مقاله تحقیقی

اندازه گیری و معتبرسازی هیدروکینون در فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون

رابعه خوشنویس زاده

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir, biologybiophysics@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۰

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۱- بهار ۱۳۹۶

چکیده

روشی جهت اندازه گیری مقدار هیدروکینون در فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون بیان شده است که از حل کردن هر نمونه در متانول و اندازه گیری شدت جذب آنها در طول موج ۲۹۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری بدست آمده است. در این مطالعه معیارهای معتبرسازی شامل میزان خطی بودن، صحت، دقت، انتخابی بودن، حساسیت حد تشخیصی و حساسیت حد تعیین مقدار ارزیابی شد. نمودار کالیبراسیون برای دامنه غلظتی ۱ تا۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیدروکینون با ضریب همبستگی ۰.۹۹۹۸ رسم شد. این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون لیپوزومی تهیه شده از فسفولیپید (۷,۸٪)، کلسترول (۱,۵٪)، آلفا کتوفرول (۰,۱۷٪) و هیدروکینون (۰,۵٪) (وزنی بر حجمی) که ۵۰۰ بار با متانول رقیق شد هیچ جذبی در ۲۹۳ نانومتر نداشته و غلظت هیدروکینون با این میزان رقیق سازی به ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر تقلیل یافت. پارامترهای معتبرسازی بر اساس پروتکل ICH Q2B انجام شد به این ترتیب که درصد قابلیت تولید مجدد(recovery) ۰.۸ ± ۱۰۲ ، ۰.۲ ± ۹۹ و ۰.۴ ± ۹۸ درصد به ترتیب برای ۸۰٪ ، ۱۰۰٪ و ۱۲۰٪ غلظت هیدروکینون بدست آمد. انحراف معیار استاندارد پارامتر دقت (precision) برای اندازه گیری های درون یک روز (intraday) و بین روزها (interday)کمتر از ۲٪ بود. حد تشخیصی (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل شد.

واژگان کلیدی: هیدروکینون ، لیپوزوم، اسپکتروفتومتری، معتبرسازی

مقدمه

هیدروکینون کریستالی با جرم مولکولی ۱۱۰ دالتون بوده که بسیار محلول در آب ودارای ضریب تقسیم اکتانول/ آب ۰.۵۹ است. در بیماری های هایپرپیگمانتاسیون از هیدروکینون که می تواند آنزیم تایروزیناز را در ساخت ملانین مهار کرده و متعاقبا موجب دپیگمانتاسیون پوست شود استفاده می گردد (۱). مشکل داروهای موضعی پوستی، عبور از لایه استراتئوم کورنئوم پوست است تا به اعماق پوست نفوذ کند (۲) برای مرتفع کردن این مشکل از سامانه های دارورسان که توانایی نفوذ به اعماق پوست را دارند استفاده می شود(۳) از میان این سامانه ها، لیپوزوم ها بدلیل زیست سازگاری یکی از انتخاب های فرمولاسیون های پوستی هستند بطوریکه فرمولاسیون های لیپوزومی متعددی مثل آمفوتریسین(۴)، کلاریترومایسین (۵)، سافرانال (۶) و اکتیل متوکسی سیانات(۷) تهیه و گزارش شده است.

تا بحال فرمولاسیون های ژلی، لوسیون، محلول و کرمی هیدروکینون تهیه شده است که مقدار هیدروکینون درون آنها توسط تکنیک های مختلفی مثل

اسپکتروفتومتری، کروماتوگرافی با راندمان بالا (HPLC)، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی الکتروسینتیک میسلی (MEKC) و الکتروکروماتوگرافی مویینه (CEC) اندازه گیری شده است (۱۴-۸)، اما گزارشی از لیوزوم هیدروکینون وجود نداشته که این تحقیق به اندازه گیری مقدار هیدروکینون در ماتریکس لیپوزومی با کمک تکنینک UV اسپکتروفتومتری پرداخته و پارامترهای معتبرسازی را گزارش کرده است.

مواد و روش ها

فسفولیپید S100 (فسفاتیدیل کولین) از شرکت لیپوییید، کلسترول، متابی سولفید سدیم، منوسدیم دی هیدروژن فسفات و کلروفرم (گرید آزمایشگاهی) از شرکت مرک و آلفاکتوفرول استات از اپلیکم و متانول از شیمی پارس خریداری شد.

