● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ نوزدهم، شمارهٔ ۱، ص ۶۹-۵۹، ۱۳۹۰

مقالهٔ پژوهشی

اندازه‌گیری هم‌زمان لوزارتان و هیدروکلروتیازید در فرآورده‌های دارویی با روش اسپکتروفتومتری مشتقی و مشتقی نسبی

مریم کاظمی‌پور[۱]، مهدیه ابراهیمی‌رحمانی[۲]، مهدی انصاری[۳*]

خلاصه

مقدمه: لوزارتان یک عامل ضد فشار خون قوی و غیر پپتیدی است که از طریق مهار گیرنده‌های آنژیوتانسین II عمل می‌کند. قرص Hyzaar® ترکیبی از لوزارتان و هیدروکلروتیازید است که برای کنترل فشار خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. چندین روش برای اندازه‌گیری هم‌زمان این دو دارو در فرآورده‌های دارویی گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به روش‌های RP- HPLC، CE، CEC و Multi-syringe chromatography اشاره نمود.

روش: از نمونه‌های استاندارد لوزراتان و هیدروکلروتیازید به‌تنهایی و به‌صورت مخلوط‌های با نسبت‌های مختلف در ناحیه مرئی- ماورای بنفش به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر طیف گرفته شد. برای اندازه‌گیری هم‌زمان دو دارو در حضور یکدیگر، بدون نیاز به جداسازی، لوزارتان با استفاده از تکنیک مشتق نسبی در طیف مشتق سوم با $\Delta\lambda$ = ۱۰ nm در طول موج ۲۴۶/۳ nm و هیدروکلروتیازید در طیف مشتق نسبی اول $\Delta\lambda$ = ۵ nm و طول موج ۳۳۴/۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. این روش برای اندازه‌گیری دو دارو در نمونه‌های واقعی نیز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: روش‌ها رابطه خطی خوبی در محدوده مورد بررسی داشته ($r > ۰/۹۹۹$). نتایج مربوط به دقت (RSD%) به ترتیب برای لوزاراتان و هیدروکلروتیازید ۲/۱۰ و ۱/۷۹ و صحت روش بر مبنای درصد خطا (Error%) برای لوزارتان۳/۳ و برای هیدروکلروتیازید۲/۳ درصد به دست آمد که مقادیر قابل قبولی هستند. بر اساس نتایج بررسی اعتبار روش، می‌توان نتیجه گرفت که این روش برای اندازه‌گیری دارو در فرآورده‌های دارویی، معتبر و قابل اعتماد می‌باشد. آنالیز نمونه‌های واقعی نیز نشان داد که به‌طور متوسط مقدار هیدروکلروتیازید در حدود ۸۴/۹ و مقدار لوزارتان ۹۲/۶ درصد نسبت به مقدار برچسب دارو می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی می‌توان گفت که اسپکتروفتومتری UV یک روش ساده، معتبر، ارزان و قابل اعتماد بدون نیاز به استفاده از حلال آلی و مراحل پیچیده آماده سازی نمونه است؛ اندازه‌گیری هم‌زمان دو دارو در فرآورده‌های دارویی که در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت در صنایع دارویی قابل کاربرد می‌باشد، در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و معتبر شناخته شد.

کلمات کلیدی: لوزارتان، هیدروکلروتیازید، اسپکتروفتومتری UV مشتقی، اسپکتروفتومتری UV مشتقی نسبی

۱- دانشیار شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان ۲- کارشناس ارشد شیمی تجزیه، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان ۳- دانشیار فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** کرمان، ابتدای بلوار هفت باغ، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس ● **آدرس پست الکترونیک:** mansari@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۳/۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۰/۳/۱۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۰/۴/۲۲

مقدمه

لوزارتان، آنتاگونیست گیرنده آنژیوتانسین II و دارویی برای پایین آوردن فشار خون است. آنژیوتانسین II، یک منقبض کننده عروقی فعال و هورمون اولیه فعال‌کننده سیستم رنین- آنژیوتانسین است که باعث تحریک ترشح آلدوسترون از قسمت کورتکس غدد فوق‌کلیه نیز می‌شود. لوزارتان در درمان فشار خون بالا به‌تنهایی یا همراه با سایر داروهای پایین‌آورنده فشار خون تجویز می‌گردد (۱).

هیدروکلروتیازید داروی دیگری است که سبب دفع آب اضافی از بدن و موجب کاهش ادم در بیماران مبتلا به نارسایی احتقانی قلب، ناراحتی‌های کلیه و سیروز کبدی می‌گردد. هیدروکلروتیازید برای درمان فشار خون بالا به‌تنهایی یا به عنوان درمان کمکی و همچنین درمان دیابت بی‌مزه (با منشأ مرکزی و کلیوی) مصرف می‌شود که باعث دفع بیشتر پتاسیم در ادرار می‌شود (۲).

