Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 35, No. 1, Spring 2025 **ORIGINAL ARTICLE**

Development and validation of a HPLC-UV method of analysis for sulfasalazine in human plasma

Amir Beheshti Maal[1], Seyed Mohammad Alavi[1], Mohsen Amini[2], Hoda Jahandar[3], Farshad Hashemian[4]
[1] PharmD student Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran
[2] Full Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran
[4] Full Professor, Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

Abstract

Background: In this study, a rapid, simple, and advanced reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was developed for the quantification of sulfasalazine in human plasma.
Materials and methods: Sulfasalazine was extracted from plasma matrices using a simple protein precipitation method by acetonitrile. Chromatographic conditions were optimized (mobile phase compositon, flow rate, injection volume and temperature of the oven). The method was validated in protein precipitated human plasma for linearity, selectivity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification.
Results: The chromatographic separation was conducted on C_{18} brisa LC_2 column (250 mm × 4.6 mm, 5µ) using isocratic elusion with mobile phase consisting of the mixture of acetonitrile: 10mM Ammonium acetate pH adjusted to 4.6 (30:70 v/v) with a flow rate of 1.0 ml/min at ambient temperature. Detection was carried out by UV detector at ۳۶1 nm. Calibration curves made in the human plasma were linear in the range of 3.125-50 µg/ml with the value of $r^2 > 0.9999$. The LOD and LOQ was 0.5 and 2.5 µg/ml, repectively.
Conclusion: The developed and validated HPLC-UV method is suitable for accurately determining sulfasalazine levels in pharmacokinetic studies of new formulations.
Keywords: *Sulfasalazine, RP-HPLC, Human plasma, Method development, Validation.*

Cited as: Beheshti Maal A, Alavi SM, Amini M, Jahandar H, Hashemian F. Development and Validation of a HPLC-UV Method of Analysis for Sulfasalazine in Human Plasma. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(1): **35-43.**

Correspondence to: Mohsen Amini
Tel: *+98 09122182581*
E-mail: moamini@tums.ac.ir
ORCID ID: 0000-0003-3135-2917
Received: 7 Mar 2024; **Accepted:** 28 May 2024

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴، صفحات ۳۵ تا ۴۳

Original Article

توسعه و معتبرسازی روش HPLC-UV برای آنالیز سولفاسالازین در پلاسما انسانی

امیر بهشتی مآل[۱]، سید محمد علوی[۱]، محسن امینی[۲]، هدی جهاندار[۳]، فرشاد هاشمیان[۴]

[۱] دانشجوی دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران
[۲] استاد تمام، بخش شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] استادیار،بخش گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران
[۴] استاد تمام، بخش داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *در این مطالعه، یک روش سریع، ساده و پیشرفته بر اساس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس (RP-HPLC) برای آنالیز کمی سولفاسالازین در پلاسمای انسان توسعه داده شد.*

روش بررسی: *سولفاسالازین با استفاده از روش ساده رسوب دهی پروتئین، بوسیله استونیتریل، از پلاسما استخراج گردید. شرایط کروماتوگرافی شامل ترکیب فاز متحرک، سرعت آن، حجم تزریق و دمای آون بهینه شد. سپس روش توسعه‌یافته بر اساس خطی بودن، انتخابی بودن، صحت، دقت، حد تشخیص و حد اندازه‌گیری معتبرسازی شد.*

یافته‌ها: *جهت بررسی سولفاسالازین از ستون C_{18} Brisa LC_2 (250 mm × 4/6 mm, 5µ) استفاده شد. شستشو در حالت ایزوکراتیک با فاز متحرکی متشکل از مخلوط استونیتریل: آمونیوم استات ۱۰ میلی مولار با pH معادل ۴/۶ (۷۰:۳۰) و سرعت جریان ۱،۰ میلی لیتر در دقیقه و دمای اتاق انجام شد. شناسایی سولفاسالازین با شناساگر UV در طول موج ۳۶۱ نانومتر انجام شد. نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسمای انسانی در محدوده ۵۰-۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر با ضریب همبستگی ۰/۹۹۹۹ <r^2 خطی بود. حد تشخیص و اندازه گیری روش به ترتیب ۰/۵ و ۲/۵میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.*

نتیجه‌گیری: *می‌توان گفت که روش HPLC-UV توسعه‌یافته و تاییدشده برای تعیین دقیق سطح پلاسمایی سولفاسالازین در مطالعات فارماکوکینتیک فرمولاسیون‌های جدید مناسب است.*

واژگان کلیدی: *سولفاسالازین، RP-HPLC، پلاسمای انسانی، توسعه روش، اعتبارسنجی.*

مقدمه

سولفاسالازین پیش دارویی است که در مدیریت بیماری التهاب روده استفاده می‌شود. مزالازین که بخش فعال آن می‌باشد هم به‌عنوان یک محصول دارویی در دسترس است (۱). سولفاسالازین در آب بسیار کم‌محلول است و در اتانول به میزان ۰/۳ میلی گرم در میلی لیتر و در متانول به میزان ۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر حل می‌شود (۲).

