مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (39) العدد (1) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (39) No. (1) 2017

طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مؤشرة للثبات لمقايسة بنتوكسيفيلين في أشكاله الصيدلية

د. آيات عبود*

(تاريخ الإيداع 5 / 8 / 2016. قُبِل للنشر في 27 / 2 /2017)

□ ملخّص □

تصف هذه الدراسة طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مؤشرة للثبات لمقايسة بنتوكسيفيلين في أشكاله الصيدليه. جرى فصل المادة الدوائية بنجاح عن نواتج التدرك، بعد تعريضها لشروط اجهاد، باستعمال عمود C18 وطور متحرك مكون من ماء وميثانول (60: 40، حجم: حجم) بتدفق 1 مل/د وطول موجة 272 نانومتر. كان زمن احتباس بنتوكسيفيلين نحو 14 دقيقة. جرى توثيق مصدوقية الطريقة فيما يتعلق بالخطية، الدقة، المضبوطية، والانتقائية. أثبتت الخطية على مجال من 0.6 مكغ/مل الى 3.5 مكغ/مل وكان R^2 0.994. كانت الطريقة مضبوطة (قيم استعادة 100.1%) ودقيقة (RSD <2%). كان حد الكشف وحد الكم 0.2 مكغ/مل و 0.4 مكغ/مل على التوالي. طبقت الطريقة بنجاح لمقايسة بنتوكسيفيلين في المضغوطات مديدة التحرر المتوفرة في السوق السورية.

الكلمات المفتاحية: HPLC مؤشرة للثبات، بنتوكسيفيلين، كافئين، مصدوقية الطريقة، ثبات.

* مدرسة – قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية – كلية الصيدلة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (38) العدد (6) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (38) No. (6) 2016

Stability-indicating HPLC method for pentoxifylline assay in pharmaceuical dosage forms

Dr. Ayat Abbood*

(Received 5 / 8 / 2016. Accepted 27 / 2 / 2017)

☐ ABSTRACT ☐

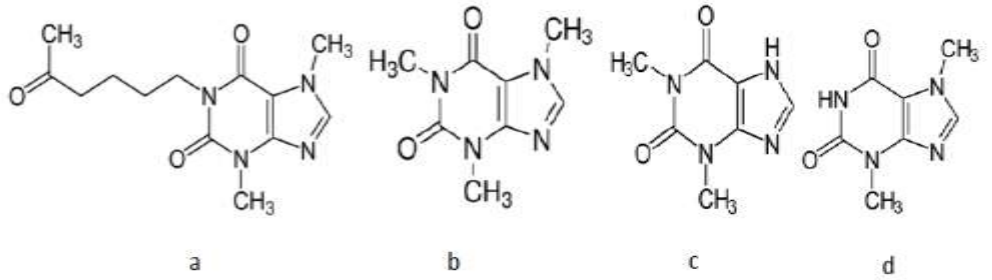
The present study describes a simple stability-indicating reversed-phase HPLC assay for pentoxifylline in its pharmaceutical dosage forms. Separation of the drug and the degradation products، under stress conditions was successfully achieved on a C18 column utilizing water: MeOH (60:40 v/v)، pumped at a flow rate of 1 ml min-1 with UV detection at 272 nm. The retention time of pentoxifylline was about 14 min. The method was satisfactorily validated with respect to linearity، precision، accuracy and selectivity. The response was linear in the range of 0.6-3.5 µg/ml with R2 0.994. The method was accurate (recovery 100.1%) and precise (RSD < 2%). Detection and quantification limit were 0.2 µg/ml and 0.4 µg/ml respectively. The suggested method was successfully applied for the analysis of pentoxifylline in extended release tablets available in Syrian market.

Keywords: Stability indicating-HPLC; Pentoxifylline; Caffeine; Validation; Stability.