HYZAAR® یک فرآورده ترکیبی از لوزارتان و هیدروکلرو تیازید است که به سه صورت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم لوزارتان پتاسیم و ۱۲/۵ میلی‌گرم هیدروکلروتیازید، ۱۰۰ میلی‌گرم لوزارتان پتاسیم و ۲۵ میلی‌گرم هیدروکلروتیازید و ۵۰ میلی‌گرم لوزارتان پتاسیم و ۱۲/۵ میلی‌گرم هیدروکلروتیازید در فرآورده ترکیبی موجود می‌باشد.

این دارو درمان ارجح درکنترل پرفشاری شدید خون است. ترکیب این دو دارو در درمان اولیه بیماران فشار خونی مصرف نمی‌شود؛ مگر وقتی که فشار خون بسیار بالا باشد. در HYZAAR®، ترکیب لوزارتان با هیدروکلروتیازید تأثیرات ضد فشار خونی بیشتری دارد. بسیاری از بیماران دیابتی نیازمند درمان‌های ترکیبی با استفاده از چنین داروهای ضد فشار خونی هستند. همچنین این دارو باعث کاهش خطر سکته در بیماران با مشکل بزرگ شدن بطن چپ می‌شود (۳).

برای تعیین میزان لوزارتان و هیدروکلروتیازید در فرآورده‌های دارویی ترکیبی، روش‌های کروماتوگرافی متعددی توسط Carlucci و همکاران (۴)، Argekar و Sawant (۵)، Dinc و Ustundag (۶)، Suhagia و همکاران (۷)، Obando و همکاران (۸) و Feng-ju و همکاران (۹) ارائه شده است. یک روش کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا و اسپکتروسکوپی نیز برای اندازه‌گیری همزمان لوزارتان و هیدروکلروتیازید در ترکیبات دارویی توضیح داده شده است (۱۰). روش‌های Capillary Electrophoresis (CE) و Capillary Electrochromatography (CEC) نیز برای تعیین لوزارتان و هیدروکلروتیازید در فرآورده‌های دارویی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱). یک روش نشان دهنده پایداری با High-performance liquid chromatography (HPLC) نیز توسط Hertzog و همکاران گزارش شده است (۱۲). Ozkan در ترکیه نیز از یک روش HPLC فاز معکوس برای اندازه‌گیری این دو دارو در قرص و سرم انسانی استفاده کرده است (۱۳). تجزیه مخلوط دو تایی لوزارتان و هیدروکلروتیازید با HPLC، اسپکتروفتومتری مشتقی و تکنیک Compensation نیز توسط Erk گزارش شده است (۱۴). وی از روش‌های HPLC فاز معکوس و اسپکتروفتومتری UV برای اندازه‌گیری این دو دارو در فرآوده‌های دارویی استفاده کرده است. اندازه‌گیری همزمان لوزارتان و هیدروکلروتیازید در پلاسمای انسانی با استفاده از روش LC/MS/MS نیز در برزیل انجام گرفته است (۱۵). در همه روش‌های ذکر شده از حلال‌های آلی به عنوان حلال استفاده شده است.

بیشتر روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری همزمان لوزارتان و هیدروکلروتیازید HPLC است که یک پروسه پرزحمت و وقت‌گیر را می‌طلبد. در روش‌های HPLC ستون‌های به کار رفته گران‌قیمت می‌باشند، نیاز به مراقبت زیادی دارند و عمر ستون نیز به نسبت کوتاه است؛ به

علاوه، در همه این روش‌ها از حجم زیادی از حلال‌های آلی استفاده شده است که بسیار سمی‌اند و برای محیط زیست آلودگی‌های بسیاری ایجاد می‌کنند. هدف اصلی در این مطالعه، توسعه یک روش ساده اسپکتروفتومتری UV بدون نیاز به مراحل جدا سازی و استفاده از حلال‌های آلی بود.

روش بررسی

در این مطالعه، ماده خالص لوزارتان پتاسیم (که از این پس به اختصار لوزارتان گفته می‌شود) و هیدروکلروتیازید تهیه شده از شرکت داروسازی داروپخش، آب دیونیزه تهیه شده به وسیله دستگاه Milli-Q ساخت شرکت میلی‌پور آمریکا، دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل Lambda25 ساخت شرکت Perkin-Elmer کشور آمریکا مجهز به کامپیوتر و نرم‌افزار اسپکتروفتومتری UV-Winlab، حمام التراسونیک Selecta، ترازوی Sartorius ± ۰/۰۰۰۱ g مدل CP124S ساخت کشور آلمان و میکروپیپت ۱۰۰-۱۰۰۰ µL مدل Transferpette® ساخت آلمان مورد استفاده قرار گرفت.

برای شروع کار، بعد از تعیین حلال مناسب برای لوزارتان و هیدروکلروتیازید خالص، طول موج‌های مورد نظر برای اندازه‌گیری هم‌زمان این دو ماده انتخاب شد و در نهایت روش در مورد قرص اجرا گردید.

