View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Research Repository Portal of Medilam



# راه اندازی و معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با آشکارسازی فلورسانس به منظور تعیین مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی ایمی پرامین در قرص های 10 و 50 میلی گرمی

بهروز اکبری آدرگانی *، نوشین ادیب ، هما حاجی مهدی پور

عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو (FDLRC)، معاونت غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

تاریخ دریافت:88/3/27 تاریخ پذیرش:88/5/2

## چکیده

***مقدمه:*** ایمی پرامین از جمله ترکیبات آلی سه حلقه ای می باشد که در درمان برخی از بیماری ها از جمله در درمان افسردگی مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به روند رو به گسترش مصرف قرص های ایمی پرامین، ضرورت کنترل کیفی آنبیش از پیش احساس می شود. کنترل دقیق مقدار ماده مؤثره و تعیین میزان ضریب یکنواختی در این دارو مستلزم استفاده از روش تجزیه ای حساس می باشد که از دقت و صحت کافی برخوردار باشد. هدف از انجام این پژوهش تعیین مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی ایمی پرامین در قرص های 10 و 50 میلی گرمی از طریق راه اندازی و معتبرسازی یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز فلورسانس می باشد.

***مواد و روش ها:*** در این مطالعه به طور تصادفی قرص های 10 و 50 میلی گرمی ایمی پرامین از محل توزیع جمع آوری شدند. باتوجه به ساختار شیمیایی خاص این دارو از طریق کنترل سایر متغیرهای شیمیایی برای تعیین مقدار ماده مؤثره و میزان ضریب یکنواختی در نمونه های قرص یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارسازی فلورسانس راه اندازی و معتبرسازی شد. نتایج این آزمایشات با نمونه استاندارد دارو مورد مقایسه قرار گرفت.

***یافته های پژوهش:*** نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد که با استفاده از سیستم کروماتوگرافی با کارایی بالا و آشکارساز فلورسانس می توان ایمی پرامین را با یک زمان بازداری متوسط 2 دقیقه تعیین مقدار نمود. حد تشخیص این روش برای تعیین مقدار ایمی پرامین در فرمولاسیون دارو 0/2 نانوگرم در میلی لیتر با نسبت سیگنال به نویز 3 می باشد. نتایج آزمایشهای کروماتوگرافی و محاسبه متغیرهای آماری نشان می دهد که نمونه های قرص مورد مطالعه از نظر مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی با استانداردهای تعیین شده از طرف فارماکوپه مطابقت دارند. آزمون آماری t نیز اختلاف معنی داری را بین درصد ماده موثره در دو فراورده آزمون و مرجع نشان نمی دهد($p> 0/05$).

***بحث و نتیجه گیری:*** روش کروماتوگرافی راه اندازی و معتبرسازی شده با آشکارسازی فلورسانس با داشتن دقت و صحت کافی می تواند در تعیین دقیق مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی دارو مورد استفاده قرار گیرد. روند تغییرات نتایج در آزمایشات درون روزی و بین روزی تعیین مقدار دارو نشان می دهد که این روش از دقت و صحت بالایی برخوردار است. داشتن حد تشخیص پایین، دامنه خطی نسبتاً گسترده، دقت و صحت کافی، امکان دستیابی به جداسازی مورد نظر روی پایه پلیمری ستون PRP در زمان کوتاه و برخورداری این روش از استحکام کافی از نکات مثبت روش راه اندازی شده است.

**واژه های کلیدی:** ایمی پرامین، آشکارساز فلورسانس، کروماتوگرافی مایع، مقدار ماده مؤثره، میزان یکنواختی

* **نویسنده مسئول:** عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو (FDLRC)، معاونت غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
***E-mail:*** drugresearch@fdo.ir