***Assistant Professor، Pharmaceutical chemistry and drug quality control Department، Faculty of Pharmacy، Tishreen University، Lattakia، Syria.**

مقدمة:

تضم قلويدات ميتل كزانين methylxanthines مركبات طبيعة مثل كافئين caffeine تيوفيلين theophylline وثيوبرومين theobromine اضافة إلى مشتقات نصف صنيعة أو صنعية مثل بنتوكسيفيلين pentoxifylline وأمينوفيلين aminophylline (شكل 1) [1].



شكل 1: البنيه الكيميائية: بنتوكسيفيلين (a)، كافئين لا مائي (b)، تيوفيلين لامائي ،(c) تيوبرومين(d).

يقوم بنتوكسيفيلين بتغيير شكل كريات الدم الحمراء في الدم، مما يجعلها تمر بسهولة عبر الشعيرات الدموية والشرايين، لذلك يستعمل لتحسين جريان الدم في الجسم، مما يقلل من التشنج والألم في الساقين والقدمين واليدين في بعض أمراض الأوردة والشرايين. كما يعمل على زياده إمداد الانسجة بالأوكسجين في الأمراض الوعائية المحيطية [2].

استخدمت في الأدبيات العالمية طرائق متعددة لمقايسة بنتوكسيفيلين سواء في الحيوية أو في الزجاج مثل: الكروماتوغرافيا الغازية gas chromatography (GC) [3، 4]، لكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة thin layer chromatography (TLC) [5]، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء high performance thin layer chromatography (HPTLC) [6]، طرائق مطيافية spectrophotometric methods [7 ، 8]، طرائق كهركيميائيةelectrochemial methods [9،10]، كروماتوغرافيا الحركية الكهربائية الشعرية للمذيلات micellar electrokinetic (MECK) chromatography [11].

تعد الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء high performance liquid chromatography (HPLC) الطريقة الأكثر استخداماً تراكيز بنتوكسيفيلين سواء في السوائل الحيوية أو في أشكاله الصيدليه [12–15]. حديثاً، طور كوراني وزملاؤه طريقة HPLC من نمط الطور العكوس (reversed–phase RP) لفصل بنتوكسيفيلين عن شوائبه الدستورية (كافئين وتيوفيلين) [16]. جرى استخدام تمليص مدروج gradient elution لطور متحرك مكون من وقاء فوسفات الصوديوم pH 2.3 وميثانول. طبقت الطريقة بنجاح لفصل بنتوكسيفيلين عن نواتج التخرب بعد تعريضه لشروط تخريب قاسية. عمدت الدراسة الحالية أيضاً إلى فصل بنتوكسيفيلين عن نواتج تدركه بعد تعريضه لشروط قاسية لكنها هدفت الى ايجاد طريقة تمليص متساير isocratic elution لطور متحرك مكون من ماء وميثانول فقط دون اضافة اي ملح باستخدام RP–HPLC. في البداية جرى التحقيق من مصدوقية الطريقة validation method من أجل الخطية linearity، المضبوطيةِ accuracy، الدقة precision، الانتقائية selectivity، حد الكشف limit of detection (LOD) وحد الكم limit of quantification (LOQ). ثم جرى دراسة تخريب بنتوكسيفيلين معياري في شروط قاسية: حمضية، قلوية، مؤكسدة، وحرارة. في النهاية، جرى تطبيق الطريقة لتحديد المحتوى من بنتوكسيفيلين في المضغوطات مديدة التحرر المتوفرة في السوق الدوائية السورية.

تكمن أهمية البحث في ايجاد طريقة HPLC مؤشرة للثبات كمية ومصدوقة يمكنها التحري عن التغيرات التي يمكن أن تحصل في خواص بنتوكسيفيلين سواء في مادته الأولية أو ضمن أشكاله الصيدلية وبالتالي ضمان جودة الأشكال الصيدلية الحاوية على بنتوكسيفيلين والمتوفرة في السوق الدوائية المحلية.

المواد والأجهزة والطرائق:

1. المواد:

استخدم في هذه الدراسة: كافئين، ميتانول ذو درجه نقاوة HPLC، NaOH، HCl 37%، H_2O_2 30% (MERCK،Germany). قُدم بنتوكسيفيلين كعياري داخلي من شركة يونيفارما.