انتخاب حلال مناسب

حلالیت لوزارتان و هیدروکلروتیازید در حلال آب مقطر بررسی شد. لوزارتان به راحتی در آب مقطر حل شد اما برای حل شدن هیدروکلروتیازید بایستی آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط در حمام التراسونیک قرار داد؛ بنابراین آب مقطر به عنوان حلال مناسب انتخاب گردید. این محلول‌ها در دمای محیط پایدار هستند.

تهیه غلظت‌های استاندارد هیدروکلروتیازید

با توجه به این که این روش برای اندازه‌گیری هم‌زمان این دو دارو در قرص به کار می‌رفت، ملاک عمل برای تهیه استانداردها نسبت‌های این دو دارو در قرص Hyzaar® بود. از این رو، نسبت ۴ (لوزارتان) به ۱ (هیدروکلروتیازید) ملاک کار برای اندازه‌گیری منظور شد.

از محلول‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیدروکلروتیازید در مقابل ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لوزارتان به‌طور جداگانه به عنوان شاهد طیف گرفته شد و از این طیف‌ها برای انتخاب مناسب‌ترین طول موج استفاده گردید.

تهیه غلظت‌های استاندارد لوزارتان

از این محلول‌های ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ میکروگرم در میلی‌لیتر لوزارتان به‌طور جداگانه در مقابل شاهد هیدروکلروتیازید ۲/۵ لوزارتان طیف گرفته شد و از این طیف‌ها برای انتخاب مناسب‌ترین طول موج استفاده گردید.

انتخاب طول موج

مبنای انتخاب طول موج، استفاده از شرایطی است که در آن کمترین هم‌پوشانی و تداخل بین طیف آنالیت‌ها و در ضمن بیشترین رابطه غلظت- پاسخ برای غلظت‌های مختلف وجود داشته باشد. به همین جهت طیف‌های نرمال، مشتق‌های اول تا چهارم با $\Delta\lambda$ های از ۳ تا ۱۵ و همچنین طیف‌های نسبی و مشتقی نسبی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی روش تجزیه‌ای

برای تأیید روش تجزیه‌ای، دقت، صحت، حد تشخیص، حد تعیین کمی، پایداری اجزای تجزیه شونده، تداخلات مواد حاصل از تجزیه و نیز ماتریکس فرآورده دارویی مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری لوزارتان و هیدروکلروتیازید در قرص

بر طبق اطلاعات موجود بر روی برچسب فرآورده، قرص ترکیبی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم لوزارتان پتاسیم و ۲۵ میلی‌گرم هیدروکلروتیازید می‌باشد. ابتدا قرص ترکیبی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد و سپس این محلول صاف گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول صاف شده تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق گردید و طیف مربوط به آن گرفته شد؛ سپس مقدار اندازه‌گیری شده به‌صورت درصد ماده مؤثره نسبت به مقدار برچسب گزارش گردید.

نتایج

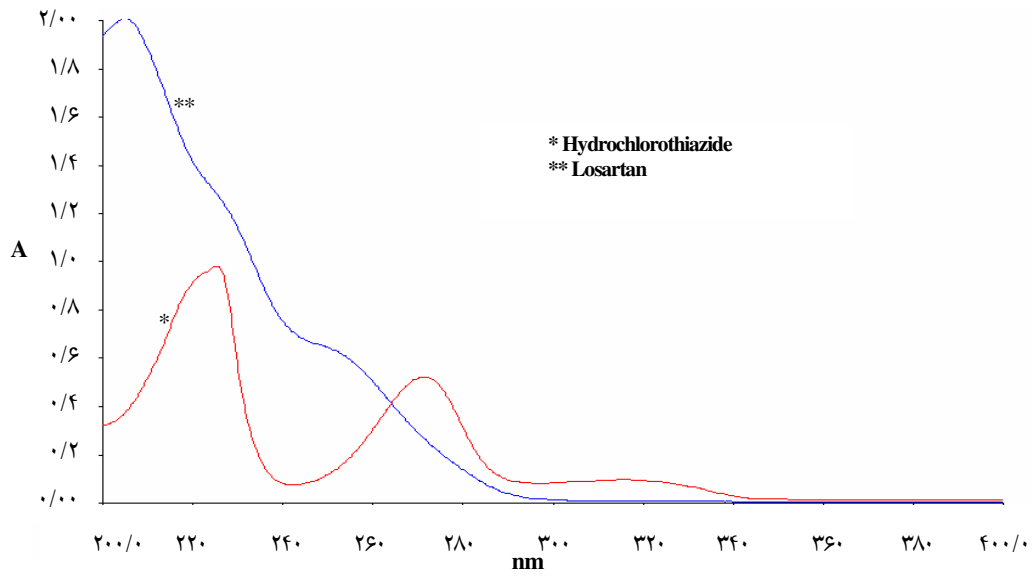
طیف‌های نرمال مربوط به لوزارتان و هیدروکلروتیازید خالص در شکل ۱ نمایش داده شده است.

