

التحقق من نسبة متخايلي مركبات البروفن في مستحضرات مستعملة في سورية بتقانة HPLC الكيرالية ومتطلباتها التقنية

غيداء الخير (1) يحيى قدسي (2) حسين خضر (3)

الملخص

حُدِّدَت نسب متخايلات الكيتوبروفن والنابروكسن والفلوريبيروفن والايبيروفن وحمض التيابروفن، بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المزودة بكاشف فوق بنفسجي مع طور ساكن كيرالي من كريات الأميلوز، وطور متحرك من الهكسان والايثانول وإضافة من حمض ثلاثي فلور الخل. بينت النتائج أن البروفينات، الموجودة في عينات مواد الأدوية المتداولة في سورية، توافق، باستثناء النابروكسن، خليطاً راسيمياً متساوي النسب من المتخايلين (S و R)، ومطابقة لمثيلاتها في المستحضرات الأجنبية. توبعت بعض هذه المركبات في عينات دم الإنسان، بتعيين (تحديد) نسب المتخايلين، مما يسمح بتطبيق طريقة التحليل في دراسات التوافر الحيوي للمتخايلات.

الكلمات المفتاحية: البروفينات السورية، كيتوبروفن، نابروكسن، المتخايلات (الانانتيوميرات)، الخلائط الراسيمية، الكروماتوغرافيا السائلة الكيرالية، كريات الأميلوز، التوافر الحيوي.

- (1) قسم الكيمياء_ كلية العلوم_ جامعة دمشق / معهد بحوث الصناعات الصيدلانية والكيميائية_ مركز الدراسات والبحوث العلمية_ دمشق، سورية.
(2) أسنّاذ_ قسم الكيمياء_ كلية العلوم_ جامعة دمشق.
(3) باحث_ معهد بحوث الصناعات الصيدلانية والكيميائية_ مركز الدراسات والبحوث العلمية_ دمشق، سورية.

Realization of profen enantiomeric ratios in Syrian substances using Chiral High performance liquid chromatography HPLC and their technical Requirements

G. Alkhayer⁽¹⁾

Y. KOUDSI⁽²⁾

H. KHUDR⁽³⁾

ABSTRACT

Enantiomeric ratios of some Syrian drug profens, were determined using high performance liquid chromatography HPLC with UV detector, amylose carbamate as chiral stationary phase, and mobile phase of n-hexane (90): 2-propanol (10): TFA (0.1) (v/v). The study was carried out on ketoprofen, naproxen, flurbiprofen, ibuprofen and tiaprofenic acid, and the results revealed racemic mixtures of R and S enantiomers of Syrian profens; except naproxen case. Counterpart profens from foreign companies gave similar results. Furthermore, enantiomers ratios were determined in human blood samples, which enables the method to be applied in bioavailability studies.

Key words: Syrian Profens, enantiomers, racemic mixtures, chiral liquid chromatography, Amylose carbamat, bioavailability, ketoprofen, naproxen.

(1) Department of chemistry_ Faculty of sciences_ Damascus university, Syria / Research Institute for Pharmaceutical and Chemical Industries_ Scientific Studies and Research Centre (SSRC)_ Damascus, Syria.

(2) Department of chemistry_ Faculty of sciences_ Damascus university_ Syria.

(3) Research Institute for Pharmaceutical and Chemical Industries_ Scientific Studies and Research Centre (SSRC)_Damascus, Syria.

1- المدخل:

يُطلق اسم متخاليلين (enantiomers مثلى متخاليل) على متماكين أحدهما خيال الآخر، بحيث لا تنطبق بنية أحدهما على بنية خياله في مرآة مستوية [1]. ويلحق بخصائص كل منهما الصفة الكيرالية (الكيفية chirality). بينت كثير من النشرات العلمية أن الفعل الحيوي للشكل الصيدلاني وحركيته في الكائن الحي (in vitro) يتأثران بالتشكيل (configuration) الفراغي لجزيئات المادة الفعالة فيزيولوجياً [4,3,2]، وأن الأثر قد يكون خطيراً جداً. على سبيل المثال، المتخاليل R لمستحضر التاليدوميد (Thalidomide) الذي استعمل في ستينيات القرن العشرين في علاج غثيان (nausea) النساء الحوامل، هو المسؤول عن الفعل العلاجي (sedative) للغثيان، في حين أن المتخاليل S يسبب أجنة مشوهة (ماسخة teratogen)، ثم لوحظت نتائج أخرى مماثلة، يلخص بعضها الجدول 1- [6,5].

الجدول (1): اختلاف الفعالية البيولوجية لبعض المركبات الإناثيوميرية (المتخالية)

تبعاً لتشكيلها الكيرالي.

المستحضر الكيرالي	فروقات فعالية المتخاليلات
Albuterol	(R)-albuterol موسع قصبي في حين أن (S)-albuterol له تأثيرات مثيرة للالتهاب
Ethambutol	(S,S) عميل كايح للسل (tuberculostatic) ويسبب متخاليه (R,R) العمي
Penicillamine	يستعمل المتخاليل S مضاداً لالتهاب المفاصل في حين أن للمتخاليل R تأثيرات سمية
Propoxyphene	يستعمل α -L-isomer مضاداً للسعال في حين يستعمل الشكل α -D-isomer مسكناً للألم
Ketoprofen	المتخاليل S أو (dex) أكثر فعالية بعدة مرات من المزيح الراسيمي
Nicotine	(-)-nicotine أكثر سمية بكثير من (+)-nicotine

من المنطقي إذاً، من وجهة نظر فلسفة البحث العلمي ومنهجيته، أن يتوجه الباحثون الكيميائيون نحو الاهتمام بتطوير طرائق الاصطناع الكيميائي العضوي الانتقائي (selective organic chemical synthesis) [9,8,7] للمتخاليلات، فضلاً عن تطوير طرائق فصلها من خلائطها الراسيمية (racemic mixtures)، وعزلها، تحليلياً وتحضيرياً، بطرائق عدة كيميائية أو إنزيمية أو كروماتوغرافية [11,10].

كان هدف الدراسة تحديد نسب متخاليلات بعض مركبات البروفن (البروفانات) التي تدخل في مواد المستحضرات الدوائية المستعملة في سورية أو في صناعتها، سواء كانت المادة أولية موردة للصناعة أم في شكلها الصيدلاني، وكذلك في عينات حية مأخوذة من الدم البشري، ومقارنة هذه النسب بتلك الناتجة من تحليل المستحضر الدوائي الموافق المستورد.