2. تحضير محاليل بنتوكسيفيلين العيارية:

حُضر في البداية محلول أم تركيز 1.5 ملغ/مل من بنتوكسيفيلين في الطور المتحرك. حُضرت محاليل ممددة منه بتركيز بين 0.6 –3.5 ملغ/مل حيث حُضر كل تركيز ثلاث مرات.

3. جهاز HPLC والشروط الكروماتوغرافية:

أنجزت الدراسة باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء HPLC مزود بمضخة (Jasco Pu–2089 Plus)، حاقن يدوي Rheodyne 7725i injector Cotati، CA، USA)، ومكشاف المصفوفة الديودية (Jasco DAD–2070). أنجز فصل بنتوكسيفيلين عن نواتج التدرك ضمن الشروط الكروماتوغرافية التالية: عمود C18(Hypersil BDS C18، أبعاده 4.6*250 ،ملم)، طور متحرك مكون من ماء مقطر: ميثانول (40:60، حجم:حجم)، سرعة التدفق 1 مل/الدقيقة، حجم الحقنة 20 ميكرولتر، طول موجة المكشاف 272 نانومتر.

4. مصدوقية الطريقة:

اعتماداً على ارشادات المؤتمر العالمي للمواءمة ICH Q2AR1، جرى التحقيق من مصدوقية الطريقة من خلال اجراء مجموعة من المتثابتات: الخطية، التكرارية، الدقة الوسطى، المضبوطية والانتقائية.

حُسبت الخطية من خلال تحضير سلسلة عيارية من بنتوكسيفيلين بتراكيز بين 0.6 – 3.5 ملغ/مل. حقنت ضمن جهاز HPLC بواقع ثلاث مكررات، وحددت المساحة تحت القمة لكل تركيز ومن ثم رسم الخط البياني، وحسب معامل الارتباط R^2.

جرى تقييم تكرارية الطريقة من خلال حقن ست عينات متتالية من محلول بنتوكسيفيلين المعياري وحساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري النسبي RSD، كما قيمت الدقة الوسطى من خلال حقن محلول بنتوكسيفيلين معياري في أيام مختلفة.

لدراسة الاسترداد، جرى اضافة 25، 50 ملغ من الى عينات بنتوكسيفيلين التجارية ومن ثم قيس محتوى بنتوكسيفيلين فيها كما ذكر سابقاً والتكرار ثلاث مرات وحساب متوسط الاستعادة.

جرى تقييم انتقائية الطريقة من خلال حقن مزيج من بنتوكسيفيلين وكافئين.

لدراسة حد الكشف وحد الكم للطريقة المتبعة، حقن الطور المتحرك وفق الشروط المستخدمة في الطريقة، حدد الضجيج ومن ثم حسب حد الكشف الذي يقابل قمة ارتفاعها يساوي (الضجيج X 3) وحد الكم الذي يقابل قمة ارتفاعها يساوي (الضجيج X 10).

5. التحقق من كون الطرائق المستخدمة في المقايسة مؤشر للثبات:

اعتمد في دراسة كون الطريقة مؤشرة للثبات أقسى الشروط الممكن تطبيقها والتي تشمل: التخريب في وسط حمضي، قلوي، ومؤكسد، والتعرض للحرارة وذلك لتسريع تخريب المادة الفعالة.