## مقدمه

کنترل کیفیت از سابقه ای طولانی معادل عمر صنعت برخوردار می باشد. کیفیت فراورده های دارویی به ویژه از نظر مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی باتوجه به وجود اثرات جانبی و عوارض سمیت و غیر درمانی آن ها اهمیت زیادی دارد. در یک کارخانه داروسازی پس از ارائه فرمولاسیون های مختلف برای یک دارو جهت رسیدن به اثرات درمانی مطلوب و کاستن معایب درمانی، کنترل فراورده و بررسی اثرات بیولوژیک دارو مورد توجه قرار می گیرد. معمولاً در طی مراحل تولید، کنترل های فیزیکی و شیمیایی انجام می شوند. در بخش مربوط به آزمایش های برون بدنی، مقدار ماده موثره موجود و میزان یکنواختی آن در هر واحد فرآورده و میزان آزاد شدن دارو از فراورده در واحد زمان مورد آزمایش قرار می گیرند. تفاوت های موجود در فراورده های دارویی تولید شده از یک ماده موثره توسط شرکت های داروسازی مختلف از جمله مواد اولیه، نوع و میزان مواد جانبی همراه در هر فرمول و نیز فرایند تولید محصول نهایی باعث بروز اختلالاتی در غلظت های پلاسمایی حاصل از دارو می شود که ممکن است منجر به بروز عوارض ناخواسته و یا کاهش اثر درمانی مورد نظر گردد. واضح است که انجام آزمایشات تعیین مقدار برون بدنی و به ویژه تعیین مقدار دارو در آزمایشات درون بدنی مستلزم در اختیار داشتن یک روش حساس و با دقت و صحت کافی می باشد.

از جمله ترکیبات دارویی که امروزه مصرف فراوانی دارند داروهای ضد افسردگی هستند که عموماً ترکیباتی با ساختار شیمیایی سه حلقه ای می باشند. از جمله این ترکیبات می توان به تریمیپرامین، نورتریپتیلین، وراپامیل، کلومیپرامین و ایمی پرامین اشاره نمود. ایمی پرامین شاخص ترین داروی ضد افسردگی می باشد که از باز جذب دو ناقل مهم عصبی به نام های نوراپی نفرین و سروتونین ممانعت می کند. این دارو در درمان دردهای شدید و مزمن مانند سرطان، سر دردهای خوشه ای، میگرن و ... نیز استفاده می شود. ایمی پرامین به شکل قرص های10، 25 و 50 میلی گرمی در بازار دارویی ایران وجود دارد و توسط چند شرکت داروسازی تولید می شود.

روش هایی همچون طیف سنجی ماورای بنفش،(1) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارسازی ماورای بنفش،(2) کروماتوگرافی گازی، طیف سنجی جرمی،(3) الکتروفورز مویئنه،(4) و روش های الکتروشیمیایی،(5) برای تعیین مقدار ایمی پرامین در فرمولاسیون دارویی و محیط های بیولوژیک گزارش شده است که هر کدام از نظر داشتن دقت و صحت کافی، پیچیدگی دستگاهی، صرف زمان طولانی جهت انجام آزمایش، گران بودن دستگاه و نیاز به نیروی متخصص دارای محدودیت می باشند. اخیراً با راه اندازی و معتبرسازی یک روش آنالیز الکتروشیمیایی مبتنی بر ولتامتری چرخه ای، اندازه گیری ایمی پرامین در فراورده دارویی در حد پیکو مولار گزارش شده است.(6)

هدف از انجام این پژوهش راه اندازی و معتبرسازی یک روش تجزیه ای حساس است که بتوان توسط آن ایمی پرامین را که یکی از داروهای بسیار متداول در درمان افسردگی است، در آزمایشات برون بدنی با دقت و صحت زیاد و حساسیت کافی تعیین مقدار نمود. بدین ترتیب می توان کیفیت فرآورده تولیدی را از نظر میزان ماده مؤثره و مقدار یکنواختی دارو در قرص کنترل نموده و با نمونه های استاندارد مقایسه کرد.

## مواد و روش ها

قرص های 10 میلی گرمی ایمی پرامین ساخت کارخانه داروسازی لرستان و قرص های 50 میلی گرمی این دارو ساخت کارخانه داروسازی سبحان به طور تصادفی از سطح توزیع به مقدار لازم جمع آوری شدند. ایمی پرامین هیدروکلراید مرجع نیز استانداردهای Tofranil 10 و 50 میلی گرم بوده است. تمام واکنش گرهای مورد استفاده ساخت کمپانی مرک آلمان بوده و تمام حلال ها از خلوص کروماتوگرافی برخوردار بوده اند.