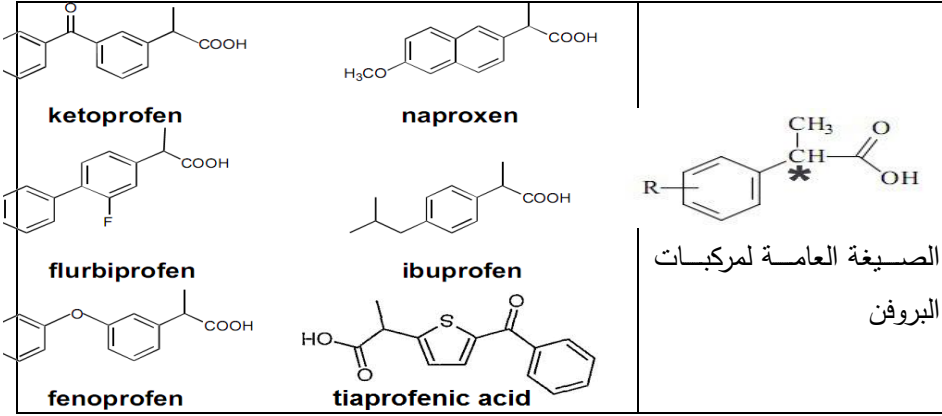
يسهم تحقيق هدف الدراسة في توطين طرائق عالمية لتحليل متخايلات البروفنات وفهم آلية الفصل الكيرالي، وتناول شروط هذا الفصل بما يسمح بالتنبؤ بالإجراءات التي تسمح بفصل البروفنات تبعاً لبنيتها الجزيئية في الشروط المطبقة.

2- فصل المتخايلات (enantio-separation):

يصعب فصل المتخايلات بالطرائق التقليدية بسبب تطابق عدد كبير من خواصها الفيزيائية، على نقيض المركبات الدياستيرية (deastriomeric compounds) (غير المتخايلة). من جهة أخرى، يختلف السلوك الكيميائي للمتخايلات عند تفاعلها مع المركبات غير المتناظرة، وهنا يكمن اختلاف التأثير الفيزيولوجي للمتماكبات R عن متماكباتها S؛ ممّا يمكن من استخدام هذا المبدأ في فصل المتخايلات وعزلها عن بعضها من خلاطها الراسيمية. فتعتمد طرائق فصل المتخايلات على تحويلها إلى مركبات دياستيرية (دائمة أو مؤقتة) بتفاعلها مع بيئة (غير متناظرة) كيرالية (chiral environment) معينة [10,13]. يمكن للبيئة الكيرالية المناسبة في طرائق الكروماتوغرافية السائلة أن تكون الطور الساكن (stationary phase) (العمود الكروماتوغرافي)، أو الطور المتحرك (mobile phase) .

3- مركبات البروفن (البروفنات Profens):

مركبات البروفن هي مركبات أروماتية (عطرية) مشتقة من حمض البروبيونيك (2-APA) (2-Aryl Propionic Acid) تشكل جزءاً مهماً من أدوية الالتهاب غير الستيرويدية (NSAIDs) (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)، تُستعمل في علاج أمراض المفاصل والروماتيزم (rheumatism) [14,15]. يبيّن الشكل-1 الصيغة للعامة للبروفنات، إذ يؤدي وجود ذرة كربون كيرالي (غير متناظر C^*) في الموقع 2 بالنسبة إلى كربون الكربوكسيل، إلى بنيتين فراغيتين تشكيليتين للمتخايلين R و S. إن المتخايل S هو المركب الفعّال حيوياً (biologically active) وذو التأثير الفيزيولوجي، ومع ذلك فإن بعضاً من مركبات البروفن لا يزال يسوّق الخليط الراسيمي منه، مثل الكيتوبروفن والفلوربيروفن والايوبروفن والفينوبروفن وحمض التيابروفن. على نقيض النابروكسن المسوق دوائياً وحيد المتخايل (single-enantiomer drug)، لأن لخياله ذي التشكيل R تأثيرات جانبية سيئة في الكبد. وتختلف متخايلات البروفنات بتوافرها الحيوي في الكائن الحي باختلاف نوع البروفن وتشكيله الفراغي [16,17].



الشكل (1): صيغ بعض حموض البروبيونيك الأروماتية (العطرية) (2-APA) ، وهي من مركبات البروفن المستعملة في المستحضرات الصيدلانية لأدوية مضادات الالتهاب غير ستررويدية.

4- الطرائق المستعملة لفصل متخايلات مركبات البروفن (2-APA):

4-1- الطرائق "التحليلية": يستعمل عدد من الطرائق "التحليلية" لفصل متخايلات مضادات الالتهاب 2-APA منها الرحلان الكهربائي والكروماتوغرافيا الغازية والكروماتوغرافيا السائلة [10-13]. وأصبحت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء من أحدث الطرائق المستعملة لتحليل متخايلات البروفن، سواء كانت على شكل مستحضرات صيدلانية، أو في عينات من الأوساط الحية [18-26].

4-2- البيئات الكيرالية: تُعدُّ السكاكر الأصلية (native saccharides) أو المعدلة (modified) من البيئات الكيرالية الشائعة [18, 21-24]. التي في مقدورها تفريق البروفنات. ترجع قدرة التفريق (resolution) إلى فرق قوة الأفعال المتبادلة (interactions) بين المتخايل من جهة والبيئة الكيرالية من جهة أخرى، فتتحول المتخايلات إلى مركبات دياستيرية مؤقتة مختلفة القوة تؤثر في أزمنة انحباسها (retention time) ومن ثمَّ في تفريقها. وقد توسعت دراسة الأطوار الثابتة من نوع كاربامات الأميلوز (amylose carbamate) أو كاربامات السيللوز (cellulose carbamate)، لتشمل التأثيرات المتبادلة للجسور الهيدروجينية أو للتفاعلات من النمط π - π للمجموعات الأروماتية [27].

4-3- الطرائق المتوافرة في الأدبيات العلمية: يلخص الجدول 2 المتطلبات المهمة لتحليل بعض البروفنات، كما وردت في بعض الأدبيات العلمية المعاصرة، لتكون منطلق الدراسات التجريبية الحالية.

الجدول (2): متطلبات تحليل متخايلات بعض البروفنات، باستعمال الكروماتوغرافيا

السائلة الكيرالية.

معدل التدفق ml/min	الطور المتحرك	العمود الكيرالي				البروفن المحلل (المرجع)
		قطر الحبيبة μm	القطر mm	الطول mm	النمط	
1	هكسان : إيتانول (20:80)	20	4.6	250	CC أو AC	الكتوبروفن [21]
1	هكسان : إيتانول : حمض النمل (0.1:8:92)	5	4.6	250	CC أو AC	نابروكسن [22]
1	هكسان : إيزوبروبانول : حمض النمل (0.1:8:92)	5	4.6	250	CC أو AC	إيبوروفن [22]
1	هكسان : إيزوبروبانول : حمض النمل (0.1:5:95)	5	4.6	250	CCCh	كتوبروفن [22]
1	هكسان : إيزوبروبانول : حمض النمل (0.1:5:95)	5	4.6	250	CCCh	كتوبروفن [22]
2	هبتان : إيزوبروبانول : حمض ثلاثي فلور الخل (0.1:10:90)	3	4.6	150	AC	كتوبروفن [28]

CC: Cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate), AC: Amylose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate), CCCh: Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenyl carbamate)

5- مفهوم الزيادة (أو الفائض) من متخايل:

يُعرف فائض متخايل (enantiomeric excess) لخليط من متخايلين [1] بأنه النسبة المئوية لفرق تركيز المتخايلين مقسوماً على مجموع تركيزيهما مأخوذاً بالقيمة المطلقة كما توضّحه العلاقة 1.

$$\text{Enantiomeric excess} = \% \text{ ee} = \frac{R-S}{R+S} * 100 \quad \text{العلاقة 1:}$$