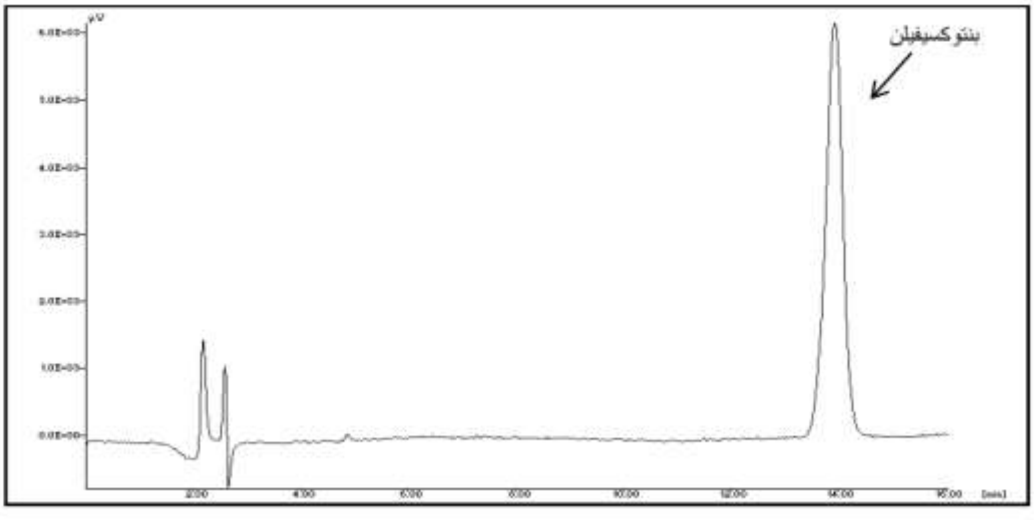
لإجراء هذه الدراسة جرى وضع 5 مل من محلول بنتوكسيفيلين العياري الأم في 4 دوراق حجمية سعتها 50 مل. اضيف 5 مل من حمض هيدروكلوريك 2 M إلى الدورق الاول، 5 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 2 M إلى الدورق الثاني، 5 مل من محلول الماء الاوكسجين 30% إلى الدورق الثالث، 5 مل من الماء المقطر إلى الدورق الرابع. جرى تسخين المحاليل لمده 3 ساعات ضمن حمام مائي ذو درجة حرارة 70°م تركت المحاليل لتبرد ومن ثم عدل الوسط في حالة التخريب الحمضي والقلوي بإضافة 5 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم أو من محلول هيدروكلوريك. جرى اكمال حجم المحاليل باستخدام الطور المتحرك إلى الحجم المحدد 50 مل. مددت ومن ثم حقنت في جهاز HPLC. أجريت نفس الدراسة السابقة لكن دون تسخين المحاليل حيث تركت المحاليل مدة 3 ساعات في درجة حرارة الغرفة.

6. تطبيق على مستحضرات بنتوكسيفيلين التجارية:

لتحضير محلول العينة المدروسة، وزنت 10 مضغوطات وحسب الوزن الوسطي للمضغوطة الواحدة. ثم سحقت المضغوطات بشكل ناعم وأخذت كمية من هذا المسحوق بما يعادل 50 ملغ من بنتوكسيفيلين، نقلت هذه الكمية إلى دورق حجمي سعة 100 مل وأذيبت بكمية مناسبة من المذيب ثم جرى تحريكها لمدة 30 دقيقة وأكمل الحجم بالمحل حتى خط العيار ثم رشح وطرد الغاز منه. مدد المحمول الناتج بالطور المتحرك حتى الحصول على التركيز المناسب للحقن ضمن جهاز HPLC.

النتائج والمناقشة:

هدفت الدراسة إلى التحقق من مصدوقية طريقة مؤشرة لثبات بنتوكسيفيلين. أنجزت الطريقة باستخدام عمود C18 وطور متحرك مكون من ماء وميثانول (40: 60، حجم :حجم) حيث وجد أن زمن احتباس بنتوكسيفيلين المعياري نحو 14 دقيقة (شكل 2).