در طیف‌های مشتق اول لوزارتان و هیدروکلروتیازید از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد (شکل ۲).

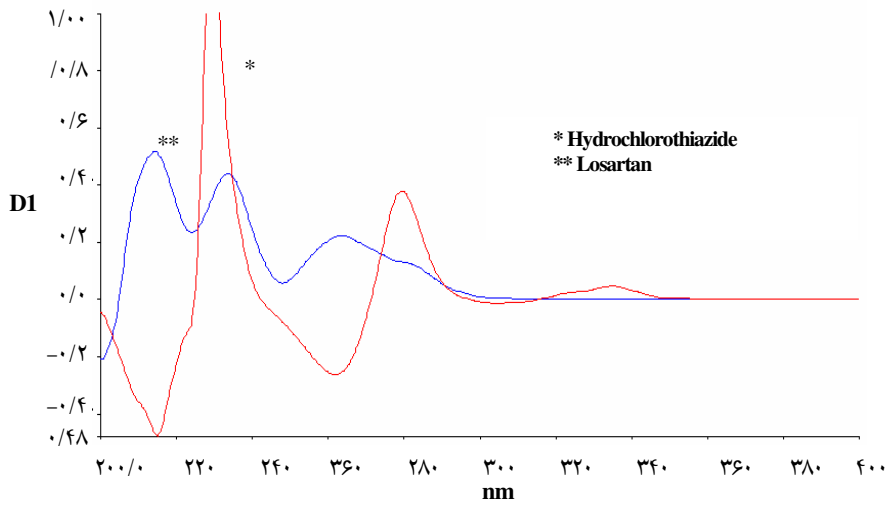
طیف مخلوط هیدروکلروتیازید با غلظت‌های مختلف و لوزارتان با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل لوزارتان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان طیف نسبی در شکل ۳ نمایش داده شده است.

در شکل ۴ طیف مشتق اول نسبی مخلوط هیدروکلروتیازید با غلظت‌های مختلف و لوزارتان با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل لوزارتان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آورده شده است.

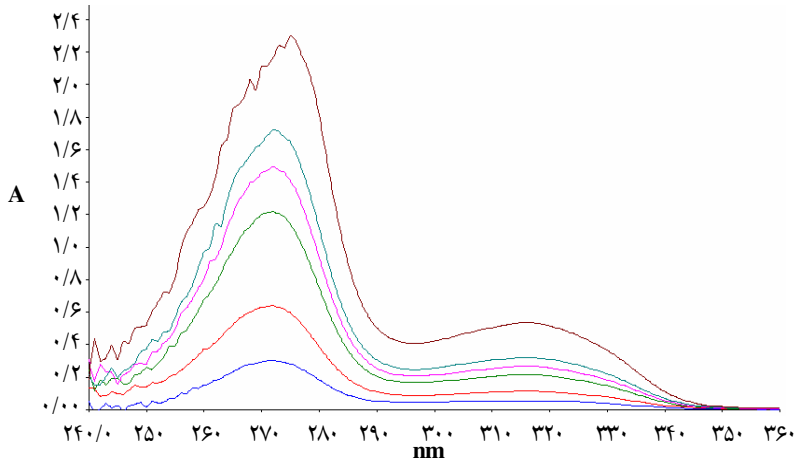
در شکل ۵ طیف نسبی مخلوط لوزارتان با غلظت‌های مختلف و هیدروکلروتیازید با غلظت ثابت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل هیدروکلروتیازید با غلظت ۲/۵ میکروگرم به عنوان بلانک قابل مشاهده است.



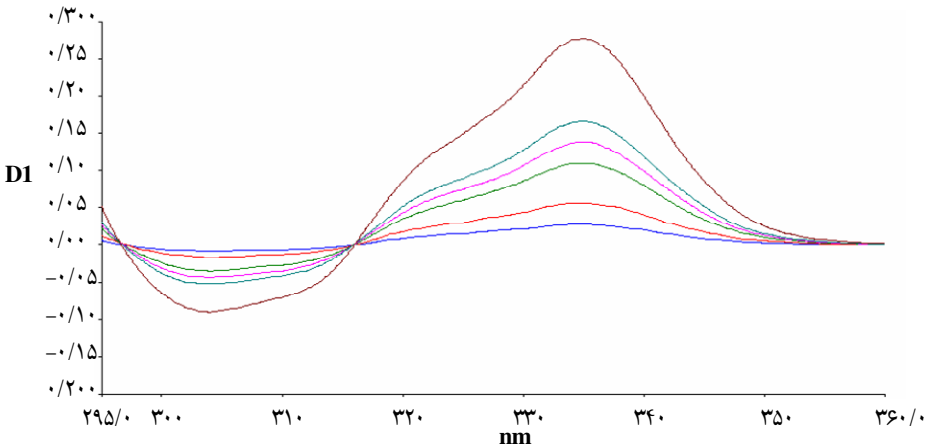
شکل ۱. *طیف نرمال محلول استاندارد لوزارتان ۴۰ µg/ml و محلول استاندارد هیدروکلروتیازید ۱۰ µg/ml*