سولفاسالازین عامل ضدالتهابی و از نظر ساختاری وابسته به سالیسیلات‌ها است و از طریق مهار تولید سیکلواکسیژناز و پروستاگلاندین سبب کاهش التهاب مخاط در کولیت اولسروز می‌شود (۱). از جمله اثرات فارماکودینامیکی سولفاسالازین در دوزهای بالینی در شرایط آزمایشگاهی، مهار انتشار سیتوکین (اینترلوکین 1-2-6-12 و فاکتور نکروز توموری-α) و تولید IgM و IgG است. مطالعات بر روی مدل‌های حیوانی بیماری‌های خود ایمنی نیز، عملکرد تنظیم کننده

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، بخش شیمی دارویی، دکتر محسن امینی (**email**: : moamini@tums.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0003-3135-2917
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۳/۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

سولفاسالازین را تایید می‌کند (۳). اگرچه مکانیسم کامل و دقیق اثر دارو به طور کامل شناخته نشده است، اما حدس زده می‌شود که ۵-آمینو سالیسیلیک اسید در برابر بیماری‌های التهابی روده مؤثر است؛ بااین‌حال، در استفاده مداوم، افزایش سطح سرمی سولفاپیریدین آزاد، منجر به ایجاد عوارض جانبی مختلف می‌شود (۴). همچنین عوارضی از قبیل دیسکرازی خون، پانکراتیت و تغییر در شکل، تعداد و تحرک اسپرم در بیماران تحت درمان با ۵-آمینو سالیسیلیک اسید و سولفاسالازین گزارش شده است.(۵, ۶) بنابراین فرمولاسیون متفاوتی برای کاهش برخی از عوارض مرتبط با ماده دارویی، با تأکید بیشتر بر تحویل هدفمند دارو، طراحی شده‌اند.

داروی سولفاسالازین علاوه بر بیماری‌های التهابی روده، در بیماری کرون و بیماری‌های آرتریت روماتوئید (۷) نیز تایید و تجویز شده است (۳, ۸, ۹). باتوجه به خواص تعدیل‌کننده ایمنی و ضدالتهابی، این دارو به طور گسترده به‌عنوان جایگزین درمانی در اختلالات پوستی مختلف مورد استفاده قرارگرفته است (۱۰, ۱۱). همچنین بعنوان داروی کمکی در مبتلایان به بیماری آرتروز ستون فقرات (Ankylosing spondylitis) و آرتریت پسوریاتیک استفاده می‌شود (۱۲, ۱۳).

سولفاسالازین، به‌صورت موضعی در روده بزرگ و تنها با مقادیر کم جذب شده و وارد جریان خون می‌شود. درحالی‌که سولفاپیریدین که مسئول عملکرد تعدیل‌کننده ایمنی و ضدالتهابی آن در برابر آرتریت روماتوئید است، به طور قابل‌توجهی از روده بزرگ جذب می‌شود (۱۴). سولفاسالازین بعد از جذب تا ۱۲ ساعت به غلظت نهایی خود در خون می‌رسد. غلظت نهایی دارو در پلاسما متناسب با سن، جنس و نژاد افراد متفاوت است.

با توجه به پتانسیل درمانی سولفاسالازین و معرفی فرمولاسیون های جدید برای درمان های مختلف، توسعه روش‌های ارزیابی غلظت پلاسمایی آن ارزشمند است. روش های مختلف کروماتوگرافی و طیف سنجی برای تخمین سولفاسالازین به تنهایی یا همراه با متابولیت های آن توسعه یافته است.(۱۵, ۱۶) در تحقیق حاضر یک روش جدید، ساده، ایمن و سریع با استفاده از HPLC، جهت تعیین مقدار سولفاسالازین در پلاسمای انسانی توسعه داده شده است. در ادامه برای اطمینان از کیفیت نتایج آنالیز، اعتبار روش نیز بررسی و تایید شده است.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

قرص سولفاسالازین مورد استفاده، از شرکت مهردارو ایران و استونیتریل و متانول مصرفی، با درجه خلوص مورد نیاز HPLC، نیز از شرکت مرک آلمان تهیه شد. آمونیوم استات با خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگما آلدریش و آب دیونیزه نیز از شرکت زلال تقطیر تهران خریداری شد. خون مورد استفاده برای انجام این آزمایشات از پرسنل و کادر آموزشی دانشکده داروسازی علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران تهیه شد. به افراد توصیه شده بود که از روز قبل، دارویی مصرف نکنند.