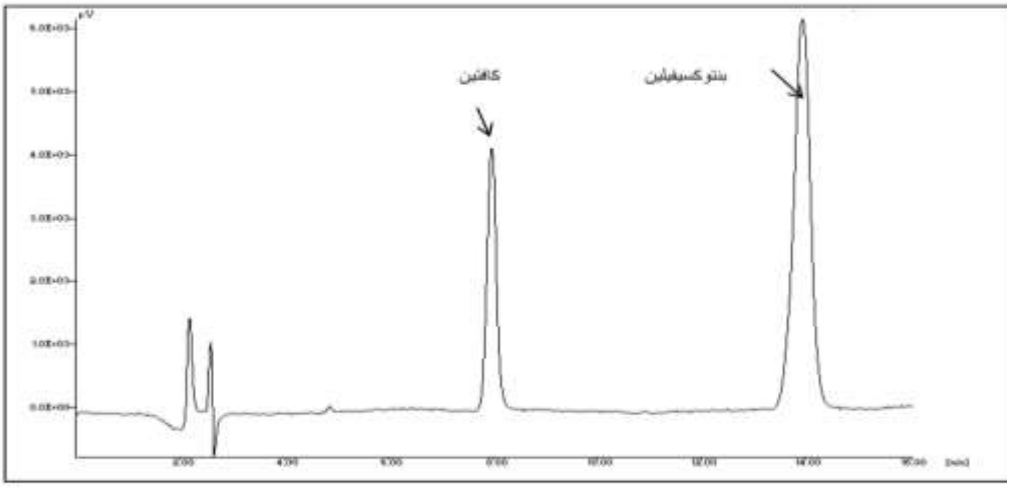
شكل 2: كروماتوغرام لمحلول بنتوكسيفيلين معياري ، الشروط الكروماتوغرافية مذكورة في الفقرة 4.2.

1.3. مصدوقية الطريقة:

جرى التحقق من مصدوقية الطريقة وفق القواعد المتعارف عليها في المؤتمر العالمي للمواءمة ICH. أبدت الطريقة خطية ضمن مجال تراكيز بنتوكسيفيلين المدروسة، حيث وجد أن معامل الارتباط 0.994 ومعادلة الارتباط الخطي $y = 67833x - 14585$. كانت قيمة وسطي النسبة المئوية للاستعادة عند إجراء المضبوطية (103.5%)، أما عند إجراء التكرارية والدقة الوسطى فكانت قيم الانحراف المعياري النسبي لزمن الاحتباس ومساحة القمة أقل من 3 % (جدول 1). كانت الطريقة قادرة على فصل المادة الدوائية عن ناتج التخرب (كافئين) مع معامل ميز >1.5 مما يدل على انتقائية الطريقة (شكل3). وجد أن حد الكشف وحد الكم لبنتوكسيفيلين 0.2 مكغ/مل و0.4 مكغ/مل على التوالي.

جدول 1: نتائج دراسة التكرارية والدقة الوسطى للطريقة.

		خلال يوم واحد		خلال 3 أيام	
		زمن الاحتباس	مساحة القمة	زمن الاحتباس	مساحة القمة
بنتوكسيفيلين 1.3 مكغ/مل	المتوسط	13.92	66318	14.05	66527
	RSD	0.53%	1.07%	2.21%	1.90%