به منظور انجام آزمایش های مربوط به تعیین مقدار ایمی پرامین از کروماتوگرافی با کارایی بالا

مدل ۲۶۹۵ Alliance مجهز به آشکارساز فلورسانس ۲۴۷۵ Waters و ستون PRP-۱ به ابعاد(10 µm، 4/1×150mm) که جداسازی خوبی را برای ترکیبات آلی چند حلقه ای دارا می باشد استفاده گردید. متغیرهای مربوط به این روش آنالیز به طور تجربی تعیین شدند. فاز متحرک شامل 38 درصد استونیتریل و 62 درصد بافر فسفات بود که pH آن در حد4/0 تنظیم شده بود. سرعت جریان فاز متحرک روی 1/5 میلی لیتر بر دقیقه تنظیم شد. باتوجه به ساختار ملکولی ترکیب دارویی مورد مطالعه و با مراجعه به طیف آن در متون علمی می توان نتیجه گرفت که این مواد می توانند نور ماورای بنفش را جذب کرده و سپس در تابشی در طول موج بالاتر از خود نشر کنند. در نتیجه این مواد را می توان در طیف سنجی فلورسانس مورد بررسی قرار داد،(8-7). به منظور تعیین طول موج ماکزیمم برانگیختگی و نشر فلورسانس ایمی پرامین، تحت شرایط کروماتوگرافی بهینه به دست آمده غلظت های متوسطی از محلول های استاندارد این ترکیب در دستگاه اسپکتروفتومتر فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به وجود جذب بیشینه در ناحیهٔ 250nm در طیف جذبی محلول اسیدی ایمی پرامین، در این طول موج میزان نشر فلورسانس در طول موج جذبی ذکر شده در ناحیه 250 تا 370 روبش گردید و طول موج بیشنه نشری آن در 360 nm به دست آمد. از این رو کلیهٔ آزمایشات تعیین مقدار مادهٔ مؤثره و میزان یکنواختی دارو در این طول موج ها انجام گردید.

*الف) بررسی خلوص استاندارد ایمی پرامین و مطابقت آن با نمونه مرجع*

با توجه به ضرورت اطمینان از خلوص ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در کنترل کیفیت مواد دارویی و به منظور اطمینان از مطابقت پودر ایمی پرامین مورد استفاده با نمونه مرجع، عاری بودن آن از هرگونه ناخالصی(درحد تشخیص روش های طیف بینی ماورای بنفش و مادون قرمز) و تعیین طول موج جذب ماکزیمم برای استفاده در تعیین مقدارهای آزمایشات برون بدنی طیف های ماورای بنفش و مادون قرمز ایمی پرامین تهیه شدند و با طیف های مرجع گزارش شده در متون علمی برای این ترکیب مقایسه گردیدند.(9)

*ب) تعیین مقدار مادهٔ مؤثره*

به منظور انجام آزمایش تعیین مقدار ماده مؤثره، تعداد 20 عدد قرص ایمی پرامین 10 میلی گرمی و در بررسی دیگر 20 عدد قرص 50 میلی گرمی کاملاً به شکل پودر در آورده شد و مقداری از آن که معادل 100 میلی گرم ایمی پرامین هیدروکلراید باشد در مقدار کافی از اسید کلریدریک رقیق حل گردید. پس از عبور محلول حاصل از فیلتر و کنار گذاشتن بخش فیلتر شده اولیه، 5 میلی لیتر از محلول صاف شده در یک قیف جداکننده وارد شد. این محلول با هیدروکسید سدیم یک نرمال قلیایی ایجاد نمود و چهار بار با 20 میلی لیتر اتر استخراج گردید. محلول های اتری جمع آوری شده نیز با محلول اسید کلریدریک 0/5 نرمال استخراج برگشتی شدند. 100 میکرولیتر از محلول حاصل به دستگاه HPLC تزریق گردید.

*ج) تعیین میزان یکنواختی*

یکنواختی میزان ماده مؤثره برای قرص های 10 و 50 میلی گرمی به طور جداگانه انجام شد. بدین منظور هر بار یک قرص به صورت پودر کاملاً نرم در آورده شد و در مقدار کافی اسید کلریدریک 1 درصد حل شد. سپس با عبور از فیلتر، صاف گردید. بخش فیلترشده اولیه کنارگذاشته شد و حجمی از آن که معادل 2/5 میلی گرم ایمی پرامین باشد برداشت شده و با اسید به حجم رسانده شد. مشابه آزمون قبل حجمی معادل 100 میکرولیتر از محلول حاصل به دستگاه HPLC تزریق گردید.