تجهیزات

از دستگاه uv اسپکتروفتومتری دو پرتویی Cecill9500 برای اندازه گیری مقدار هیدروکینون استفاده شد. در تهیه لیپوزوم از روتاری تبخیرکننده BUSCHI مدل R-210 جهت حذف حلال آلی و از دستگاه هموژنایزر IKA T10 برای هم اندازه کردن ذرات لیپوزومی استفاده شد. همه اندازه گیری وزن مواد بوسیله ترازوی شیمادزو با دقت ۰,۱ میلی گرم صورت گرفت.

تهیه لیپوزوم هیدروکینون

پس از حل کردن فسفولیپید S100 (۷,۸٪)، کلسترول (۱,۵٪)، آلفاکتوفرول (۰,۱۷٪) و هیدروکینون (۰,۵٪) (وزنی بر حجمی) در ۱۵ میلی لیتر مخلوط متانول و کلروفرم در بالون ۲۵۰ میلی لیتری از روتاری جهت حذف حلال و تهیه فیلم خشک فسفولیپیدی استفاده شد. ۱۰ میلی لیتر بافر مونوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰/۰۱ مولار و ۶ pH حاوی متابی سولفیدسدیم ۰/۱ ٪ کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه و با دست تکان داده شد. سپس ورتکس کرده و در نهایت ۵ دقیقه هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه جهت شکل گیری ساختارهای لیپوزومی و یکدست کردن آنها استفاده شد.

تهیه لیپوزوم بدون هیدروکینون

پس از حل کردن فسفولیپید S100 (۷,۸٪)، کلسترول (۱,۵٪) و آلفاکتوفرول (۰,۱۷٪) (وزنی بر حجمی) در ۱۵ میلی لیتر مخلوط متانول و کلروفرم در بالون ۲۵۰ میلی لیتری از روتاری جهت حذف حلال و تهیه فیلم خشک فسفولیپیدی استفاده شد. ۱۰ میلی لیتر بافر منوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰/۰۱ مولار و ۶ pH حاوی متابی سولفید سدیم ۰/۱٪ کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه شده و با دست تکان داده شده سپس ورتکس گشته و در نهایت ۵ دقیقه هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه جهت شکل گیری ساختارهای لیپوزومی و یکدست کردن آنها استفاده شد.

آماده سازی محلول های استاندارد هیدروکینون

برای رسم منحنی استاندارد، ۵۰۰ میلی گرم هیدروکینون به فلاسک حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل و با آب به حجم رسیده و حل شد. ۲ میلی لیتر از این ظرف به یک فلاسک حجمی ۱۰۰ میلی لیتری دیگر منتقل شده و با متانول به حجم رسید که به این ترتیب محلول استوک فراهم شد. برای تهیه محلول های ۱، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استوک به ترتیب ۱، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی لیتر برداشته و در ظروف فلاسک حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شده و با متانول به حجم رسید . از هر غلظت ۳ نمونه روزانه تهیه شد.

برای بررسی پارامتر دقت، ۵۰۰ میلی گرم هیدروکینون به فلاسک حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شده و با آب مقطر به حجم رسید. از این ظرف ۱ میلی لیتر به فلاسک ۵۰ میلی لیتری منتقل و با متانول رقیق شد سپس ۱۰ میلی لیتر از آن به یک فلاسک ۱۰۰ میلی لیتری حجمی انتقال داده شده و با متانول به حجم رسید تا غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد که ۳ نمونه از این غلظت در هر بار مطالعه تهیه شد.

تهیه نمونه های لیپوزومی حل شده در متانول

حجمی از نمونه لیپوزومی هیدروکینون که حاوی ۵ میلی گرم هیدروکینون بود به یک فلاسک حجمی ۵۰ میلی لیتری منتقل شد و با متانول به حجم رسید به این ترتیب محلولی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیدروکینون

بدست آمد. مقداری از این محلول با متانول رقیق تر شده تا در نهایت غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیدروکینون فراهم شد.

روش معتبرسازی

از پروتکل های ارائه شده توسط کنفرانس بین المللی هماهنگ سازی (۱۶) و راهنمای بین المللی AOAC (۱۷) برای معتبرسازی استفاده شد که پارامترهای آن در ادامه آمده است. مطالعه خطی بودن رابطه غلظت و شدت جذب (Linearity) نمودار کالیبراسیون از بررسی شدت جذب ۸ غلظت مختلف نمونه های استاندارد هیدروکینون (۱ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بدست آمد که کوچکترین مربع رگرسیون حاصل از ۳ اندازه گیری، جهت ارزیابی میزان خطی بودن مورد استفاده قرار گرفت.