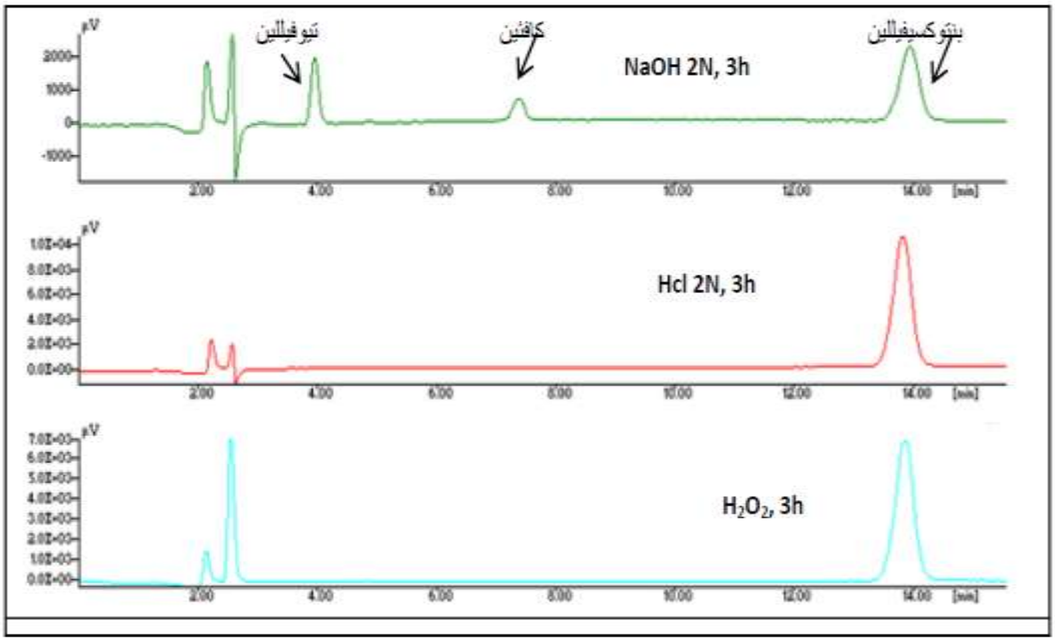


شكل 2: كروماتوغرام لمحلول بنتوكسيفيلين كافئين ، الشروط الكروماتوغرافية مذكورة في الفقرة 4.2.

2. دراسة ثبات محاليل بنتوكسيفيلين:

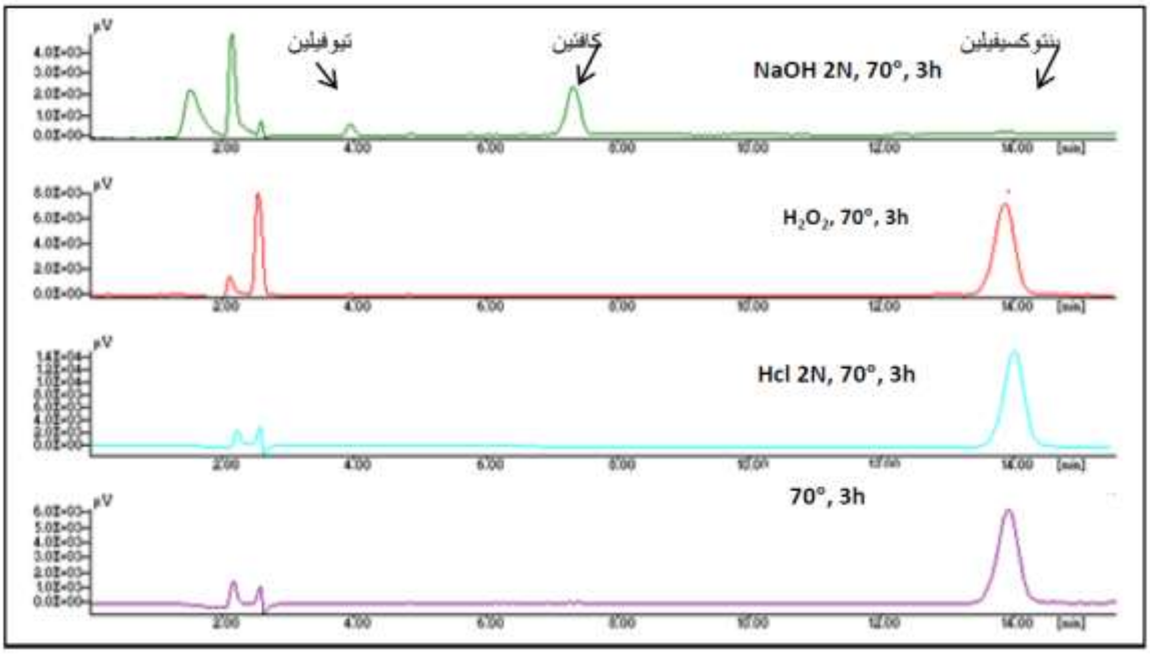
جرى التأكد من كون طريقة مقايسة بنتوكسيفيلين مؤشرة للثبات، حيث جرى استخدام أقسى الشروط الممكن تطبيقها لتسريع تخريب المادة الفعالة. جرى في هذه الدراسة تطبيق درجة حرارة عالية 70 ^{o}م لدراسة تخرب بنتوكسيفيلين اعتماداً على الدراسة التي قام بها Korany وزملاؤه لتطوير طريقة HPLC لفصل بنتوكسيفيلين عن نواتج تخربه [16].