6- عامل التفريق:

يتناسب عامل التفريق (resolution factor) الكروماتوغرافي [29] طرداً مع الفرق بين زمني (مقدراً بالدقيقة) انحباس مادتين في العمود الكروماتوغرافي R_{t1} و R_{t2} ، وعكساً مع مجموع عرضي القمتين (مقدراً بالدقيقة) w_1 و w_2 الممثلتين لهما عند نصف ارتفاع كل قمة، ويعطى بالعلاقة 2 وليس له واحدة.

$$\text{Resolution factor of two peaks} = R_s = 2(R_{t2} - R_{t1}) / (w_1 + w_2) \quad \text{العلاقة 2:}$$

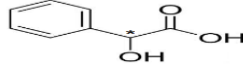
الجزء العملي:

7- الأجهزة والمواد والأدوات:

7-1- التجهيزات: استعمل جهاز HPLC (Shimadzu) مزود بكاشف مصفوفة الديدوات الضوئية UV Photo-Diod Array detector وعمود Amycoat (Kromasil®) من النمط كربامات الأميلوز (طوله 25 cm ونصف قطره الداخلي 4.6 mm وقطر حبيبات حشوته 5 µm).

7-2- المواد المستعملة: المذيبات موردة بدرجة نقاوة HPLC (grade) ، نظامي الهكسان (n-Hexane) من شركة (Chem Lab)، والإيزوبروبانول (Isopropanol) من شركة (Readeldehain). الإيتانول وحمض ثلاثي فلور الخل وحمض الخل وثلاثي فلور البور من شركة (Merck). واستعمل حمض المانديليك كمعيار مقارنة يُساعد في فهم دور الروابط (الجسور) الهيدروجينية في فصل المتخاليات.

حمض المانديليك



8- العينات:

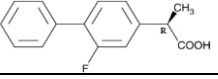
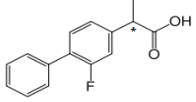
بلغ عدد العينات التي تناولها هذا العمل 26 سناً وعشرين عينة جمعت من 14 مصدراً محلياً خارجياً، من شركات للمواد الكيميائية أو من شركات للأدوية موضحة في الجداول من 3 إلى 8.

الجدول (3): العينات الست من مادة الكيتوروفن (KTP)، ومواصفاتها ومصدرها.

مواصفات العينات ومصادر الحصول عليها			البروفن (المادة الفعالة 2-APA)	
المصدر المحلي والخارجي	المواصفات بحسب المصدر	رقم العينة	الصيغة	الاسم
Sigma -Aldrich	مادة نقية للمتخايل S	3		الكيتوروفن S
Sigma -Aldrich	مادة نقية ≤ 98%	4		الكيتوروفن (R+S)
Sigma -Aldrich	مادة نقية ≤ 98%	5*		كيتوروفن (%ee _S =19%)
شركة اوبري (سورية)	مادة أولية نقاوة ≤ 99%	1		كيتوروفن
شركة ميديكو (سورية)	مادة أولية نقاوة ≤ 99%	2		كيتوروفن
شركة اوبري (سورية)	محفظات عيار 50 mg	6		كيتوروفن
شركة ميديكو (سورية)	مضغوطات عيار 50 mg	7	كيتوروفن	
Sanofi-avantis	مضغوطات عيار 100 mg	8		

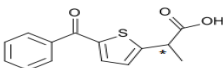
* حضرت العينة 5 بإغنائها بالمتخايل S بخلط كميتين من العينتين 3 و 4 وفق العلاقة 1 انظر الفقرة 9-3.

الجدول (4): العينات الخمس من مادة فلوريبيروفن (Fbp)، ومواصفاتها ومصدرها.

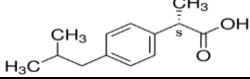
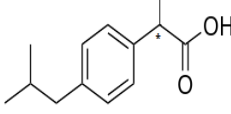
مواصفات العينات ومصادر الحصول عليها			البروفن (المادة الفعالة 2-APA)	
المصدر المحلي والخارجي	المواصفات بحسب المصدر	رقم العينة	الصيغة	الاسم
Sigma –Aldrich	مادة نقية (من المتخالي R)	10		فلوريبيروفن R
Sigma –Aldrich	مادة نقية $\leq 98\%$	#11		فلوريبيروفن (%ee _R) (=20%)
شركة الفارس (سورية)	مادة أولية نقاوة $\leq 99\%$	9		فلوريبيروفن
شركة الفارس (سورية)	مضغوطات عيار 100 mg	12		فلوريبيروفن
شركة كيمي (سورية)	مضغوطات عيار 50 mg	13		فلوريبيروفن

حضرت العينة 11 بإغنائها بالمتخالي R بخلط كميتين من العينتين 9 و 10 وفق العلاقة 1 انظر الفقرة 9-3.

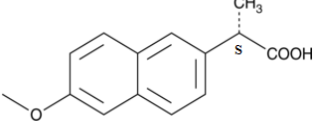
الجدول (5): العينات الثلاث من مادة حمض التيابروفن (Tia)، ومواصفاتها ومصدرها.

مواصفات العينات ومصادر الحصول عليها			البروفن (المادة الفعالة 2-APA)	
المصدر المحلي والخارجي	المواصفات بحسب المصدر	رقم العينة	الصيغة	الاسم
شركة اوبري (سورية)	مادة أولية نقاوة $\leq 99\%$	14		حمض التيابروفن
شركة اوبري (سورية)	مضغوطات عيار 300 mg	15		حمض التيابروفن
Sanofi-avantis	مضغوطات عيار 300 mg	16		حمض التيابروفن

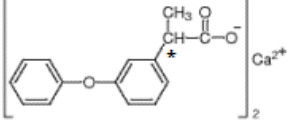
الجدول (6): العينات الست من مادة الايبوبروفن (Ibu)، ومواصفاتها ومصدرها.

مواصفات العينات ومصادر الحصول عليها			البروفن (المادة الفعالة 2-APA)	
المصدر المحلي والخارجي	المواصفات بحسب المصدر	رقم العينة	الصيغة	الاسم
Sigma –Aldrich	مادة نقية للمتخالي S	19		الايبيروفن (S)
شركة الفارس/ سورية	مادة أولية نقاوة $\leq 99\%$	17		ايبيروفن
شركة قنواقي/ سورية	مادة أولية نقاوة $\leq 98\%$	18		ايبيروفن
شركة ألفا / سورية	مضغوطات عيار 400 mg	20		ايبيروفن
Abbott	مضغوطات عيار 600 mg	22		ايبيروفن
شركة دياموند فارما/ سورية	ظرف مسحوق عيار 600 mg	21		ايبيروفن

الجدول (7): العينات الثلاث من مادة النابروكسن (Nap)، ومواصفاتها ومصدرها.

مواصفات العينات ومصادر الحصول عليها			البروفن (المادة الفعالة 2-APA)	
المصدر المحلي والخارجي	المواصفات بحسب المصدر	رقم العينة	الصيغة	الاسم
شركة فارماسير/ سورية	مادة أولية نقاوة $\leq 99\%$	23		نابروكسن
شركة فارماسير/ سورية	مضغوطات عيار 500 mg	24		نابروكسن
شركة مسعود وبحري/ سورية	مضغوطات عيار 500 mg	25		نابروكسن

الجدول (8): عينة مادة الفنوبروفن (Fen)، ومواصفاتها ومصدرها.