دقت (Precision)

محاسبه دقت به وسیله معیار تکرارپذیری پاسخ ها در یک روز و سه روز محاسبه شد. برای این منظور شدت جذب ۶ نمونه استاندارد هیدروکینون با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر در یک روز و سه نمونه در سه روز متوالی اندازه گیری شد و درصد انحراف معیار استاندارد هر جذب اندازه گیری شد.

صحت (Accuracy)

با استفاده از میزان بازیافت محاسبه شد. بدین منظور حجمی از نمونه لیپوزومی هیدروکینون را که حاوی ۵ میلی گرم هیدروکینون بود به فلاسک حجمی ۵۰ میلی لیتری منتقل کرده و با متانول به حجم رسانیده تا محلول ۱۰۰ میکروگرمی از هیدروکینون تهیه شود. آنگاه حجم معینی از این محلول را در سه ظرف حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و مقادیر ۳، ۵ و ۷ میلی لیتر از نمونه استوک (که در تهیه نمونه های استاندارد هیدروکینون ساخته شد) را به ظروف مذکور اضافه کرده و با متانول به حجم رسانید تا در نهایت محلول هایی با غلظت های ۸، ۱۰ و ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر از هیدروکینون فراهم شد و هر نمونه سه بار تهیه و شدت جذب آن اندازه گیری شد.

ویژه بودن روش (Specificity)

جهت ارزیابی این پارامتر نمونه هایی تهیه شد حاوی همه مواد موجود در لیپوزوم بوده اما ف هیدروکینون بودند تا تداخل جذب ماتریکس لیپوزومی ناحیه ای که هیدروکینون بیشترین جذب را دارد مع شود بدین منظور نمونه لیپوزوم بدون هیدروکین (placebo) ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ برابر توسط متانول رقیق اسپکتروم هر یک از آنها بررسی شد.

حساسیت، حد تشخیص(LOD) و حد تعیین مقا (LOQ)

کمترین غلظتی از داروی مورد نظر که در ماتریکس معین قابل تشخیص بوده اما به دقت قابل اند گیری نیست حد تشخیص روش نامیده می شود و کمتر غلظتی که با دقت و صحت می توان اندازه گیری کرد تعیین مقدار روش است. برای تعیین این دو پارامتر از نس سیگنال به نویز استفاده شد . نسبت ۱ به ۳ برای OD ۱ به ۱۰ برای LOQ بکار گرفته شد (۱۸). مقدار سیگ از شیب خط نمودار کایبراسیون و نویز از انحراف معیار با اندازه گیری های بلانک بدست آمد.

نتایج

مقدار خطی بودن (Linearity)

پس از اندازه گیری اسپکتروم (شکل ۱) نمونه ه استاندارد هیدروکینون در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، نمودار کالیبراسیون بر اسا شدت جذب نمونه ها در بیشترین طول موج جذ هیدروکینون ،۲۹۳ نانومتر، رسم شده (نمودار ۱) و معا شدت جذب و ضریب همبستگی آن محاسبه شد که بر با ۰/۹۹۹۸ بود.

دقت (Precision)

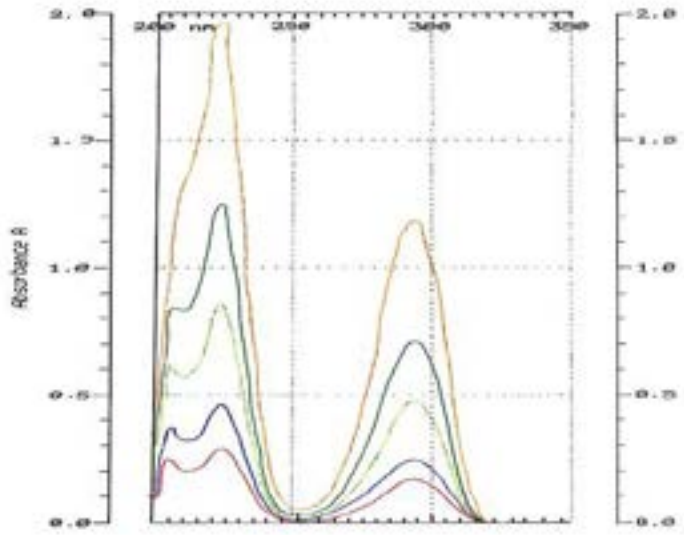
پس از ۶ بار اندازه گیری شدت جذب نمونه ها در یک مقدار انحراف معیار استاندارد ۰.۹ و در چند روز ۱.۵ بدس آمد.