تجهیزات مورد استفاده

ترازوی آنالیتیکال BOSCH، پی‌اچ متر SANA، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا Shimadzu LC-10 Series، ست فیلتراسیون خلا MILLIPORE، سانتریفیوز ROTOFIX 32 A، اسپکتروفوتومتری RIGOL Ultra-3660

تهیه پلاسمای خون

به‌منظور جلوگیری از لخته شدن خون، ابتدا نمونه‌های خونی به لوله های حاوی K_2EDTA (شرکت فارتست) منتقل و به آرامی تکان داده شد. سپس خون به یک لوله سانتریفیوژ منتقل و با دور 3000g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز شفاف رویی که پلاسما می‌باشد، به داخل میکروتیوب های سترون نامگذاری شده، ریخته شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت یک ماه نگهداری شد.

تهیه فاز متحرک

جهت تهیه ۵۰۰ میلی لیتر بافر آمونیوم استات، ۰/۲۷۱۱ گرم آمونیوم استات در ۳۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. سپس ۱۵۰ میلی لیتر استونیتریل به آن اضافه و pH با استفاده از استیک اسید در محدوده ۴/۵±۰/۰۵ تنظیم شد. فاز متحرک با کاغذ پلی پروپیلنی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شده و جهت گاززدایی، به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سونیکه بدون حرارت قرار داده شد. فاز متحرک به صورت روزانه تهیه می‌شد.

رسوب‌دهی پروتئین های پلاسما و پری سمپلینگ

ابتدا نمونه‌های پلاسمایی فریز شده، داخل حمام آب ۳۲ درجه سانتی‌گراد دفریز شد. سپس معادل ۴ برابر حجم پلاسما، استونیتریل به آن اضافه شد و به مدت چهار دقیقه روی دستگاه ورتکس میکسر نگه داشته شد تا استونیتریل تا حد ممکن با پلاسمای خون مخلوط و در تماس باشد. سپس نمونه با دور ۳۲۰۰g و به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول شفاف

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

رویی جدا شده، با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد. حاصل به میکروتیوب ۱/۵ نامگذاری شده، منتقل شد.

تهیه محلول‌های استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون

برای تهیه محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر سولفاسالازین، ۱۰ میلی گرم از نمونه سولفاسالازین استاندارد در ۱۰۰ میلی لیتر متانول حل شد. این محلول بعنوان ذخیره اصلی برای تهیه محلول‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتراستفاده شد. جهت رقیق سازی محلول ذخیره اصلی، از بافر فاز متحرک استفاده گردید. استانداردها بصورت روزانه تهیه می‌شدند.

توسعه روش آنالیز

ابتدا با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری، λ_{max} سولفاسالازین تعیین شد. سپس شرایط انجام آنالیز مانند ترکیب فاز متحرک، دمای آون، سرعت فاز متحرک و... بهینه‌سازی شد. پس از انتخاب شرایط مناسب، فاز متحرک به دستگاه HPLC، تزریق شد تا بیس لاین و تداخل احتمالی بلانک با دارو در λ_{max} مورد بررسی قرار گیرد.

رسم نمودار کالیبراسیون محلول سولفاسالازین

قبل از بررسی دارو با پلاسما، جهت اطمینان اولیه از درستی روش موردنظر، نمودار کالیبراسیون داروی سولفاسالازین محلول در متانول و بافر رسم شد. بدین منظور پنج غلظت متفاوت در بازه ۶/۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر انتخاب و سه بار تزریق شد.

رسم نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین

جهت رسم نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسما، پنج غلظت مختلف از دارو (۳/۱۲۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) که در محدوده عملیاتی است، انتخاب و هر کدام سه بار تزریق و نتایج بررسی شد.

معتبرسازی روش آنالیز

برای سنجش اعتبار روش آنالیز، مطابق طبق دستورالعمل ICHQ2(R2)، پارامترهای انتخابی بودن، نمودار کالیبراسیون، دامنه، خطی‌بودن، دقت، صحت، حد تشخیص و حد کمی بررسی شد.