مواصفات العينات ومصادر الحصول عليها			البروفن (المادة الفعالة 2-APA)	
المصدر المحلي والخارجي	المواصفات بحسب المصدر	رقم العينة	الصيغة	الاسم
Sciencex	مضغوطات عيار 300 mg	26		فنوبروفن ملح كالمسيوم

9- الشروط التجريبية:

1-9- تحضير الطور المتحرك: يُحضّر من نظامي الهكسان والايثوبروبانول بالنسبة الحجمية (10:90) ويضاف، بحسب التجربة، حمض الخل أو حمض ثلاثي فلور الخل بتركيز معينة.

2-9- تحضير العينات للتليل: تحضر العينات بتركيز نحو 0.08 mg/ml إذ أُخذت وزنة تقريبية (8 mg) من كل مادة، ومددت بالإيثانول إلى 10ml، ثم أخذ حجم 0.5ml ومدد إلى 5ml بالإيثانول أيضاً. ترشح المحاليل عند اللزوم على مرشح $0.20\mu\text{m}$.

3-9- تحضير العينات التي تحتوي على فائض من أحد المتخاليلين: تم الحصول على العينة 5 (الجدول 3) من خلط كمية 220mg من العينة الراسيمية (أي تحوي 110mg R و 110mg S) مع كمية 50mg من العينة 3 ذات التشكيل S للحصول على فائض هو تقريباً $ee_S=19\%$ وفقاً للعلاقة 1، كما يأتي:

$$ee_S = \frac{(R_{KTP} - S_{KTP})}{(R_{KTP} + S_{KTP})} * 100 = \frac{(110 - (110 + 50))}{(110 + (110 + 50))} * 100 = 18.5\%$$

وبأسلوب مشابه حضرت العينة 11 (الجدول 4) من الفلوربيروفن إذ $ee_R = 20\%$ تقريباً.

$$Fbp(R)ee\% = \frac{(R_{Fbp} - S_{Fbp})}{(R_{Fbp} + S_{Fbp})} * 100 = \frac{((100 + 50) - 100)}{((100 + 50) + 100)} * 100 = 20\%$$

10- تجارب الاختبارات الأولية على المواد الفعالة النقية وشروطها:

القسم الأول: "إيجاد الشروط التقنية الملائمة لعملية الفصل"، للحصول على فصل كيرالي يسمح بتحديد نسب المتخايلات في البروفن، والبدء بدراسة الكيتوبروفن انطلاقاً من طريقة مرجعية [28] عُدلت لتتلاءم مع الإمكانيات المتاحة من جهة وتوافر المستلزمات وتطور توريدها. فاستعمل العمود (فقرة 1-7) مع سرعة تدفق للطور المتحرك 1 ml/min بدلاً من 2 ml/min، لكن باستعمال الهكسان بدلاً من الهبتان وإضافات حمضية بتركيز مختلفة.

القسم الثاني: " دور الروابط الهيدروجينية وموقعها بالنسبة إلى الكربون الكيرالي في آلية الفصل"، لفهم الآلية وتحديد دور الروابط الهيدروجينية التي يمكن للزمر المختلفة في بنية البروفن إنشاؤها مع البيئة الكيرالية. حُوّل حمض كربوكسي البروفن، وحمض المانديليك كمعيار مقارنة، إلى الاستر الميتيلي الموافق لدراسة تأثير دور الروابط الهيدروجينية في فصل المتخايلين.

11- نتائج تجارب الاختبارات الأولية على الكيتوبروفن:

يشتمل الجدول 9 على القيم التجريبية لعامل الفصل الكروماتوغرافي R_s لمتخايلي الكيتوبروفن (S و R)، ولزمن انحباسهما على الترتيب (R_{tS} و R_{tR}) بدلالة ثلاثة تراكيز من حمض الخل وثلاثة تراكيز من حمض ثلاثي فلور الخل.

الجدول(9): قيم R_s و R_{tR} و R_{tS} لمتخايلي الكيتوبروفن بدلالة تراكيز حمض الخل

وحمض ثلاثي فلور الخل.

→ تراكيز الحمض المضاف	35	17.5	1.3 *	KTP بروفن
حمض الخل HOAC	1.9	2.1	2.5	عامل الفصل R_s ←
حمض ثلاثي فلور الخل TFA	1.4	2.0	2.3	
حمض الخل HOAC	13.6	13.6	15.1	R_{tR} زمن انحباس المتخايل R (دقيقة)
حمض ثلاثي فلور الخل TFA	17.7	15.6	13.6	
حمض الخل HAOC	15.3	15.4	17.5	R_{tS} زمن انحباس المتخايل S (دقيقة)
حمض ثلاثي فلور الخل TFA	19.3	18.6	15.6	

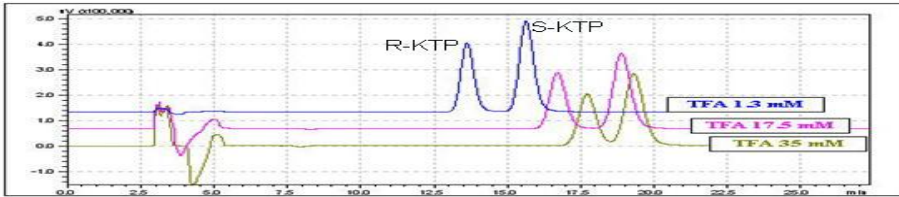
* : 1.3 ميلي مول TFA تكافئ حجماً 0.1 مل مضافة إلى 100 مل طور متحرك.

11-1- نتائج دراسة عامل الفصل الكروماتوغرافي R_s لمتخايلي الكيتوبروفن: يتبين من الجدول-9 أن عامل الفصل R_s يتناقص بزيادة تركيز HOAC، من قيمة عظمى (2.5) توافق التركيز 1.3 ميلي مول إلى قيمة دنيا (1.9) للتركيز 35 ميلي مول، ويلتقي ذلك مع نتائج استعمال التراكيز نفسها من TFA، إذ تتناقص من قيمة عظمى (2.3) للتركيز 1.3 ميلي مول إلى قيمة دنيا (1.4) للتركيز 35 ميلي مول. لم يذكر المرجع [28] نتائج تجارب مشابهة،

وأشار فقط إلى أن قيمة عامل الفصل هي 3.4، وهي قيمة أعلى من القيمة العظمى الواردة في الجدول 9- (2.5). وقد يعود سبب ذلك إلى اختلاف واحد أو أكثر من شروط العمل كالتالي تتعلق بقطر حشوة العمود وتركيب الطور المتحرك.

11-2- نتائج دراسة زمني انحباس متخايلي الكيتوبروفن R_{tR} و R_{tS} : تزايد أزمنة الانحباس R_{tR} و R_{tS} بتناقص تركيز HOAC لتبلغ قيمها العظمى عند التركيز (1.3 ميلي مول)، وهي على الترتيب 15.1 و 17.5 دقيقة. بعكس حال TFA إذ تزايدت أزمنة الانحباس R_{tR} و R_{tS} فتبلغ 17.7 و 19.3 دقيقة على الترتيب من أجل التركيز (35 ميلي مول). لم يذكر المرجع [28] نتائج تجارب مشابهة لما ورد في الجدول 9- عن زمني انحباس متخايلي الكيتوبروفن R_{tR} و R_{tS} .