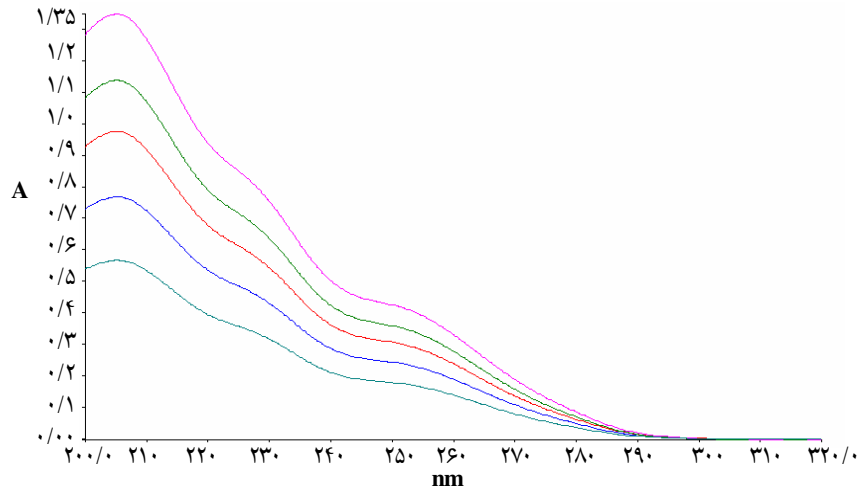
شکل ۲. *طیف مشتق اول محلول استاندارد لوزارتان ۴۰ µg/ml و محلول استاندارد هیدروکلروتیازید ۱۰ µg/ml با $\Delta\lambda$ = ۵ nm*



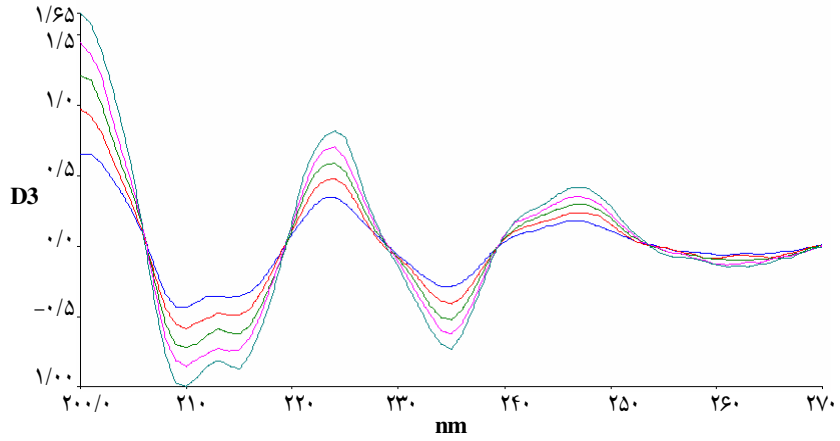
شکل ۳. *طیف مخلوط هیدروکلروتیازید ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و لوزارتان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل لوزارتان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر*



شکل ٤. *طیف مشتق اول نسبی $\Delta\lambda$ = ۵ nm مخلوط هیدروکلروتیازید ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و لوزازتان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل لوزارتان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر*



شکل ۵. *طیف مخلوط لوزارتان ٦، ٨، ١٠، ١٢ و ١٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر و هیدروکلروتیازید ٢/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل هیدروکلروتیازید ٢/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر*



شکل ٦. *طیف مشتق سوم نسبی $\Delta\lambda$ = ١٠ nm مخلوط لوزارتان ٦، ٨، ١٠، ١٢ و ١٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر و هیدروکلروتیازید ٢/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقابل هیدروکلروتیازید ٢/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر*

جدول ۱. *درصد مقادیر ماده مؤثره لوزارتان و هیدروکلروتیازید نسبت به مقدار برچسب (لوزارتان ۱۰۰ میلی‌گرم، هیدروکلروتیازید ۲۵ میلی‌گرم) در ۵ قرص*

ردیف	۱	۲	۳	٤	۵	میانگین	انحراف‌استاندارد
درصد لوزارتان در قرص نسبت به مقدار برچسب	۹۴/۳	۹۹/۹	۸۶/۹	۸۸/۳	۹۳/۸	۹۲/۶	۵/۲
درصد هیدروکلروتیازید در قرص نسبت به مقدار چسب	۹۰/۶	۹۰/۵	۸۰/۸	۸۳/۶	۷۹/۳	۸۴/۹	۵/۴

برای اندازه‌گیری لوزارتان از طیف مشتق سوم نسبی استفاده شد که در شکل ۶ نمایش داده شده است.