بررسی انتخابی بودن دارو

در این تحقیق، انتخابی بودن روش، با حصول نتیجه مثبت از نمونه حاوی دارو و نتیجه منفی از نمونه فاقد داروی مورد نظر در یک ماتریکس (فاز متحرک یا پلاسما)، ثابت شد.

محدوده عملیاتی آزمایش

طبق دستورالعمل ICHQ2، باید در محدوده غلظت‌های کاری، بین غلظت آنالیت و سطح زیر کروماتوگرام، رابطه خطی برقرار و اثبات شده باشد تا مناسب‌بودن روش موردنظر تأیید شود. در ابتدا، خطی‌بودن را می‌توان با نموداری از سیگنال‌ها به‌عنوان تابعی از غلظت آنالیت، ارزیابی کرد. نتایج آزمون باید با روش‌های آماری مناسب بررسی شود. برای این منظور، استفاده از حداقل ۵ غلظت آنالیت الزامی است.

تعیین میزان حد تشخیص و حد کمی

راه‌های مختلفی جهت تشخیص حدود تشخیص و اندازه‌گیری وجود دارد؛ ازجمله بر اساس تعیین نسبت سیگنال به نویز، انحراف معیار و شیب خط معادله منتج شده از نمودار کالیبراسیون و یا اثبات صحت و دقت در غلظت‌های پایینتر. در این تحقیق از دو روش نسبت سیگنال به نویز و انحراف معیار و شیب خط معادله نمودار کالیبراسیون، جهت اندازه‌گیری حد تشخیص و حد اندازه‌گیری استفاده شد.

برای تعیین نسبت سیگنال به نویز، باید سیگنال های اندازه‌گیری شده نمونه‌ها با غلظت پایین را با سیگنال های نمونه‌های فاقد دارو مقایسه کرد. به طور کلی، غلظتی که در آن نسبت سیگنال به نویز ۱:۳ باشد برای حد تشخیص و غلظتی که نسبت ۱:۱۰ ایجاد کند برای حد اندازه‌گیری، قابل قبول می‌باشد.

برای بدست آوردن حد تشخیص و اندازه گیری براساس انحراف معیار و شیب خط حاصل از معادله نمودار کالیبراسیون، از فرمول های زیر استفاده می‌شود:

حد تشخیص= $\frac{3.3\sigma}{S}$ و حد کمی= $\frac{10\sigma}{S}$

که در آن σ انحراف معیار استاندارد و S شیب خط نمودار کالیبراسیون است.

بررسی دقت

دقت باید در محدوده کاری یک روش آنالیز بررسی شود و معمولاً از طریق مقایسه تکرارپذیری نتایج حاصل، اثبات می‌شود. دقت روش باید تحت شرایط آزمون ارزیابی شود (به عنوان مثال، در حضور ماتریکس نمونه و با استفاده از مراحل آماده‌سازی توصیف شده برای نمونه).

طبق دستورالعمل پیشنهادی دستورالعمل ICHQ2R2، سه نمونه شامل غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۴۵ میکروگرم در میلی لیتر تهیه و هر غلظت سه بار دریک روز تزریق شد. پس از بررسی، پارامترهای آماری مثل انحراف معیار (SD) یا انحراف معیار نسبی (RSD) محاسبه می‌شود. RSD کمتر از ۱۰ درصد بین تکرارهای هر غلظت، دقت روش را تایید می‌کند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

بررسی صحت

صحت یک روش آنالیز، نزدیکی نتایج به‌دست آمده با مقدار واقعی را بررسی می کند. برای بررسی صحت روش، سه غلظت ۵، ۱۵ و ۴۵ میکروگرم در میلی لیتر از دارو در پلاسما تهیه و هر غلظت سه بار تزریق شد. در ادامه درصد نزدیکی میانگین نتایج بدست آمده برای هر غلظت با مقدار نظری، که از طریق معادله منحنی کالیبراسیون بدست آمده، محاسبه می‌شود. درصد خطا تا ۲۰٪ قابل قبول است.