11-3- التمييز التجريبي بين قمة المتخايل R وقمة المتخايل S وتحديداهما: يصعب (في HPLC) التمييز مباشرة، في حالة المزيج الراسيمي، بين القمة العائدة للمتخايل R والقمة العائدة للمتخايل S، لأن نسبة مساحتي القمتين تساوي الواحد (المركب الراسيمي خليط متساوي الجزيء من المتخايلين)، وتتغير هذه النسبة عن الواحد في حال تغير نسبتهما (نسبة الفائض من أحد المتخايلين). يبين الشكل 2- ثلاثة كروماتوغرامات تحليل للعينة 5 من الكيتوبروفن (تحتوي على فائض من المتخايل S، $ee_s=19\%$)، عند ثلاثة تراكيز من TFA. ويلاحظ في كل كروماتوغرام اختلاف مساحتي القمتين. تشير القمة الأولى (من اليسار) (R-KTP) إلى المتخايل R، وتشير القمة الثانية (S-KTP) (الأوفر، الأكبر مساحة) إلى المتخايل الآخر S. نلتقي هذه النتائج مع القيم المستخلصة من العلاقة 1، إذ عوّضت مساحتا القمتين لكل كروماتوغرام في هذه العلاقة لحساب قيمة فائض المتخايل S. فكانت القيمة المحصل عليها تحليلياً، في الحالات الثلاث، مكافئة للقيمة التجريبية التي استعملت في تحضير العينة 5 من الكيتوبروفن ($ee_s=19\%$).



الشكل (2): كروماتوغرامات تحليل العينة 5 من الكيتوبروفن $ee_s=19\%$ عند تراكيز مختلفة من حمض TFA. القمة الأولى R-KTP للمتخايل R والقمة الثانية S-KTP للمتخايل S.

يُمكن الإجراء الوارد أعلاه من تشخيص هوية كل قمة، والتمييز_ دون أدنى شك_ بين قمة المتخايل R والمتخايل S (القمة الأوفر)، ويفيد هذا الإجراء عند تناول باقي العينات الواردة في هذه الدراسة.

12- نتائج تطبيق شروط تحليل الكيتوبروفن على البروفينات الأخرى:

بيّنت التجارب الأولية السابقة أن استخدام الطور المتحرك n-Hexane:IPA:TFA (90:10:0.1) v/v (1.3 ميلي مول TFA تكافئ حجماً 0.1 مل) مناسب تماماً من حيث إنّه أقصر زمن للتحليل ويسمح بفصل كروماتوغرافي ممتاز ($R_s=2.3$) يمكن من تحديد نسب المتخايلات. طُبِّقَتْ هذه الإجراءات على عينات المواد الأولية (الخام) الموصوفة في الجداول من 3 إلى 8. ويوضّح الجدول 10 نسبة مساحتي قمتي المتخايلين وقيم عامل الفصل وأزمنة الانحباس الخاصة بهذه العينات. يلاحظ أن نتائج التحليل تتوافق مع مواصفات المادة الأولية، وأن استعمال الكيتوبروفن نموذجاً ولد نتائج فصل إيجابية لأغلب البروفينات المدروسة، وهي لم ترد في المرجع [28]. كما تلتقي نتائج تحليل النابروكسن (قمة واحدة) مع سجلات مواصفات العينة الموردة كمادة أولية، وأن المستحضر الصيدلاني يسوق على أساس احتوائه على متخايل وحيد (انظر مقدمة الدراسة). أمّا بالنسبة إلى المركب الايبوبروفن، الذي يسوق مستحضره الدوائي خليطاً راسيمياً، فلم يُفصل متخايله.

الجدول (10): نسب مساحات قمم متخايلات عينات البروفن، ومعاملات فصلها

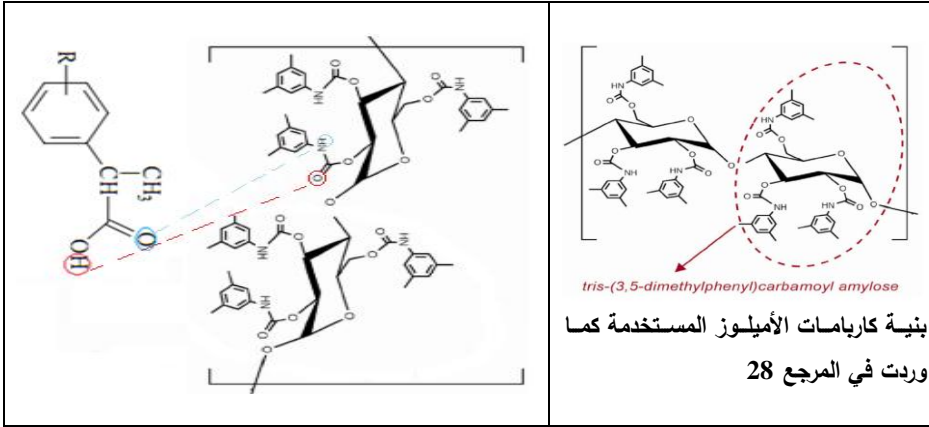
وقيم أزمنة انحباسها.

رقم العينة	اسم العينة ومواصفاتها	مواصفات عينات البروفن		زمن الانحباس (دقيقة)		عامل الفصل	%مساحتها قمتي المتخايلين
		%متخايل/العينة	R+S+(ee _s 19%)	Rt ₁	Rt ₂		
5	كيتوبروفن نقي ee _s =19%	R+S+(ee _s 19%)	13.6	15.6	2.35	0.69	
4	كيتوبروفن نقي خام (مادة أولية)	راسيمي R+S	13.6	15.6	2.35	1	
11	فلوربيروفن نقي ee _R =20%	R+S+(ee _R 20%)	6.4	8.3	3.31	1.50	
9	فلوربيروفن نقي خام (مادة أولية)	راسيمي R+S	6.4	8.3	3.31	1	
14	حمض التيايروفن نقي (مادة أولية)	راسيمي R+S	16.7	19.3	2.59	1	
23	نابروكسن نقي خام (مادة أولية)	S		11.3	لا يوجد	وحيد المتخايل	
18	ايبوبروفن نقي	-	5.1	5.1	0	لم يتم الفصل	
26	فنوبروفن *	راسيمي R+S	7.20	8.40	2.12	1	
27	حمض المانديليك النقي	راسيمي R+S	13.5	15.3	1.85	1	

* لم تتوافر عينة فنوبروفن نقية فاستخلصت بالشكل الحمضي من عينة دوائية أجنبية.