صحت (Accuracy)

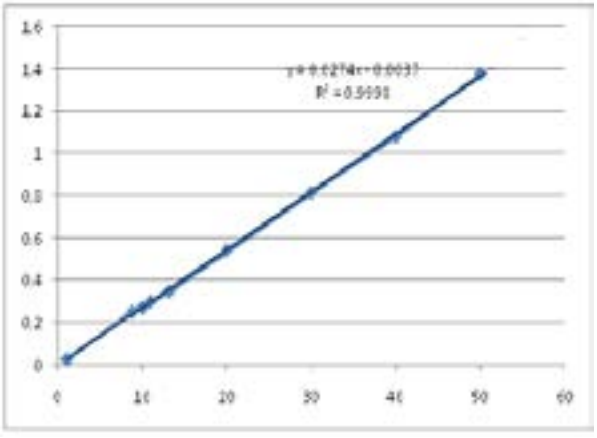
درصد قابلیت تولید مجدد(recovery) ۰.۸± ۱۰۲ ، ۰.۲ ±۹۹ و ۰.۴±۹۸ درصد به ترتیب برای ۸۰٪ ، ۱۰۰٪ و ۱۲۰٪ غلظت هیدروکینون بود.

ویژه بودن(Specificity)

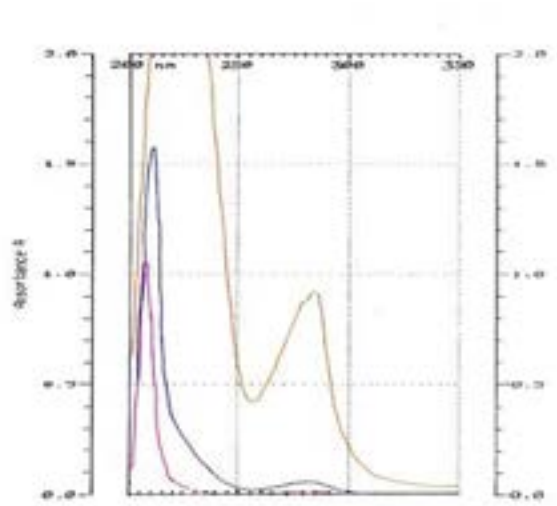
اسپکتروم رقت های ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ از لیپوزوم های های هیدروکینون بدست آمد که در شکل ۲ مشاهده می شود. با روی هم قرار دادن دو اسپکتروم نمونه لیپوزومی فاقد هیدروکینون و نمونه استاندارد هیدروکینون در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر معلوم شد در ناحیه ۲۹۳ نانومتر تداخل جذبی مشاهده نمی شود (شکل۳). برای اطمینان اسپکتروم لیپوزوم هیدروکینونی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر و نمونه استاندارد هیدروکینون در همین غلظت نیز بدست امد (شکل ۴).



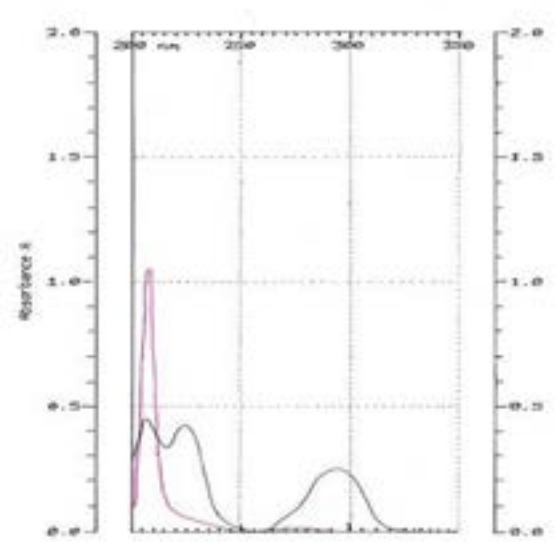
شکل ۱ - اسپکتروم نمونه های استاندارد هیدروکینون در غلظت های ۱۰، ۱۲، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر.