اندازه‌گیری لوزارتان و هیدروکلروتیازید در نمونه واقعی قرص (۵ قرص به‌طور جداگانه) با روش توسعه داده شده فوق مطالعه شد که نتایج در جدول ۱ آمده است.

بحث و نتیجه‌گیری

روش‌های کروماتوگرافی متعددی برای اندازه‌گیری هم‌زمان لوزارتان و هیدروکلروتیازید در فرآورده‌های دارویی و یا نمونه‌های بیولوژیک گزارش شده است (۱۷-۱۵، ۱۳، ۸، ۷، ۴) که البته مستلزم صرف هزینه‌های بالا، استفاده از دستگاه‌های بسیار گران قیمت، مصرف حلال‌های آلی با درجه خلوص بالا (که اغلب گران قیمت و آلوده کننده محیط زیست هستند)، پرسنل مجرب و صرف وقت زیاد است. اما همان گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، به علت هم‌پوشانی طیف‌ها، ستفاده از روش اسپکتروفتومتری UV معمولی که هیچ‌یک از عیوب بالا را ندارد، برای اندازه‌گیری دو دارو به‌طور هم‌زمان در نمونه‌های مخلوط ممکن نیست. البته به نظر می‌رسید که شاید بتوان از طول موج حدود ۳۲۰ نانومتر برای اندازه‌گیری هیدروکلروتیازید استفاده نمود؛ ولی بررسی میزان تداخل طیفی نشان داد که این تداخل حدود ۷/۵ درصد است از آن نمی‌توان استفاده کرد. به همین دلیل تلاش‌های زیادی برای اندازه‌گیری هم‌زمان این دو دارو با استفاده از روش اسپکتروفتومتری UV و کمومتری صورت گرفته است (۱۹، ۱۸، ۱۴، ۱۰). اسپکتروفتومتری مشتقی یکی از تکنیک‌های ارزشمند برای استخراج اطلاعات کمی و کیفی از طیف‌های هم‌پوشان می‌باشد (۲۰) که در این تحقیق از آن استفاده شد. طیف مشتق اول برای اندازه‌گیری هیدروکلروتیازید انتخاب گردید. با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که امکان اندازه‌گیری هیدروکلروتیازید در طول موج ۳۳۴/۴ نانومتر با کمترین تداخل طیفی (کمتر از ۰/۶ درصد) در حضور لوزارتان وجود دارد. بنابراین به راحتی این طول موج در اندازه‌گیری مستقل هیدروکلروتیازید قابل استفاده می‌باشد.

به علاوه، در مرحله بعدی برای کاهش بیشتر تداخل و حذف آن از روش مشتقی نسبی استفاده شد. در این روش طیف مخلوط دو دارو به جای آن که در برابر بلانک رسم شود، در برابر یکی از داروها رسم گردید که پیشتر خط پایه طیف با آن دارو صفر شده بود. در شکل ۳ مشاهده می‌شود که امکان تداخل و نیز رابطه ضعیف‌تر غلظت- پاسخ وجود دارد؛ به همین دلیل از آن مشتق اول گرفته شد.

شکل ۴ نشان می‌دهد که باز در طول موج ۳۳۴/۴ نانومتر رابطه خطی مناسبی بین غلظت و دامنه جذب وجود دارد ($r > ۰/۹۹۹$). در این روش لوزارتان با استفاده از تکنیک مشتق نسبی در طیف مشتق سوم با $\Delta\lambda$ = ۱۰ nm در طول موج ۲۴۶/۳ nm و هیدروکلروتیازید در طیف مشتق نسبی اول $\Delta\lambda$ = ۵ nm و طول موج ۳۳۴/۴ nm قابل اندازه‌گیری می‌باشد؛ در حالی که در روش اسپکتروفتومتری UV، که توسط Erk (۱۴) گزارش شده است، لوزارتان در طیف مشتق اول با $\Delta\lambda$ = ۶ nm در طول موج ۲۳۸/۳ nm و هیدروکلروتیازید در طیف مشتق اول $\Delta\lambda$ = ۶ nm و طول موج ۲۳۰/۴ nm با استفاده از تکنیک مشتق نسبی اندازه‌گیری شد. از مقایسه روش فوق با روش گزارش شده توسط Erk نتیجه‌گیری می‌شود که با به کار بردن طول موج‌های پیشنهاد شده Erk نتایج مطلوبی حاصل نمی‌شود. همچنین حلال مورد استفاده در روش Erk استونیتریل می‌باشدکه یک حلال آلی است.