13- الروابط الهيدروجينية:

13-1- تبدي البروفنات قدرة على تشكيل (إنشاء) روابط (جسور) هيدروجينية وتفاعلات من النمط π - π للزمر الأروماتية، التي تعدّ من التأثيرات المتبادلة الأساسية، مع الطور الساكن الكيرالي، وهي مسؤولة عن تفريق المتخايلات [10]. البيئة الكيرالية المستعملة هي سكر الأميلوز المعدل عبر زمر أروماتية 3,5-dimethylphenyl مرتبطة مع هيدروكسيل حلقة السكر في ثلاثة مواقع عن طريق روابط أميدية. يمكن لزمر كربوكسيل البروفن تشكيل جسر هيدروجيني مع أميد البيئة الكيرالية؛ هيدروجين الكربوكسيل وأكسجين الأميد، وتشكيل جسر هيدروجيني آخر بين أكسجين الكربوكسيل وهيدروجين الأميد (الشكل 3). أمّا في حالة حمض المانديليك، المستعمل معياراً للمقارنة، فتنشكّل جسور هيدروجينية مشابهة لحالة البروفن بين الكربوكسيل والأميد، فضلاً عن إمكانية تشكيل جسور هيدروجينية أخرى بين زمرة الهيدروكسيل المرتبطة بالكربون غير المتناظر في الحمض وزمر الأميد في البيئة الكيرالية.

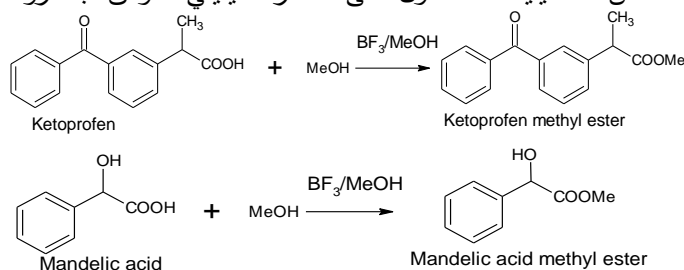


الشكل (3): بنية كاربامات الأميلوز (البيئة الكيرالية المحملة على الطور الساكن في عمود الكروماتوغرافيا السائلة المستعمل في التحليل) والجسور الهيدروجينية الممكنة بين كربوكسيل البروفن وأميد البيئة الكيرالية.

13-2- أسترة البروفنات: بهدف متابعة دور الروابط الهيدروجينية في فصل المتخايلات، أنجزت تفاعلات أسترة على كربوكسيل عدد من البروفنات الواردة في الشكل-1، باستعمال محلول ثلاثي فلور البور في الميثانول، وهو عامل يستعمل لأسترة الحموض الكربوكسيلية ذات السلاسل الكربونية من 8 إلى 24 كربون [30] والتسخين مدة 20 دقيقة عند الدرجة

60-70°C. الأمر الذي يعني استبدال هيدروجين الزمرة الكربوكسيلية بزمرة ميثيل، ومن ثم إلغاء الجسر الهيدروجيني الممكن تشكيله بين البروفن وزمر أميد البيئة الكيرالية بهذا الهيدروجين.

أدت تفاعلات أسترة ستة بروفونات (هي الكيتوبروفن والفلورالبيروفن وحمض التيابروفن والنابروكسن والايوبروفن والفينوبروفن) للحصول على ستة إسترات (الجدول 11). كما أنجز تفاعل أسترة حمض المانديليك، للحصول على الاستر الميثيلي الموافق، بالشروط نفسها.



13-3- نتائج تحليل الاسترات الميثيلية للبروفونات الستة: أنجز تحليل الاسترات الميثيلية

الستة، باستعمال طريقة تحليل البروفونات الموصوفة أعلاه. وسجلت، في الجدول، قيم عامل فصل متخاليات استنيرات البروفونات الستة، وأزمنة انحباسها بالمقارنة بموضها الكربوكسيلية. كما يبين الجدول نفسه نتائج تحليل حمض المانديليك قبل عملية الأسترة وبعدها. يتبين من الجدول أن قيم عامل فصل الاسترات الميثيلية للبروفونات أصبحت معدومة، وتناقصت إلى نحو نصف أزمنة انحباسها مقارنة بالبروفونات الكربوكسيلية الأصلية. ويعني ذلك أن الروابط الهيدروجينية التي يشكلها هيدروجين كربوكسيل البروفن مع البيئة الكيرالية، كانت أساسية في تفريق المتخاليات، وتؤدي دوراً مهماً في آلية انحباسها. تلنقي هذه النتائج، عن دور الروابط الهيدروجينية، مع تلك الواردة في الأدبيات [18]، إذ أدى تحويل البروفونات (الفيوبروفن والايوبروفن والكيتوبروفن) إلى استرات ميثيلية إلى عدم تفريق المتخاليات (الفيوبروفن والايوبروفن)، أو إلى قيمة صغيرة (الكيتوبروفن) في شروط التجربة التي اتبعتها [18].

يعرّز هذه النتيجة ما أظهره الاستر الميثيلي لحمض المانديليك، فمع تناقص أزمنة الانحباس الموافقة، إلى الثلثين تقريباً، إلا أنه بقي بالإمكان تفريق متخاليه، ولم تتعدم قيمة عامل فصله، بل انخفضت قليلاً من 1.85 إلى 1.35، ذلك لأن حمض المانديليك يستطيع، عبر زمرة الهيدروكسيل المرتبطة مباشرة بذرة الكربون الكيرالية (غير المتناظرة)، الارتباط

بروابط هيدروجينية "إضافية"، مع البيئة الكيرالية لكرامات الأميلوز. فقد كان من المناسب إجراء هذه التجربة لدعم فرضية اعتماد فصل متخايلات البروفن بشكل رئيس على هيدروجين الكربوكسيل، المرتبط بالكربون الكيرالي الذي يقوم بتوجيه جزيء البروفن باتجاه مواقع التأثير المتبادل في البيئة الكيرالية.

13-4- دور الذرات الكهربية (والتأثيرات المتبادلة $\pi-\pi$) في الجزء الأروماتي من بنية بعض البروفينات: يحوي الكيتوبروفن زمرة كربونيل وحمض التيابروفن يحوي الكربونيل وذرة كبريت والفلوربيروفن يحوي الفلور والفلوربيروفن يحوي الأكسجين في الجزء الأروماتي منها (وهنا تم تفريق المتخايلات في حالة الحمض قبل الأسترة ولم يتم بعد الأسترة). أمّا في حالة الايبوبروفن، فلا يوجد في الجزء العطري أي ذرة كهربية (هنا لم يتم تفريق المتخايلات لا قبل الأسترة ولا بعدها) (الشكل-1). بناء على ذلك، يمكن القول: إن هيدروجين الكربوكسيل، عبر جسره الهيدروجيني مع الأמיד، أساسي جداً في توجيه الجزيء نحو البيئة الكيرالية، إلا أنّ الفصل الكيرالي لا يكون محسوساً إلا بوجود عامل مساعد، وهو ذرة كهربية ضمن الجزء الأروماتي يمكنها في الوقت نفسه إنشاء جسور هيدروجينية إضافية مع البيئة الكيرالية.

بحسب نتائج الأسترة يبدو أن هذه الجسور الإضافية لا تؤدي دوراً في عملية الفصل الكيرالي، بسبب بعدها عن الكربون الكيرالي، وإنما يعود هذا الفصل إلى الرابطة الهيدروجينية المتشكلة بين هيدروجين الكربوكسيل، المرتبط بالكربون الكيرالي في البروفينات، وبين زمرة الأמיד في البيئة الكيرالية، وما يؤكد ذلك غياب هذا الفصل عند أسترة البروفينات، وبقاؤه في حالة أسترة حمض المانديك الذي يحوي زمرة هيدروكسيل إضافية مرتبطة مباشرة بالكربون الكيرالي.