## یافته های پژوهش

بررسی طیف ماورای بنفش ایمی پرامین در محلول اسید کلریدریک 0/5 نرمال و طیف مادون قرمز تهیه شده از قرص پتاسیم برمید این دارو نشان می دهد که ایمی پرامین مورد استفاده در تعیین مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی دارو از خلوص و تطابق کافی با طیف مرجع این ترکیبات برخوردار است،(6). نتایج حاصل از شش بار اندازه گیری نشر فلورسانس محلول های استاندارد ایمی پرامین در غلظت های

0/1، 0/5، 2/5 و 12/5 نانوگرم در میلی لیتر حاکی از آن است که رابطه خطی خوبی بین غلظت و نشر فلورسانس برقرار می باشد.(r=0/998) در شکل 1 منحنی کالیبراسیون و معادله خط مربوطه(C0/146+0/651= نشر فلورسانس) نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی تعیین مقدار ماده مؤثره در قرص های 10 میلی گرمی نشان می دهد که میانگین مقدار ماده مؤثره ایمی پرامین هیدروکلراید در فرآورده های آزمون و مرجع به ترتیب برابر 99/1 و 99/3 درصد می باشد(جدول 1) و در مورد قرص های 50 میلی گرمی میانگین درصد ماده مؤثره برای فرآورده های آزمون و مرجع به ترتیب برابر 102/2 و 101/8 است(جدول2). مقادیر به دست آمده در محدوده تعیین شده در فارماکوپه USP(93 تا 107 درصد) از نظر کنترل کیفی قرار دارد(7) بررسی آزمون آماری t نیز اختلاف معنی داری را بین درصد ماده مؤثره در فرآورده های آزمون و مرجع نشان نمی دهد.(p> 0/05) در جداول 1 و 2 میانگین، انحراف استاندارد و درصد ضریب تغییرات حاصل از پنج بار تکرار آزمایش در قرص های آزمون و مرجع ارائه شده است.

**جدول 1. درصد ماده مؤثره موجود در قرص های آزمون و مرجع (n =5)**

| فراورده<br>نتایج | قرص ایمی پرامین 10 میلی گرمی<br>(آزمون) | قرص ایمی پرامین10 میلی گرمی<br>(مرجع) |
|---|---|---|
| میانگین(٪) | 99/1 | 99/3 |
| انحراف استاندارد | 3/1 | 2/2 |
| درصد ضریب تغییرات | 3/1 | 2/2 |

**جدول 2. درصد ماده مؤثره موجود در قرص های آزمون و مرجع (n =5)**

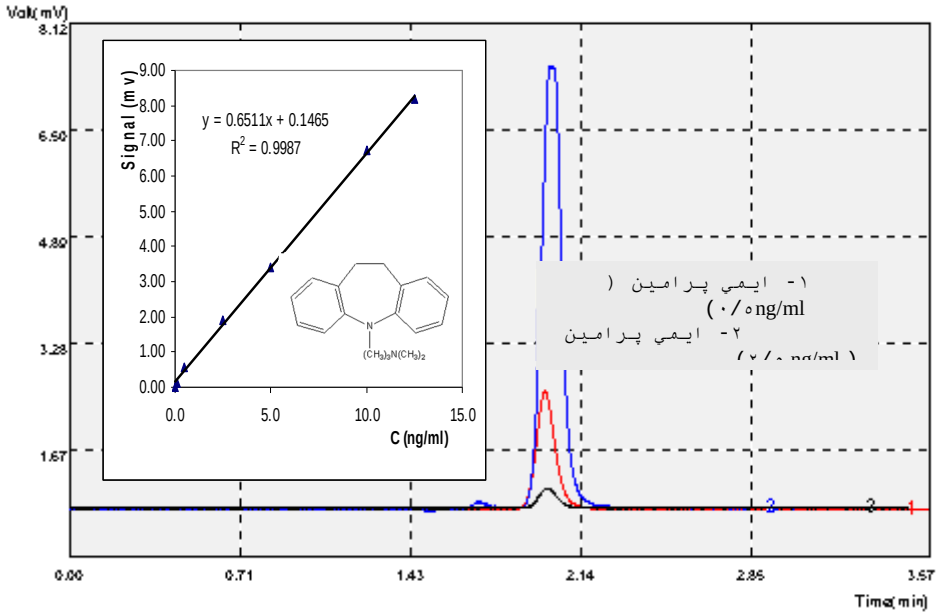
| فراورده<br>نتایج | قرص ایمی پرامین 50 میلی گرمی<br>(آزمون) | قرص ایمی پرامین50 میلی گرمی<br>(مرجع) |
|---|---|---|
| میانگین(٪) | 102/2 | 101/8 |
| انحراف استاندارد | 3/7 | 2/1 |
| درصد ضریب تغییرات | 3/6 | 2/0 |