یافته‌ها

طراحی روش آنالیز

بررسی‌های اولیه در این تحقیق نشان می‌دهد که داروی سولفاسالازین درآب بسیار کم‌محلول است، ولی در متانول نسبتا محلول است. جداسازی در روش کروماتوگرافی بر مبنای خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنالیت مانند ماهیت، انحلال‌پذیری، قطبیت و وزن مولکولی آن انجام می‌شود. سولفاسالازین یک مولکول قطبی است؛ به همین دلیل سیستم فاز معکوس (RP-HPLC) برای این تحقیق در نظر گرفته شد. با توجه به تجربیات گذشته، ستون C_{18} برای این آزمایش انتخاب گردید. همچنین جهت جداسازی بهتر، تنظیم زمان مناسب آشکار شدن دارو و شکل نهایی پیک، از ستونی با ابعاد ۲۵۰ میلی متر و قطر 4/6 میلی متر با اندازه ذره ای ۵ میکرومتر استفاده شد. در مرحله بعدی جهت تعیین λ_{max} سولفاسالازین از اسپکتروفوتومتری استفاده شد. نتایج نشان دادند که داروی محلول در متانول بیشترین جذب را در ۳۵۹ نانومتر دارد.

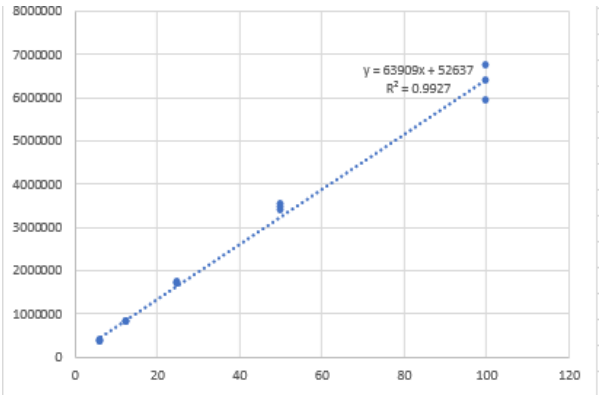
جهت بهبود کارایی روش، ابتدا فاز متحرک بهینه شد. با توجه به ساختار شیمیایی داروی سولفاسالازین و وجود سه pKa متفاوت (1/8-7/5-2/35)، باید از یک نمک آلی جهت تهیه بافر بهره برد تا از تغییرات pH احتمالی جلوگیری کند. همچنین با توجه به اینکه نمونه پلاسما نیز در کنار این دارو حضور دارد و معمولا طی ۵ دقیقه اول پیک پروتئین‌های باقیمانده آن مشاهده می‌شود؛ بهتر است زمان آشکار شدن پیک دارو بعد از ۵ دقیقه باشد تا احتمال تداخل پیکها کاهش یابد. انجام این مهم با تنظیم اسیدیته و درصد حجمی استونیتریل موجود در فاز متحرک امکان پذیر است.

در توسعه روش‌های آنالیز جدید، ترجیحا از بافرهای فسفات استفاده می‌شود؛ زیرا در طول موج زیر ۲۲۰ نانومتر آشکارشده، در رنج‌های مختلفی از pH کاربرد دارد و بیس لاین بسیار پایینی ارایه میکند. در این تحقیق، بافر فسفات که با فسفریک اسید به pH مورد نظر رسیده و بافر آمونیوم استات که با استیک اسید تنظیم pH شد، مقایسه بررسی گردید. با توجه به نتایج حاصل، گزینه دوم انتخاب شد.

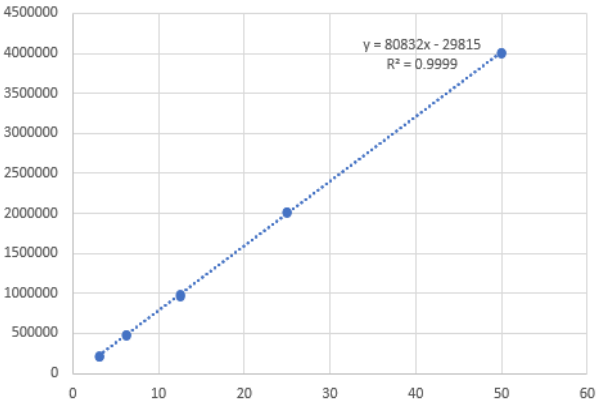
برای به دست آوردن بهترین پیک ممکن، از نظر شکل و تایم آشکار شدن و جداسازی، نسبت‌های مختلفی از بافر و استونیتریل بررسی گردید و در نهایت بافر آمونیوم استات با غلظت ۱۰ میلی مولار و استونیتریل با نسبت ۳۰:۷۰ انتخاب شد. مجددا λ_{max} نمونه‌ها در حضور بافر آمونیوم استات، بررسی شد و حداکثر جذب در ۳۶۱ نانومتر مشاهده گردید. حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر بود.