13-5- دور التأثيرات المتبادلة $\pi-\pi$: يبدو أن دور التأثيرات المتبادلة $\pi-\pi$ في آلية الفصل ضعيفة أو غير رئيسية، وقد يكون لها دور في آلية الانحباس. فقد أدت عملية الأسترة إلى إحداث تغيير بنيوي على البروفينات فقط على مستوى الكربوكسيل وليس على مستوى الجزء العطري، وقد أدى هذا التغيير إلى فقدان فصل المتخايلات، ممّا دفع للاستنتاج أنه لو كان الفصل الكيرالي عائداً لهذه التأثيرات لبقى له قيمة ما بعد الاشتقاق، وهذا مخالف لما وجدناه.

الجدول (11): مقارنة قيم عامل الفصل متخايلات البروفن (وحمض المانديليك) وأزمنة انحباسها قبل عملية الأسترة وبعدها.

Rs عامل الفصل	Rt ₂ زمن الانحباس (دقيقة)	Rt ₁ زمن الانحباس (دقيقة)	عينة البروفن
2.35	15.6	13.6	كيتوبروفن نقي خام (مادة أولية)
0		7.5	الاستر الميتيلي للكيتوبروفن
3.31	8.3	6.4	فلوربيروفن نقي خام (مادة أولية)
0		4.7	الاستر الميتيلي للفلوربيروفن
2.59	19.3	16.7	حمض التيايروفن نقي خام (مادة أولية)
0		10.5	الاستر الميتيلي لحمض التيايروفن
لا يوجد		11.3	نابروكسن نقي خام (مادة أولية)
لا يوجد		5.8	الاستر الميتيلي للنابروكسن
0	5.1	5.1	ايبيروفن نقي خام (مادة أولية)
0		3.7	الاستر الميتيلي للايبيروفن
2.12	8.40	7.20	فوبروفن
0		4.4	الاستر الميتيلي للفوبروفن
1.85	15.3	13.5	حمض المانديليك النقي (مادة أولية)
1.30	9.7	9.1	الاستر الميتيلي لحمض المانديليك (مندیلات الميتيل)

14- تطبيقات طريقة تحليل الاناتوميترات على عينات من الواقع:

14-1 البروفنات في المستحضرات الدوائية ونتائج تحليلها: طبقت الطريقة الواردة أعلاه على عينات بروفونات في مستحضرات دوائية تصنعها إما شركات وطنية محلياً أو شركات أجنبية خارجياً، ووردت العينات من السوق المحلية والدولية. وبأشكال مختلفة: مضغوطات أو محفظات من عيارات مختلفة لكل من الكيتوبروفن والفلوربيروفن وحمض التيايروفن والنابروكسن.

لم يكن بالمستطاع لأسباب عدة، الحصول على أكثر من شكل وحيد للفنوبروفن، ولم تنجز تجارب ذات معنى على الايبيروفن لعدم التمكن من فصل متخايلاته في شروط التجارب الأولية. يبين الجدول 12 أن البروفونات جميعها في أشكال المستحضرات الدوائية، السورية والأجنبية، كانت من النوع الراسيمي عدا النابروكسن الذي هو أساساً وحيد المتخايل. وقد أثبتت الطريقة المطورة فعاليتها في تحديد نسب المتخايلات دون أي تداخلات تعيق التحليل. وهذه هي المرة الأولى، بحسب معلوماتنا التي تحلل محلياً متخايلات البروفونات في المستحضرات الدوائية السورية وتحدد نسبها، وتُقَارَنُ بالمستحضرات الدوائية الأجنبية المستوردة.

الجدول (12): نسب متخايلات بعض البروفنات في مجموعة مستحضرات دوائية مصنعة محلياً وأجنبية مستوردة.

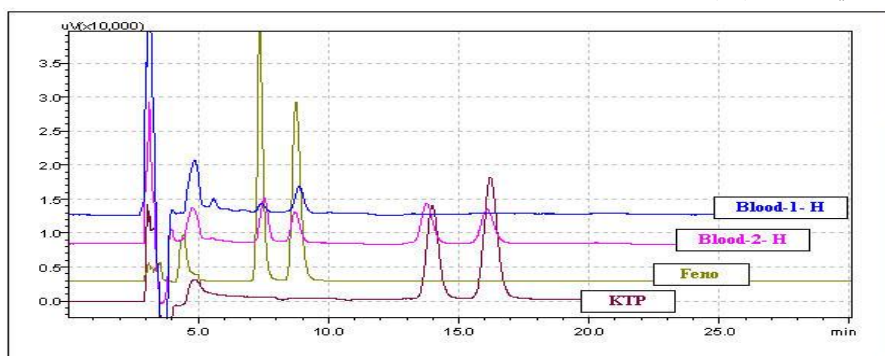
F=A1/A2 نسبة مساحتي قمتي المتخايلين	المصدر/ الشركة المحلية/الشركة الأجنبية	الشكل الدوائي	رمز البروفن
1	سورية /شركة اوبري	محفطات عيار 50 mg	KTP
1	سورية /شركة ميديكو	مضغوطات عيار 50 mg	KTP
1	Sanofi-avantis	مضغوطات عيار 100 mg	KTP
1	سورية /شركة الفارس	مضغوطات عيار 100 mg	Fbp
1	سورية /شركة كيمي	مضغوطات عيار 50 mg	Fbp
1	سورية /شركة اوبري	مضغوطات عيار 300 mg	Tia
1	Sanofi	مضغوطات عيار 300 mg	Tia
وحيد المتخايل	سورية /شركة فارماسير	مضغوطات عيار 500 mg	Nap
وحيد المتخايل	سورية /شركة مسعود وبحري	مضغوطات عيار 500 mg	Nap
1	Sciencex	مضغوطات عيار 300 mg	Fen

14-2- تحليل متخايلات البروفن في عينات دم بشري: جُربت الطريقة الموصوفة أعلاه على عينات دم بشري بهدف معرفة صلاحيتها لدراسة التوافر الحيوي لكل من متخايلي البروفنات موضوع الدراسة الحالية.

14-2-1- العينات: تطوع أحد الزملاء H، لتناول نوعين مختلفين من مستحضرات البروفنات، فتناول المستحضر (فنبوروفن-سينسكس)، وبعد ساعتين ونصف تناول المستحضر (كيتوبروفن-أوبري). أخذت عينة أولى من الدم، بعد تناول المستحضر الأول بساعة ونصف. وأخذت العينة الثانية، بعد تناول الدواء الآخر بساعتين، بحيث كان الفاصل الزمني 3 ساعات بين السحبين.