بررسی دقت در یک روز و دقت در روزهای مختلف نشان داد که RSD% در هیچ‌یک از موارد از ۲/۲۱ درصد تجاوز نکرد. حد تشخیص (Limit of detection یا LOD) و حد قابل اندازه‌گیری (Limit of quantification یا LOQ) برای لوزارتان و هیدروکلروتیازید به ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۲۳ و نیز ۱/۳۵ و ۰/۴۷ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمده است. بررسی

صحت روش (با اندازه‌گیری درصد خطای اندازه‌گیری نسبت به مقدار واقعی) نشان داد که حداکثر خطای اندازه‌گیری برای لوزارتان در غلظت ۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به مقدار ۱/۴۷ درصد بود و برای هیدروکلروتیازید در غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مقدار ۱/۰۲ درصد به دست آمد. این مقدار خطا، که نشان دهنده صحت روش به میزان بیش از ۹۸ درصد می‌باشد، در محدوده قابل قبول قرار داشت و اعتبار روش را نشان داد.

بررسی تداخل مواد جانبی موجود در قرص شامل نشاسته، لاکتوز، منیزیم استئارات، هیدروکسی پروپیل متیل سلولز، میکروکریستالین سلولز، هیدروکسی پروپیل سلولز و تیتانیوم دی اکساید نیز حاکی از آن بود که این مواد در طول موج ۳۳۴/۴ نانومتر در حدود ۰/۰۹ درصد جذب دارند (نسبت به کمترین غلظت هیدروکلروتیازید) که رقمی قابل قبول می‌باشد.

بررسی پایداری نشان داد که نمونه‌های تهیه شده جهت انجام آنالیز حداقل به مدت ۲ هفته در دمای یخچال پایدار هستند. در شکل ۵ ملاحظه می‌شود که به جز چند نقطه عطف، پیک مشخصی وجود ندارد و پیک نزدیک به ۲۰۰ نانومتر هم به دلیل تداخلات زیاد قابل استفاده نیست. به همین دلیل از این طیف مشتق سوم گرفته شد که در شکل ۶ آمده است. در این طیف، در طول موج ۲۴۶/۳ نانومتر رابطه خطی مناسبی بین غلظت و دامنه جذب وجود داشت ($r > ۰/۹۹۷$). در بررسی دقت در یک روز و دقت در روزهای مختلف، %RSD در هیچ‌یک از موارد از ۳/۰۴ درصد تجاوز نکرده است. بررسی تداخل مواد جانبی موجود در قرص نیز نشان داد که این مواد در طول موج ۲۴۶/۳ نانومتر در حدود ۰/۰۷ درصد جذب دارند (نسبت به کمترین غلظت لوزارتان) که عددی قابل قبول است. بررسی پایداری نشان داد که نمونه‌های تهیه شده به منظور آنالیز، حداقل به مدت ۲ هفته در دمای یخچال پایدار هستند.

روش توسعه داده شده برای تعیین مقدار دارو در قرص مورد استفاده قرار گرفت که نتایج نشان داد که میانگین درصد لوزارتان در قرص در محدوده مجاز ۹۰ تا ۱۱۰ درصد قرار دارد؛ در حالی که هیدروکلروتیازید در محدوده مجاز واقع نشده و کمتر از مقدار لازم بود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که روش توسعه داده شده از دقت، صحت و حساسیت مناسبی برخوردار بوده، با توجه به استفاده از آب به جای حلال‌های آلی، بر روش‌های مشابه گزارش شده ارجحیت دارد. به علاوه، با توجه به سهولت کار و دسترسی همه آزمایشگاه‌ها به‌دستگاه اسپکتروفتومتر و عدم وجود روش رسمی فارماکوپه‌ای برای اندازه‌گیری ترکیب این دو دارو به‌طور همزمان، این روش می‌تواند در آزمایشات روزمره کنترل کیفیت دارو در کارخانجات داروسازی، برای اندازه‌گیری میزان ماده مؤثره (Assay) و آزمایشات انحلال (Dissolution) به کار گرفته شود.