رسم نمودار کالیبراسیون محلول سولفاسالازین

همانطور که در بخش قبل گفته شد ابتدا نمودار کالیبراسیون داروی سولفاسالازین در متانول و بافر رسم شد. این نمودار از سه بار تزریق پنج غلظت متفاوت در محدوده ۶/۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر حاصل شد. نتایج در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در متانول و بافر



شکل ۲. نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

جدول ۱. نتایج حاصل از تزریق نمونه برای رسم نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در متانول و بافر

Retention time	Concentration(ppm)	Area	AVG	SD	RSD(%)
7/772	6/25	329344			
7/753	6/25	377358	354313	24064	6/79
7/731	6/25	356238			
7/693	12/5	813591			
7/68	12/5	799574	806416	7014	0/87
7/653	12/5	806084			
7/641	25	1688321			
7/606	25	1710830	1693936	14902	0/88
7/613	25	1682657			
7/579	50	3445155			
7/571	50	3380364	3444928	64450	1/87
7/579	50	3509265			
7/522	100	6386404			
7/518	100	6727905	6345984	403650	6/36
7/487	100	5923645			

جدول ۲. نتایج حاصل از تزریق نمونه برای رسم نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین

Retention time	Concentration(ppm)	Area	AVG	SD	RSD(%)
7/82	3/125	207217			
7/776	3/125	213177	211428	3664	1/73
7/731	3/125	213891			
7/776	6/25	465524			
7/69	6/25	485601	479376	12017	2/51
7/753	6/25	487004			
7/745	12/5	963380			
7/7	12/5	975645	977646	15365	1/57
7/689	12/5	993915			
7/692	25	2009626			
7/682	25	2003419	2009681	6289	0/313
7/694	25	2015998			
7/768	50	3986983			
7/778	50	4007110	4003359	14860	0/371
7/799	50	4015986			

رسم نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین

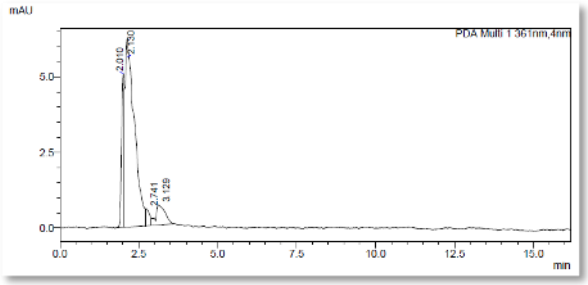
جهت رسم نمودار کالیبراسیون سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین فیلترشده، پنج غلظت مختلف از دارو در محدوده ۳/۱۲۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر سه بار تزریق و نتایج بررسی شد (شکل ۲ و جدول ۲).

بررسی انتخابی بودن روش

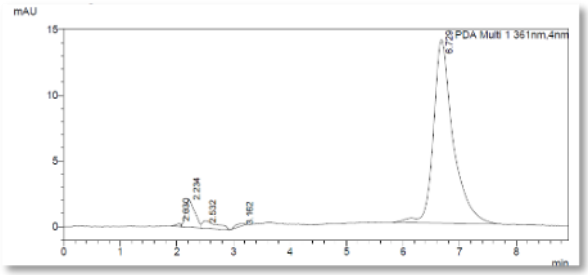
دو نمونه کاملا مشابه شامل ترکیب حلال دارو، بافر آمونیوم استات و پلاسمای انسانی، تهیه شد و به یکی از آنها مقدار

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

۱۰ میلی گرم سولفاسالازین اضافه شد. هر دو نمونه تزریق شدند. با توجه به حضور پیک دارو در نمونه مثبت و عدم حضور آن در نمونه منفی، طبق شکل‌های ۳ و ۴، انتخابی بودن روش جهت شناسایی دارو در نمونه اثبات شد.



شکل ۳. کروماتوگرام حاصل از تزریق ترکیب حلال دارو، بافر آمونیوم استات و پلاسمای انسانی بدون داروی سولفاسالازین



شکل ۴. کروماتوگرام حاصل از تزریق ترکیب حلال دارو، بافر آمونیوم استات و پلاسمای انسانی و داروی سولفاسالازین. پیک ظاهر شده در زمان حدود۷ دقیقه مربوط به سولفاسالازین است.

محدوده عملیاتی آزمایش

محلول‌هایی با غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از داروی سولفاسالازین در ماتریکس پلاسما، جهت رسم منحنی کالیبراسیون تهیه شده و با روش ذکر شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده آنالیز رگرسیون خطی، نشان داده شد که در این محدوده بین غلظت آنالیت و سطح زیر نمودار رابطه خطی برقرار بود (r^2=۰/۹۹۹).