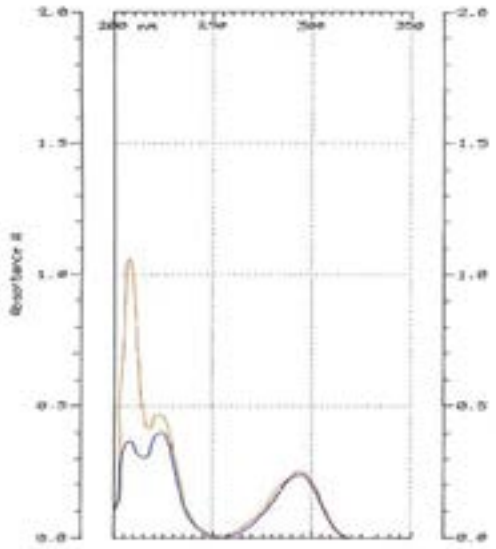
نمودار ۱: نمودار کالیبراسیون نمونه های استاندارد هیدروکینون در غلظت های ۱، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر.



شکل ۲ - اسپکتروم نمونه های لیپوزومی فاقد هیدروکینون که ۱۰ برابر (رنگ نارنجی)، ۱۰۰ برابر (رنگ آبی) و ۵۰۰ برابر (رنگ صورتی) با متانول رقیق شده اند.



شکل ۳ - روی هم قرار دادن اسپکتروم لیپوزوم فاقد هیدروکینون ۵۰۰ بار رقیق شده (رنگ صورتی) و محلول هیدروکینون استاندارد در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر (رنگ آبی)



شکل ۴ - روی هم قرار دادن اسپکتروم لیپوزوم هیدروکینون با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر (رنگ نارنجی) و اسپکتروم نمونه استاندارد هیدروکینون با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر.

حساسیت، حد تشخیص(LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ)

مقدار LOD و LOQ به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد.

بحث

در مطالعه ای که گارسیا و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند دامنه غلظتی ۶ تا ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر هیدروکینون ارزیابی شد (۱۹) و اوودین و همکارانش غلظت های کمتر از ۲ میکروگرم را مطالعه کردند (۲۰). این مطالعه وسعت زیادی از غلظت هیدروکینون را (۱ تا ۵۰ میکروگرم) را با صحت و دقت مناسب جهت اندازه گیری مقدار هیدروکینون بیان کرده است. همچنین، ضریب همبستگی نمودار کالیبراسیون بالا بوده که نشان دهنده رابطه خطی مناسب بین غلظت و شدت جذب هیدروکینون در ۲۹۳ نانومتر است. طبق پروتکل ICH Q2B تکرارپذیری اندازه گیری اگر در حدی باشد که انحراف معیار استاندارد کمتر از ۲ درصد باشد، روش بکار رفته از دقت مناسبی برخوردار است. در این مطالعه تکرارپذیری پاسخ ها به حدی بهم نزدیک بود که انحراف معیار استاندارد حاصل از اندازه گیری ها در یک روز ۰/۹ درصد و در چند روز ۱/۵ درصد بود که تکرارپذیری مناسب را داشته است. میزان صحت روش ۰/۸ ± ۱۰۲ ، ۰/۲ ± ۹۹ و ۰/۴ ± ۹۸ درصد به ترتیب برای ۸۰٪ ، ۱۰۰٪ و ۱۲۰٪ غلظت هدف (در این مطالعه ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بوده) است، از نوسانات کمی برخوردار بوده و در دامنه ۹۸ تا ۱۰۲ درصد است که طبق پروتکل در دامنه مناسبی قرار دارد.

از آنجایی که در این مطالعه مقدار هیدروکینون در ماتریکس لیپوزومی اندازه گیری شد، باید اثر دیگر مولکول ها نیز بررسی می شد از این رو اسپکتروم لیپوزوم نیز در انواع رقت ها مطالعه شد که با ۵۰۰ بار رقیق سازی هیچ تداخل جذبی بین مولکول های ماتریکس لیپوزومی و هیدروکینون دیده نشد. در همین راستا اسپکتروم لیپوزوم هیدروکینون با هیدروکینون استاندارد که هم غلظت بودند کاملا بر هم منطبق بوده و شدت جذب یکسانی در ۲۹۳ نانومتر نشان دادند.