در جداول3 میانگین، انحراف استاندارد و درصد ضریب تغییرات حاصل از ده بار تکرار آزمایش تعیین میزان یکنواختی در قرص های 10 و 50 میلی گرمی ارائه شده است. شرط قبولی این فرآورده ها از نظر کنترل کیفی این است که در قرص های 10 میلی گرمی وزن ایمی پرامین هیدروکلراید موجود در 10 قرصی که آزمایش شده اند نباید کمتر از 9/3 یا بیش از 10/7 میلی گرم(93 تا 107 درصد) باشد و میزان درصد ضریب تغییرات باید کمتر از 6 درصد باشد. در مورد قرص های 50 میلی گرمی، وزن ایمی پرامین هیدروکلراید موجود در 10 قرصی که مورد آزمایش قرار گرفته نباید کمتر از 46/5 یا بیش از 53/5 میلی گرم باشد و در این مورد نیز درصد ضریب تغییرات باید کمتر از 6 درصد باشد. نتایج گزارش شده در جدول 3 حاکی از قبولی این فرآورده ها از نظر کنترل کیفی می باشد.

**جدول 3. نتایج حاصل از تعیین میزان یکنواختی ماده مؤثره در هر قرص 10 و 50 میلی گرمی**

| قرص | قرص ایمی پرامین 10 میلی گرمی | قرص ایمی پرامین 50 میلی گرمی |
|---|---|---|
| 1 | 9/94 | 48/97 |
| 2 | 9/89 | 49/10 |
| 3 | 10/17 | 50/55 |
| 4 | 9/97 | 51/10 |
| 5 | 9/93 | 50/11 |
| 6 | 9/91 | 49/31 |
| 7 | 10/17 | 49/81 |
| 8 | 9/89 | 50/83 |
| 9 | 10/15 | 49/69 |
| 10 | 10/18 | 50/39 |
| میانگین (mg) | 10/04 | 49/90 |
| انحراف استاندارد (S.D.) | 0/13 | 0/67 |
| درصد ضریب تغییرات(CV%) | 1/29 | 1/34 |
| انحراف مجاز (mg) | 0/7 | 3/5 |
| حدبالایی (mg) | 10/18 | 51/10 |
| حدپائینی(mg) | 9/89 | 48/97 |

منحنی های استاندارد مربوط به تعیین مقدار ایمی پرامین در فرمولاسیون دارو توسط سیستم کروماتوگرافی نشان می دهد که استفاده از خاصیت فلورسانس ایمی پرامین و به کارگیری تکنیک کروماتوگرافی با آشکارسازی فلورسانس، حساسیت آنالیز را تا مقدار 0/2 نانوگرم بر میلی لیتر بهبود می بخشد. (شکل 1)




**شکل 1. کروماتوگرام و منحنی کالیبراسیون ایمی پرامین مربوط به تعیین مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی ایمی پرامین در قرص های 10 و 50 میلی گرمی (شرایط دستگاهی شامل ستون: PRP-1 (4/1 × 150 mm ، 10 µm) در دمای 40°C+ ، فاز متحرک: استونیتریل: محلول بافر فسفات (62:38 در pH =4/0) با سرعت جریان 1/5 ml/min، طول موج تهییج: 250 نانومتر و طول موج نشر فلورسانس: 360 نانومتر)**

بررسی نتایج حاصل از تغییرات درون روزی و بین روزی روش راه اندازی شده نیز که در جداول 4 و5 نشان داده شده حاکی از آنست که از مقدار قابل قبول درصد تغییرات برخوردار می باشد.

