چند روز	(n=۳)٪۵۰	RSD = ٪۰/۱۹
		(n=۳)٪۱۰۰	RSD = ٪۰/۱۳
		(n=۳)٪۱۵۰	RSD = ٪۰/۱۷
صحت	(n=۳)٪۵۰		۹۹/۵۷±۰/۳۸
	(n=۳)٪۱۰۰		۱۰۰/۱۹±۰/۶۳
	(n=۳)٪۱۵۰		۱۰۰/۸۴±۰/۳۳
خطی بودن	معادله خط		Y=۱۹۶/۹۵X+ ۳۲۷/۵۵
	R^2		۰/۹۹۹۱
محدوده خطی			۲۰۰ -۰/۰۵ میکروگرم در میلی لیتر
حد تشخیص			۲/۸ نانوگرم در میلی لیتر
حد اندازه گیری			۸/۴ نانوگرم در میلی لیتر

۳-۲- آزمایش مناسب بودن سیستم کروماتوگرافی

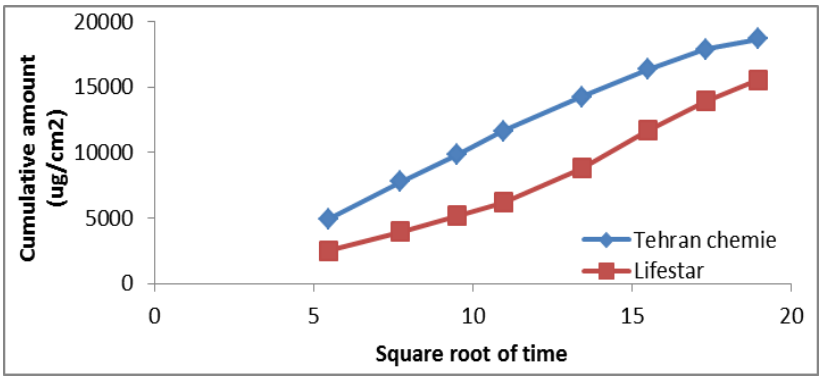
این آزمایش بر اساس فارماکوپه آمریکا (USP ۳۵) انجام شده است. زمان بازداری، فاکتور تقارن، تعداد صفحات فرضی و فاکتور ظرفیت به ترتیب ۳/۷۵ دقیقه، ۱/۰، ۶۴۶۴، ۳/۷۵ می باشد. نمونه کروماتوگرام در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳. نمونه کروماتوگرام تربینافین هیدروکلراید

۳-۳- آزمایش آزادسازی کرم تربینافین هیدروکلراید

مطالعات ما بر روی آزادسازی کرم تربینافین هیدروکلراید و مقایسه آزادسازی نمونه کرم تهران شیمی با نمونه کرم Lifestar انجام گرفته است که در ابتدا شرایط کروماتوگرافی و محیط انحلال مورد بررسی قرار گرفت سپس تاثیر غلظت دارو بر آزادسازی دارو از میان غشاء مورد مطالعه قرار گرفت. منحنی آزادسازی کرم تربینافین هیدروکلراید شرکت داروسازی تهران شیمی و شرکت داروسازی لایف استار در شکل ۴ آورده شده است. این منحنی بر اساس مقدار آزاد شده دارو برحسب میکروگرم در سانتی‌متر مربع در مقابل ریشه دوم زمان رسم شده است.



شکل ۴. مقدار تربینافین هیدروکلراید برحسب میکروگرم در سانتی متر مربع در مقایل ریشه دوم زمان

٤- نتیجه‌گیری

در این مقاله یک روش ساده و موثر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا معتبرسازی شده است و پارامترهای دقت، صحت، محدوده خطی، حد تشخیص و حد اندازه گیری در محدوده مطلوبی قرار دارند. این روش مختص اندازه گیری و تشخیص تربینافین هیدروکلراید در آزمایش انحلال مقایسه‌ای می‌باشد. بنابراین دو فرآورده‌ای که مورد بحث این مقاله می‌باشد طبق دستورالعمل‌های سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا دارای پروفایل معادل هستند.

منابع

Evans, E G V., Dodman, B., Williamson, D M., Brown, G.J. and Bowen, R.G. (1993). Comparison of terbinafine and clotrimazole in treating tinea pedis, *British Medical Journal*, 307: 645-64

Florea, M., Arama, C.C. and MonciuC.M. (2009). Determination of terbinafine hydrochloride by ion-pair reversed phase liquid chromatography, *Farmacia*, 57: 82-88.

Guideline, I.H.T., *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodoloy Q2 (R1)*, [Online],<http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html>, [November 2005].

Liebenberg, W., Engelbrecht, E., Wessels, A., Devarakonda, B., Yang, W. and Villiers, M.M.D.E. (2004). Comparative Study Of The Release Of Active Ingredients From Semisolid Cosmeceuticals Measured With Franz, Enhancer Or Flow-Through Cell Diffusion Apparatus, *Journal of Food and Drug Analysis*, 12: 19-28.

Mănescu, O., Lupuleasa, D. Miron, D.S., Budura, E.A. and Rădulescu, F.S. (2011). In vitro drug release from topical antifungal pharmaceutical formulations, *Farmacia*, 59: 15-23.

Matysová, L., Solich, P., Marek, P., Havlíková, L., Nováková, L. and Šícha, J. (2006). Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method, *Talanta*, 68, 3:713-720.

Mustapha, R.B., Lafforgue, C. and Fenina , N. (2010). Percutaneous absorption of piroxicam: In vitro release and percutaneous absorption from different concentration gels, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8: 90-95.

Siewert, M., Dressman, J., K. Brown, C. and P. Shah, V. (2003). FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms, *AAPS PharmSciTech*, 4: 43-52.