تعیین میزان حد تشخیص و حد کمی

با توجه به فرمول ذکر شده، برای حد تشخیص، غلظت ۰/۶۲۳۱ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. برای بررسی عملی نتیجه حاصل، در آزمایشگاه محلول ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین تهیه و ۳ بار تزریق شد. نتایج تکرارپذیری خوبی داشتند (RSD داده-های حاصل ۷/۶۹ درصد بود) و نسبت سیگنال به نویز حدود سه بود. همین مراحل با غلظت ۰/۲۵ و ۰/۴ میکروگرم در میلی لیتر هم تکرار شد، ولی پیک مشاهده نشد و یا تکرارپذیری مناسب نبود. طبق معادله، حد تشخیص حدود ۰/۶ میکروگرم در میلی لیتر پیش‌بینی شد و به طور عملی غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر تایید شد.

حد کمی با توجه به فرمول، غلظت ۲/۱۷۷ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. در آزمایشگاه غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین آماده شد و برای اطمینان از تکرارپذیری، ۳ بار تزریق شد. RSD داده‌های حاصل ۲/۶۳ درصد بود. بنابراین مقدار حد کمی غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر در نظر گرفته شد.

بررسی دقت در یک روز

به منظور بررسی دقت، محلول سولفاسالازین در پلاسمای فاقد پروتئین با سه غلظت ۵، ۱۵ و ۴۵ میکروگرم در میلی لیتر تهیه و هر غلظت ۳ بار تزریق شد. درنهایت RSD محاسبه شده، کمتر از ۱۰ درصد بود.

بررسی دقت بین روزها

دقت بینابینی یا دقت بین روزها برای بیان دقت در یک آزمایشگاه در روزهای مختلف یا دستگاه‌ها و شرایط مختلف استفاده می‌شود. در این تحقیق، غلظت‌هایی که جهت بررسی دقت انتخاب شده بودند مجددا تهیه و در روز دیگری تزریق شد و نتایج بررسی شد. با توجه به نتایج، RSD محاسبه و کمتر از ۱۰ درصد بود.

بررسی صحت

سه غلظت ۵، ۱۵ و ۴۵ میکروگرم در میلی لیتر هرکدام سه مرتبه تزریق شد. در ادامه درصد نزدیکی میانگین نتایج بدست آمده برای هر غلظت با نظری، که از طریق معادله منحنی کالیبراسیون بدست آمده، محاسبه شد. درصد خطا تا ۲۰٪ قابل‌قبول است. نتایج بدست آمده در بررسی صحت و دقت روش در جدول ۳ ارائه شده است.

تست استحکام روش در برابر تغییرات

تست استحکام روش، بررسی می‌کند که روش طراحی شده در برابر تغییرات عمدی یا سهوی که در حین آزمایش صورت می‌گیرد به چه میزان مقاوم است و می‌تواند همچنان نتایج مورد نظر و قابل اطمینان را گزارش کند. در این ارزیابی، تغییرات دما، اپراتور، میزان تزریق و همچنین ستون انجام شد و همچنان نتایج روش مورد نظر قابل اطمینان بود.

بحث

همان طور که به تفصیل گفته شد، داروی سولفاسالازین، در درمان بسیاری از بیماری‌ها در خط اول یا دوم درمان، کاربرد

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

دارد. به همین دلیل پایش سطح دارو در پلاسما، خصوصا در شرایطی که شرکت‌های داروسازی برای تهیه فرمولاسیون جدید این دارو و ورود آن به بازار اقدام می‌کنند، همچنین برای تولید داروهای ژنریک و انجام مطالعات هم ارزی زیستی، اهمیت زیادی دارد. بنابراین یافتن یک روش آنالیز معتبر، ضروری بنظر می‌رسد. به همین دلیل، در این تحقیق روشی بر پایه HPLC جهت پایش داروی سولفاسالازین در پلاسما توسعه یافت و پارامترهای اعتبار سنجی شامل انتخابی بودن، دامنه، خطی بودن، دقت، صحت، حد تشخیص، حد اندازه گیری براساس دستورالعمل ICH، مورد بررسی قرار گرفت. در این روش، از شستشوی ایزوکراتیک بهره گرفته شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی لیتر در دقیقه و آشکارساز UV در طول موج ۳۶۱ نانومتر تنظیم شد. جداسازی با استفاده از ستون C18 به طول ۲۵ سانتی متر، قطر ۴/۶ میلی متر و اندازه ذرهای ۵ میکرون و با فاز متحرک شامل ترکیب بافر آبی آمونیوم استات ۱۰ میلی مولار و استونیتریل با درصد حجمی ۷۰:۳۰ انجام شد. حجم تزریق (حجم لوپ)، ۲۰ میکرولیتر بود. آنالیز در دمای اتاق انجام شد. زمان هر تزریق ۱۲ دقیقه بود.