## بحث و نتیجه گیری

معمولاً در واحدهای تحقیق و توسعه شرکت های داروسازی پس از تحقیق و ارائهٔ فرمولاسیون های مختلف برای یک دارو به منظور رسیدن به اثر درمانی مطلوب و کاستن معایب درمانی، کنترل فیزیکی و شیمیایی فرآورده دارویی در طی مراحل تولید و بررسی اثرات بیولوژیک آن اهمیت فراوانی دارد. نظر به اهمیت و گستردگی مصرف ایمی پرامین و ضرورت کنترل دارو از نظر مقدار ماده مؤثره و میزان یکنواختی و ضرورت کنترل دقیق دارو توسط مراکز نظارتی در عرصه توزیع، پس از راه اندازی و معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز فلورسانس، آزمایشات کنترل کیفی دارو انجام شد. بررسی منحنی کالیبراسیون روش تجزیه ای راه اندازی شده نشان می دهد که با آشکارسازی فلورسانس می توان ایمی پرامین را در فرمولاسیون دارو با حد تشخیص 0/15 نانوگرم در میلی لیتر تعیین مقدار نمود. همچنین دقت و صحت روش تجزیه ای مورد استفاده در آزمایشات درون روزی و بین روزی مورد بررسی قرار گرفت و همانطور که در جداول 4 و 5 نشان داده شده، میانگین، انحراف استاندارد، درصد ضریب تغییرات و درصد خطا از مقادیر قابل قبولی برخوردار هستند. نتایج آزمایشات تعیین مقدار مادهٔ مؤثره و بررسی یکنواختی آن در هر فرآورده نشان می دهد که این فرآورده ها معیارهای ذکر شده در فارماکوپه را دارا هستند. داده های حاصل از این مطالعه حاکی از آنست که قرص های ایمی پرامین 10 میلی گرمی ساخت شرکت داروسازی لرستان و قرص های 50 میلی گرمی ساخت شرکت داروسازی سبحان که با نمونه استاندارد مورد مقایسه قرار گرفته اند از نظر آزمایشات درون بدنی هم ارز هستند. بررسی نتایج مربوط به معتبرسازی روش تجزیه ای نشان می دهد که این روش از حد تشخیص پایین، دامنه خطی نسبتاً گسترده، دقت و صحت کافی، توانمندی دستیابی به جداسازی روی پایه پلیمری ستونPRP در زمان کوتاه و از استحکام کافی برخوردار است به گونه ای که استفاده از آن را می توان برای تعیین مقدار غلظت های پلاسمایی دارو و انجام مطالعات سینتیک دارو پیشنهاد نمود.

**جدول 4. نتایج بررسی تغییرات درون روزی**

| غلظت (ng/ml) | غلظت های محاسبه شده (ng/ml) | | | | | | | | | میانگین (ng/ml) | انحراف استاندارد (ng/ml) | درصد ضریب تغییرات | درصد خطا |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | آزمایش 1 | | | آزمایش 2 | | | آزمایش 3 | | | | | | |
| 0/1 | 0/09 | 0/12 | 0/11 | 0/08 | 0/12 | 0/11 | 0/09 | 0/11 | 0/09 | 0/110 | 0/011 | 10/0 | 10/0 |
| 0/5 | 0/58 | 0/45 | 0/53 | 0/57 | 0/51 | 0/54 | 0/43 | 0/49 | 0/53 | 0/511 | 0/051 | 9/9 | 2/2 |
| 2/5 | 2/68 | 2/49 | 2/39 | 2/63 | 2/60 | 2/53 | 2/45 | 2/60 | 2/70 | 2/563 | 0/104 | 4/0 | 2/5 |
| 12/5 | 12/95 | 13/30 | 12/40 | 11/59 | 12/77 | 12/86 | 11/88 | 12/69 | 13/50 | 12/661 | 0/621 | 4/9 | 1/2 |

**جدول 5. نتایج بررسی تغییرات بین روزی**

| غلظت (ng/ml) | غلظت های محاسبه شده (ng/ml) | | | | | | | | | میانگین (ng/ml) | انحراف استاندارد (ng/ml) | درصد ضریب تغییرات | درصد خطا |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | آزمایش 1 | | | آزمایش 2 | | | آزمایش 3 | | | | | | |
| 0/1 | 0/10 | 0/13 | 0/11 | 0/09 | 0/11 | 0/10 | 0/11 | 0/10 | 0/11 | 0/107 | 0/011 | 10/5 | 6/7 |
| 0/5 | 0/55 | 0/58 | 0/47 | 0/54 | 0/61 | 0/45 | 0/52 | 0/47 | 0/61 | 0/531 | 0/063 | 11/8 | 6/2 |
| 2/5 | 2/58 | 2/60 | 2/41 | 2/65 | 2/81 | 2/51 | 2/60 | 2/88 | 2/29 | 2/593 | 0/181 | 6/9 | 3/7 |
| 12/5 | 14/10 | 12/90 | 12/80 | 12/81 | 12/40 | 11/49 | 13/26 | 11/88 | 12/69 | 12/708 | 0/764 | 6/0 | 1/6 |

***References***


۱-Reynolds, James D.F. Martindate The Extra Pharmacopeia. ۳۱th ed., Vol.۱, pp.۳۱٦-۳۱۷, London:Royal Pharmaceutical Scociety, ۱۹۹٦.