أثبتت الطريقة أنها ملائمة للاستخدام في المقايسة الكمية للبنتوكسيفيلين ودراسة ثباته حيث أمكنها أن تفرق انتقائياً بين المادة الدوائية ونواتج تخربها. يوضح الشكل 4 دراسة تخرب بنتوكسيفيلين في أوساط حمضية وقلوية ومؤكسدة بعد3 ساعات في درجة حرارة الغرفة. نلاحظ ثبات بنتوكسيفيلين في الأوساط الحمضية والمؤكسدة لمدة 3 ساعات في درجة حرارة الغرفة حيث لم يلاحظ نواتج تخرب في حين أنو تعرض للتخرب فقط في الأوساط القلوية حيث ظهرت قمتان إضافيتان بجانب قمة بنتوكسيفيلين. تمثل القمة ذات زمن احتباس 7.5 دقيقة كافئين من خلال مقارنة زمن احتباسها مع زمن احتباس كافئين معياري. لم يتوفر لدينا مادة تيوفيلين معيارية للتأكد من ذاتية ناتج التخرب الاخر (زمن احتباس 4 دقيقة) لكن من المرجح انه التيوفيلين كون نتائج هذا العمل تتفق مع الدراسة التي قام بها Koranyوزملاؤه الذين لاحظوا أيضا ثبات بنتوكسيفيلين في الاوساط الحمضية، المؤكسدة، وعدم ثباته في الأوسط القلوية، حيث ظهر في تلك الدراسة ناتجي تخرب لبنتوكسيفيلين في الوسط القلوي هما كافئين وتيوفيلين مما يرجح أنها القمة الثانية هي تيوفيلين.



شكل 4: دراسة ثبات بنتوكسيفيلين في درجة حرارة الغرفة في شروط حمضية، قلوية، ومؤكسدة.

عند دراسة تخرب بنتوكسيفيلين باستخدام حرارة عالية 70 م لمدة 3 ساعات نلاحظ أيضاً ثباته في الأوساط الحمضية والمؤكسدة حيث لم يلاحظ نواتج تخرب (شكل 5). تعرض بنتوكسيفيلين للتخرب فقط في الأوساط القلوية، كما كانت قمة بنتوكسيفيلين قد اختفت تقريباً ليظهر كافئين كناتج تخرب أساسي اضافة إلى تيوفيلين بكمية قليلة.



شكل 5: دراسة ثبات بنتوكسيفيلين في درجة حرارة 70°م في شروط حمضية، قلوية، ومؤكسدة.

3. مقايسة بنتوكسيفيلين في المضغوطات مديدة التحرر:

بعد التحقق من مصدوقية طريقة HPLC المؤشرة لثبات بنتوكسيفيلين. جرى تطبيقها لمقايسته في المضغوطات مديدة التحرر المتوفرة في السوق المحلية. حققت جميع الأدوية التجارية المدروسة وهي ذات عيار 400 ملغ متطلبات الدستور الأمريكي حيث أن جميعها ضمن المجال 95 – 105% كما هو موضح في الجدول 2.

جدول 2: النسبة المئوية للمحتوى من بنتوكسيفيلين في المضغوطات مديدة التحرر

مضغوطات بنتوكسيفيلين مديدة التحرر 400 ملغ				
الشركة	B		A	
الوجبة	B1	B2	A1	A2
النسبة المئوية للمحتوى	99.43±0.782	102.49±0.86	100.37±0.856	101.12±0.833

الاستنتاجات والتوصيات:

قمنا في هذه الدراسة باستخدام طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء لمقايسة بنتوكسيفيلن. جرى التحقق من كونها مؤشرة للثبات فقد أمكن من خلالها فصل المادة الفعالة عن نواتج تخربها، كما جرى التحقق من مصدوقتيها مما يسمح باستخدام هذه

الطريقة في التحليل الكمي لبنتوكسيفيلين بشكله الصرف وضمن أشكاله الصيدليه في دراسات الثبات والتحليل الكمي بكافة أهدافها.