References

1. Shi L, Mao C, Xu Z, Zhang L. Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 2010; 15(9-10): 332-41.
2. Hyzaar Official FDA information, side effects and uses [Online]. 2011 [cited 2011 May 20]; Available from: URL: http://www.drugs.com/pro/hyzaar.html/
3. Gleim GW, Rubino J, Zhang H, Shahinfar S, Soffer BA, Lyle PA, et al. A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group trial of the antihypertensive efficacy and tolerability of a combination of once-daily losartan 100 mg/hydrochlorothiazide 12.5 mg compared with losartan 100-mg monotherapy in the treatment of mild to severe essential hypertension. *Clin Ther* 2006; 28(10): 1639-48.
4. Carlucci G, Palumbo G, Mazzeo P, Quaglia MG. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 23(1): 185-9.
5. Argekar AP, Sawant JG. A gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide (hct) and losartan potassium (los) from tablets. *Anal Lett* 2000; 33(5): 869-80.
6. Dinc E, Ustundag O. Application of multivariate calibration techniques to hplc data for quantitative analysis of a binary mixture of hydrochlorathiazide and losartan in tablets. *Chromatographia* 2005; 61(5): 237-44.
7. Suhagia B, Shah R, Patel D. Development of a rp-hplc method for evaluating losartan potassium and hydrochlorthiazide tablets. *Indian J Pharm Sci* 2005; 67(1): 37-42.
8. Obando MA, Estela JM, Cerda V. Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48(1): 212-7.
9. Feng-ju C, Yan L, Jian-wen L, Chang-qi P, Xiao-hong L, Zhong-gui H. Determination of the contents of drugs and related substances in losartan potassium-hydrochloro-thiazide dispersible tablets by hplc. *J Shenyang Pharm Uni* 2009; 26(6): 460-5.
10. Shah SA, Rathod IS, Suhagia BN, Savale SS, Patel JB. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in combined dosage forms by first-derivative spectroscopy and high-performance thin-layer chromatography. *J AOAC Int* 2001; 84(6): 1715-23.
11. Quaglia MG, Donati E, Carlucci G, Mazzeo P, Fanali S. Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 29(6): 981-7.
12. Hertzog DL, McCafferty JF, Fang X, Tyrrell RJ, Reed RA. Development and

validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30(3): 747-60.

13. Ozkan SA. Simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by rp-hplc. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2001; 24(15): 2337-46.
14. Erk N. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24(4): 603-11.
15. Salvadori MC, Moreira RF, Borges BC, Andraus MH, Azevedo CP, Moreno RA, et al. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in human plasma by LC/MS/MS with electrospray ionization and its application to pharmacokinetics. *Clin Exp Hypertens* 2009; 31(5): 415-27.
16. Tarcomnicu I, van Nuijs AL, Simons W, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, et al. Simultaneous determination of 15 top-prescribed pharmaceuticals and their metabolites in influent wastewater by reversed-phase liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 2011; 83(3): 795-803.
17. Lusina M, Cindric T, Tomaic J, Peko M, Pozaic L, Musulin N. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. *Int J Pharm* 2005; 291(1-2): 127-37.
18. Lakshmi KS, Lakshmi S. Simultaneous spectrophotometric determination of valsartan and hydrochlorothiazide by H-point standard addition method and partial least squares regression. *Acta Pharm* 2011; 61(1): 37-50.
19. Nagavalli D, Vaidhyalingam V, Santha A, Sankar AS, Divya O. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. *Acta Pharm* 2010; 60(2): 141-52.
20. Sanchez RF, Bosch OC. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004-2008: a review. *Anal Chim Acta* 2009; 635(1): 22-44.

Simultaneous Determination of Losartan and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations by Derivative and Ratio Derivative Spectrophotometry

Kazemipour M.,Ph.D.[1], Ebrahimi Rahmani M., M.Sc.[2], Ansari M., PhD.[3*]

1. Associate Professor of Chemistry, Faculty of Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
2. Master of Science in Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Kerman Brunch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
3. Associate Professor of Pharmaceutics, Pharmaceutics Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: mansari@kmu.ac.ir

(Received: 27 May 2010 Accepted: 13 July 2011)

Abstract

Background & Aims: Losartan is a non-peptide potent antihypertensive agent that acts through blocking angiotensin II receptors. Hyzaar® is a combination product that contains two drugs, losartan and hydrochlorothiazide, used to lower high blood pressure. There are some reports regarding simultaneous measurement of the drugs in pharmaceutical and biological samples which includes HPLC, CE, CEC, and multisyringe chromatography.

Methods: UV-V is spectra of standard solutions of losaratan and hydrochlorothiazide were prepared separately and together in combination with various concentrations of the drugs. To determine these two drugs simultaneously without any preliminary treatment, losartan was determined by ratio derivative spectrophotometry at third derivation with $\Delta\lambda$ = 10 nm at 246.3 nm, and hydrochlorothiazide was determined at first derivation with $\Delta\lambda$ = 5nm at 334.4 nm. This method was used to determine the two drugs in real samples of tablets.

Results: The method had a good linearity in the concentration range studied ($r > 0.999$). Precision of the method revealed that RSD% was lower than 2.10 and 1.79 for losartan and hydrochlorothiazide, respectively. Accuracy of the method on the basis of error% was lower than 3.3% for losartan and 2.3% for hydrochlorothiazide. Based on the validation results, it could be concluded that the method was reliable and valid for determination of the drugs in their preparations. Real sample analysis showed that tablets had 84.9% hydrochlorothiazide and 92.6% losartan compared to label amount of the drugs.

Conclusions: Results depicted a simple, valid, inexpensive and reliable method for simultaneous determination of the two drugs in pharmaceutical preparations applicable to the quality control laboratory of pharmaceutical industries.

Keywords: Losartan, Hydrochlorothiazide, Derivative UltraViolet Spectrophotometry, Ratio Derivative UltraViolet Spectrophotometry

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(1): 59-69