۲-Yoo, S.D. and Halladya, J.W., Fincher, T.K. and Dewes, J.J., Rapid Microsample Analysis of Imipramine and Desipramin by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography wih Ultraviolet Detection, J. of Chromatography, Biomed. Appl: ٦٦٨،۳۳۸-۳٤۲, ۱۹۹٥.

۳-Pommier F, Sioufi A, Godbillon J., Simultaneous determination of imipramine and its metabolite desipramine in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection, J. Chromatogr. B Biomed Sci Appl. ۱۹۹۷, ۷۰۳ (۱-۲): ۱٤۷-٥۸

٤-Rodriquez Flores J., Berzas Nevado J.J., Contento Salcedo A.M., Cabello Diaz M.P., Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of tamoxifen, imipramine and their main metabolites in urine, ۲۰۰٥, ٦٥:۱٥٥-۱٦۲.

٥-Ivandini T. A., Sarada B.V., Terashima C., Rao T.N., Tryk D.A., Ishiguro H., Kubota Y. and Fujishima A. Electrochemical detection of tricyclic antidepressant drugs by HPLC using highly boron-doped diamond electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry, ۲۰۰۲, ٥۲۱:۱۱۷-۱۲٦.

٦-Norouzi P., Ganjali M.R., Akbari-adergani B., Sub-second FFT continuous stripping voltammetric technique as a novel method for pico-level monitoring of imipramine at Au microelectrode in flowing solutions, Acta Chim. Slov., ۲۰۰٦, ٥۳:٤۹۹-٥۰٥.

۷-Anonymous, The United State Pharmacopoeia, U.S.P. ۲۳& N.F.۱۸, Vol(۱&۲), PP.۷۹٤-۹٦،۱۷۹۱-۱۷۹۲. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, ۱۹۹٥.

۸-Clark B.J., Fras T., Russell M.A., UV Spectroscopy: Techniques, Instrumentation & Data Handling. Chapman & Hall, First ed. ۱۹۹۳.

۹-Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., Analytical Chemistry, ۷th ed., ۱۹۹۹.

# Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Assay And Content Uniformity of Imipramine in 10 and 50 mg Tablets

*Akbari-adergani B *, Adib N, Hajimehdipoor H*

**(Received: 17 Jun, 2009 Accepted: 24 Jul, 2009)**

## Abstract

*Introduction*: Imipramine is a widely prescribed tricyclic antidepressant. However, the routine control of this drug in assay and content uniformity requires a highly sensitive and precise analytical attitude. The aim of this research was to perform assay and content uniformity in tablet samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.

*Materials and Methods:* As, nowadays, prescription of imipramine tablets is increasing, it seems necessary to improve their quality control. So, 10 and 50 mg tablets of imipramine were randomly collected from market retailers. The chemical structure and inherent fluorescence of imipramine were a good motivation for performing assay and content uniformity in tablet samples by developing and validation of high performance liquid chromatography and fluorescence detection. These experiments were compared with imipramine standards.

*Findings:* The results showed that imipramine could be determined by high performance liquid chromatography with fluorescence detection within 2 minutes. The detection limits(signal-to-noise ratio=3) for the examined antidepressant was 0,2ng/ml. Assay and content uniformity of the tested products met the requirements stated in accredited pharmacopoeias. Based on the statistical t-test, there is no significant difference between the test and reference products. ($p>0,05$)

*Discussion & Conclusion:* The results of this study demonstrated that the developed and validated HPLC method with sensitive florescence detection can be used in assay and content uniformity of imipramine. From intra- and inter-day coefficient of variations, it can be concluded that this method have a high accuracy and precision. Very low detection limit, wide dynamic range, appropriate accuracy and precision, ability in separation on a polymeric based PRP column in a short time with sufficient robustness are, certainly, the positive aspects of the developed and validated method.

*Key words:* imipramine, fluorescence detection, liquid chromatography, assay, content uniformity

*Food and Drug Laboratory, Research Center (FDCRL), Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran*
**(corresponding author)*