المراجع:

1- Monteiro J. P.، Alves M. G.، Oliveira P. F.، Silva B. M.، Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. Molecules، Vol 21، 2016، ، 974-1006.

2- McCarty M. F.، O'Keefe J. H.، DiNicolantonio J. J.، Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. Open Heart. Vol. 3، 2016، doi: 10.1136/openhrt-2015-000365.

3- Bauza M.T.، Smith R. V.، Knutson D. E.، Witter F. R.، Gas chromatographic determination of pentoxifylline and its major metabolites in human breast milk. J. Chromatogr. Vol. 310، 1984، 61-69.

4- Burrows J. L.، Jolley K. W.، Determination of pentoxifylline and four metabolites in plasma and urine by automated capillary gas chromatography using nitrogen-selective detection. J. Chromatogr. Vol 344، 1985، 187-98.

5- Smith R.V.، Yang S.K.، Davis P.J.، Bauza M.T.، Determination of pentoxifylline and its major metabolites in microbial extracts by thin-layer and high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A .Vol. 281، 1983، 281–287.

6- Grozdanovic O.، Antic D.، Agbaba D.، Development of a HPTLC method for in-process purity testing of pentoxifylline. J. Sep. Sci. Vol. 28، 2005، 575–580.

7- Rahmant B. M.، Islam M. A.، Wahed M. I.، Maruf Ahmed I.، Islam R.، Barman R. K.، Anisuzzaman A. S. M.، and Proma Khondkar، In-vitro Studies of Pentoxifylline Controlled-Release from Hydrophilic Matrices. J. Sci. Res. Vol. 1، 2009، 353-362.

8- Teresa G. P.، Charyulu N.R.، Harish N.M.، Vishalakshi B.، Design and In Vitro Evaluation of Pentoxifylline- Polyelectrolyte Complex Tablets. J. drug. deliv. ther. Vol. 3، 2013، 85-90.

9- Hegde R. N.، Nandibewoor S. T.، Electrochemical Oxidation of Pentoxifylline and its Analysis in Pure and Pharmaceutical Formulations at a Glassy Carbon Electrode. Analytical Letters. Vol. 41،. 6، 2008، 977-991.

10- Abbar J. C.، Malode S. J.، Nandibewoor S. T.، Electrochemical determination of a hemorheologic drug، pentoxifylline at a multi-walled carbon nanotube paste electrode. Bioelectrochemistry. Vol. 83، 2012، 1-7.

11- Korman M.، Vindevogel J.، Sandra P.، Application of micellar electrokinetic chromatography to the quality control of pharmaceutical formulations: the analysis of xanthine derivatives. Electrophoresis. Vol. 10، 1994، 1304-1309.

12- Sripalakit P.، Saraphanchotiwitthaya A.، Validation of an HPLC method for determination of pentoxifylline in human plasma and its application to pharmacokinetic study. J. AOAC. Int. Vol. 92، 2009، 837-845.

13- Chmielewska A.، Konieczna L.، Plenis A.، Lamparczyk H.، Quantitative determination of pentoxifylline in human plasma. ACTA Chromatogr. Vol. 16، 2006، 70-79.

14- Lahsini R.، Monser L.، Optimization and validation of a new HPLC method using monolithic column for simultaneous determination of pentoxifylline and related compounds. Pharm. Chem. J. Vol. 46، 2012، 127-131.

15- Boyka G. Tsvetkova، Ivanka P. Pencheva، Plamen T. Peikov، Simultaneous determination of pentoxifylline and its impurities in tablet dosage forms by RP-HPLC. Der. Pharma. Chemica. Vol. 4، 2012، 608-612.

16- Korany M. A.، Haggag R. S.، Ragab M. A. A.، Elmallah O. A.، A validated stability indicating DAD–HPLC method for determination of pentoxifylline in presence of its pharmacopeial related substances. Bulletin of Faculty of Pharmacy، Cairo University. Vol. 51، 2013، 211–219.