اسپکتروم لیپوزوم پس از ۵۰۰ بار رقیق سازی با متانول در طول موج ۲۹۳ نانومتر جذب نداشت. از آنجایی

که نمونه های لیپوزومی هیدروکینون دارای غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود پس از ۵۰۰ بار رقیق سازی به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسید که بهترین مقدار رقیق سازی است. نسبت مولی مواد تشکیل دهنده لیپوزوم به هیدروکینون برای میزان رقیق سازی مهم بود تا جذب لیپوزوم حذف شود. نتایج پارامترهای معتبرسازی نشان داد که از این روش می توان جهت اندازه گیری مقدار هیدروکینون در لیپوزوم استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از دانشکده داروسازی مشهد که در انجام این پروژه همکاری داشته اند قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

1. Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G., Prota, G., 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. Biochim Biophys Acta 1073: 85-90.
2. Barry, B. W., 1987. Mode of action of penetration enhancers in human skin. J Control Release 6: 85-97.
3. Samad, A., Sultana, Y., Aqil, M., 2007. Liposomal drug delivery systems. Curr Drug Deliv 4: 297-305.
4. Layegh, P., Rajabi, O., Jafari, M. R., Emamgholi Tabar Malekshah, P., Moghiman, T., Ashraf, H., 2011. Efficacy of topical liposomal amphotericin B versus intralesional meglumine antimoniate (glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. J Parasitol Res, Article ID 656523.
5. Sazgarnia, A., Zabolinejad, N., Layegh, P., Rajabi, O., Berenji, F., Javidi, Z., 2012. Antileishmanial activity of liposomal clarithromycin against leishmania major promastigotes. Iran J Basic Med Sci 15: 1210-4.
6. Golmohammadzadeh, S., Imani, F., Hosseinzadeh, H., Jaafari, M. R., 2011. Preparation, characterization and evaluation of sun protective and moisturizing effects of nanoliposomes containing safranal. Iran J Basic Med Sci 14: 521-33.
7. Golmohammadzadeh, S., Jaafari, M. R., Kadimi, N., Greenoak, G., 2007. Determination of SPF and moisturizing effects of liposomal and conventional formulations of octyl methoxycinnamte as a sunscreen. Iran J Basic Med Sci 10: 99-110.
8. Nanni, E. J., Lovette, M. E., Hicks, R. D., Fowler, K. W., Borgerding, M. F., 1990. Separation and quantitation of phenolic compounds in mainstream cigarette smoke by capillary gas chromatography with mass spectrometry in the selected-ion mode. J Chromatogr 505: 365-74.
9. Firth, J., Rix, I., 1986. Determination of hydroquinone in skin-toning creams using high-performance liquid chromatography. Analyst 111: 129-32.
10. Chao, G. K. J., Suatoni, J. C., 1982. Determination of phenolic compounds by HPLC. J Chromatogr Sci 20: 436-40.
11. Borremans, M., Beer, J., Goeyens, L., 1999. Experimental and statistical validation of HPLC analysis of hydroquinone and its 4-methoxyphenol, 4-ethoxyphenol and 4-benzyloxyphenol ethers in cosmetic products. Chromatographia 50: 346-52.
12. Penner, N. A., Nesterenko, P. N., 2000. Simultaneous determination of dihydroxybenzenes, aminophenols and phenylenediamines in hair dyes by high-performance liquid chromatography on hypercross-linked polystyrene. Analyst 125: 1249-54.
13. Sirajuddin, S., Bhanger, M. I., Niaz, A., Shah, A., Rauf, A., 2007. Ultra-trace level determination of hydroquinone in waste photographic solutions by UV–vis spectrophotometry. Talanta 72: 546-53.
14. Desiderio, C., Ossicini, L., Fanali, S., 2000. Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. J Chromatogr A 887: 489-96.
15. Szoka, F., Papahadjopoulos, D., 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Annu Rev Biophys Bioeng 9: 467-508.
16. International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytica Procedures: Methodology, 1995.
17. Association of Official Analytical Chemists International, 1990. Official Methods of Analytical Chemists of AOAC International. 15(XVII).
18. Gandhimathi, R., Vijayaraj, S., Jyothirmaie, M., 2012. Method development and validation of uv spectroscopic method for estimation of asenapine maleate in bulk and tablet formulation. Int J Med 15: 85-92.
19. García, P. L., Santoro, M. R. M., Kedor-Hackman, E. R. M., Singh, A. K., 2005. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and

cream preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39(3): 764-768.
20. Uddin, S., Rauf, A., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Lutfullah, G., 2011. Highly sensitive spectrometric method for determination of hydroquinone in skin lightening creams: application in cosmetics. International Journal of Cosmetic Science 33(2): 132-137.