جهت ارزیابی صحت و دقت، سه غلظت پایین و متوسط و بالا در محدوده‌ی دامنه‌ی نمودار کالیبراسیون، انتخاب شد. خطای نسبی و انحراف استاندارد داده‌ها محاسبه شد. همین غلظت‌ها در روز دیگری هم برای بررسی دقت بین روزها تزریق شدند و خطای نسبی بین ۰/۴ تا ۶ درصد بود. بر اساس نتایج نمودار کالیبراسیون، حداقل غلظت قابل تشخیص (LOD) ۰/۶۲۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری (LOQ) ۲/۱۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. پس از آزمایشات متوالی بر روی غلظت‌های گوناگون سولفاسالازین در پلاسما، حداقل غلظت قابل تشخیص به صورت عملی معادل ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. همچنین دراین غلظت‌ها به ترتیب نسبت سه برابر و ۱۰ برابر سیگنال به نویز دیده شد. با توجه به تمام نکات گفته شده، روش آنالیز توسعه یافته در این مقاله، برای تعیین مقدار سولفاسالازین در پلاسمای انسانی، روشی تکرارپذیر، با صحت بالا و در مقایسه با روشهای پیشنهادی دیگر مقرون به صرفه است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم فرشته مظاهری کارشناس مرکز تحقیقات علوم دارویی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

1. Abdelrahman MM, Habib NM, Emam AA, Mahmoud HM, Abdelwhab NS. Chromatographic determination of sulfasalazine and its active metabolites: greenness assessment and application to spiked human plasma. Biomed Chromatograph 2020;34:e4804.
2. Clarysse S, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Augustijns P. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: comparison with solubility in human intestinal fluids. Eur J Pharmaceutic Sci 2011;43:260-9.
3. Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine. Drugs 2005;65:1825-49.
4. Collins J. Adverse reactions to salicylazosulfapyridine (azulfidine) in the treatment of ulcerative colitis. Southern Med J 1968;61:354-8.
5. Ransford R, Langman M. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. Gut 2002;51:536-9.
6. Mouyis M, Flint JD, Giles IP, editors. Safety of anti-rheumatic drugs in men trying to conceive: A systematic review and analysis of published evidence. Semin Arthritis Rheum 2019;48:911-920.
7. Villa-Hermosilla M-C, Fernández-Carballido A, Hurtado C, Barcia E, Montejo C, Alonso M, et al. Sulfasalazine microparticles targeting macrophages for the treatment of inflammatory diseases affecting the synovial cavity. Pharmaceutics 2021;13:951.
8. Smedegård G, Björk J. Sulphasalazine: mechanism of action in rheumatoid arthritis. Rheumatology 1995;34:S7-15.
9. Rains CP, Noble S, Faulds D. Sulfasalazine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis. Drugs 1995;50:137-56.
10. Mushtaq S, Sarkar R. Sulfasalazine in dermatology: a lesser explored drug with broad therapeutic potential. Int J Women Dermatol 2020;6:191-8.
11. Bakar Ö, Gurbuz O. Is there a role for sulfasalazine in the treatment of alopecia areata? J Am Acad Dermatol 2007;57:703-6.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]

12. Braun J, Zochling J, Baraliakos X, Alten R, Burmester G, Grasedyck K, et al. Efficacy of sulfasalazine in patients with inflammatory back pain due to undifferentiated spondyloarthritis and early ankylosing spondylitis: a multicentre randomised controlled trial. Ann Rheum Dis 2006;65:1147-53.

13. Ward MM, Deodhar A, Gensler LS, Dubreuil M, Yu D, Khan MA, et al. 2019 Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. Arthritis Rheumatol 2019;71:1599-1613.

14. O'Morain C. Sulfasalazine: side effects. Dig Dis Sci 1984;29:782.

15. Reddy PA, Sahu AK, Sharma MK, Sengupta P. Development and Validation of a Simultaneous Bioanalytical Method for Methotrexate, Sulfasalazine and Hydroxychloroquine in Rat Plasma following Single Step Protein Precipitation Technique. IIndian Journal of Pharmaceutical Education and Research 2020;54:S358-67.

16. Dogra A, Sharma A, Kumar Mandal U, Kotwal P, Bhatt S, Nandi U. Liquid chromatography based methods for analysis of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) in biological matrices. Crit Rev Anal Chemistry 2019;49:224-42.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-03-19]