14-2-2- تحضير العينات وشروط التحليل ونتائجه: ثقل الدم، من كل عينة، وفصلت البلازما الناتجة، واستخلصت بحلقي الهكسان، ثم بخر الطور العضوي الناتج حتى الجفاف، وبعد ذلك ذوّب في الإيتانول. حطت نواتج الاستخلاص بالطريقة المطورة الواردة في هذا العمل، وشخصت قمم المتخايلات بمطابقة الكروماتوغرامات الناتجة مع تلك الكروماتوغرامات الموافقة لكل مادة. بيّن الشكل-4 كروماتوغرامات عينات دم المتطوع H إذ تم تعرّف متخايلي مادة فنوبرفن في السحب الأول Blood1 وكانت نسبة المتخايل الأول إلى المتخايل الثاني $F_{Fen}=0.3$ ؛ الأمر الذي يتغيّر في السحب الثاني Blood2 بحيث تصبح النسبة $F_{Fen}=1.4$ ؛ مما يدل على حركية دوائية مختلفة لكلا المتخايلين، أي إنّ المتخايلين لا ينفذان إلى الدم بالسرعة والكمية نفسها. أجري بالنسبة إلى مادة الكيتوبروفن سحب دم واحد، وكانت فيه

نسبة المتخايل الأول إلى الثاني $F_{KTP} = 1$ تقريباً، أي كالنسبة الابتدائية في المستحضر الدوائي، ومن ثمَّ لم يمكن رصد حركية مختلفة للمتخايلين ضمن مدة التجربة.



الشكل(4): من الأعلى إلى الأسفل ، كروماتوغرامات سحب الدم الأول Blood1 والثاني Blood2 للمنتوع H، والكروماتوغرامات المرجعية المستخدمة في تعرف قمم متخايلات المادة فنوبروفن والمادة كيتوبروفن على الترتيب. يلاحظ عدم وجود تداخلات تمنع تحديد نسب المتخايلات

14-2-3- أهمية إنجاز التحليل وفوائده: تمكن الطريقة المطورة من تحديد نسبة متخايلي مستحضر دوائي بعد دخوله دم الكائن البشري دون تداخلات ناتجة عن تعقيد عينات الدم، وتسمح بمتابعة نسبها للمستحضر المحلي والأجنبي ومقارنة حركيتي كل منهما.

الخاتمة:

أصبح، بالإمكانات المتاحة، تطوير طريقة تحليلية وتطويرها محلياً لتحديد نسبة متخايلات بروفنات في مستحضرات دوائية سورية، ومطابقتها مع مستحضرات دوائية أجنبية ممكناً. تتضمن الطريقة المطورة تعديلاً تقنياً لما ورد جزئياً في المراجع المعاصرة التي تبين أهمية الموضوع، وتتضمن استعمال الكروماتوغرافيا السائلة المزودة بكاشف أشعة فوق البنفسجية، وعمود كيرالي من كاربامات الأميلوز وطور متحرك من الهكسان (90) والايثوبروبانول (10) وحمض ثلاثي فلور الخل (0.1). أكدت نتائج التحليل تطابق نسب متخايلي المستحضر السوري مع نسب المستحضر الأجنبي النظير المستورد. تمكن الطريقة من حساب تركيز كل متخايل كمياً، شريطة توافر المواد المرجعية اللازمة، وهي طريقة فعالة وقابلة للتطبيق على متخايلات البروفنات المدروسة (الكيتوبروفن والفنوبروفن والفلوربيبيرفن وحمض التيابروفن والنابروكسن) سواء كانت مادة فعالة أو على شكل مستحضر صيدلاني

(أقراص ومحفظات)، أو عينة حيوية كالدّم البشري. مكنت الدراسة أيضاً من فهم آلية الفصل الكيرالي على البيئة الكيرالية من خلال بيان تجريبي لدور الروابط الهيدروجينية الأساسية لهيدروجين الكربوكسيل الحمضي والروابط الهيدروجينية الثانوية للذرات الكهربية الأخرى الموجودة في الجزء الأروماتي من بنية البروفينات. وسمحت تجربة حمض المانديليك بفهم إضافي لآلية الفصل، من حيث إنّ وجود ذرة كهربية في القسم العطري للبروفن ضروري للفصل، إلّا أنه لا يحقق الفصل بحد ذاته؛ ونعتقد أن ذلك قد يعود لبعده هذه الذرات عن الكربون الكيرالي، في حين أن وجود زمرة هيدروكسيل حمض المانديليك، مرتبطة مباشرة مع الكربون الكيرالي، تسمح بفصل المتخايلات حتى في حالة الأسترة؛ أي عدم قدرة هيدروجين الكربوكسيل على القيام بجسور هيدروجينية مع البيئة الكيرالية.

References

- [1]: Eliel, E. and Wilen, S., 1994. Stereo chemistry of organic compounds, John Wiley & sons Inc.
- [2]: Wainer, I., 1993. Drug stereochemistry; Analytical methods and Pharmacology, Marcel Dekker Inc.
- [3]: Leffingwell, J., May 2003. Chirality & Bioactivity I: Pharmacology, Leffingwell Reports, , V.3, No. 1, pp. 1-27.
- [4]: Mohan, S., Mohan, E. and Yamasani, M., 2009. Chirality and its importance in pharmaceutical field-an overview, International Journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology, V. 1, No.4, pp 309-316 .
- [5]: Li, B. and Haynie, D., 2006: Chiral Drug Separation, Biomedical Engineering and Physics, Bionanosystems Engineering Laboratory, Encyclopedia of Chemical Processing DOI.
- [6]: Carey, F., 2000. Organic Chemistry, University of Virginia, McGraw-Hill,USA, fourth edition.
- [7]: Francotte, E. and Lindner, W., 2006. Chirality in drug research, wiley VCH.
- [8]: Lednicer, D., 2009. Strategies for organic drug synthesis and design, John Wiley & sons Inc, 2nd edition.
- [9]: Nagori, B., Deora, M. and Saraswat, P., 2011. Chiral drug analysis and their application, Department of Quality Assurance, Lachoo Memorial College of Science & Technology, Pharmacy Wing, Vol. 6, No. 2, Article-018.
- [10]:Gubitz, G. and Schmidt, M., 2004. Chiral separations; methods and protocols, Humana Press Inc.
- [11]: Chiral Chromatography, Thomas E. Beesley & Raymond P.W. Scott, 1998 by John Wiley & Sons Ltd, England.
- [12]: Subramanian, G., 2007. Chiral Separation Techniques: A Practical Approach, Wiley-VCH Verlag GmbH, 3d edition.
- [13]: Akin, A., Antosz, F., Ausec, J., Greve, K. and Johnson, R., 2007. An orthogonal approach for chiral method development screening, current pharmaceutical analysis, vol. 3, pp 53-70.
- [14]:Sweetman, S., 2009. Martindale: The Complete Drug Reference, Pharmaceutical Press, 36th edition.
- [15]: British national Formulary , BNF61, BMJ Group and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain 2011.
- [16]: Valliappan, K., Kannan, K., Sivakumar, T. and Manavalan, R., 2006. Enantiospecific pharmacokinetic studies on ketoprofen in tablet formulation using indirect chiral HPLC analysis, Journal of applied biomedicine, India, Vol.4, pp 153-161.
- [17]: Kavuri, A., Voleti, M., Lakshmi, T., Soumya, M. and Chowdary, Y., 2013. Influence of Stereospecificity on Drug Bioavailability, International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, Vol. 4, No. 1, pp 9 – 15.

- [18]: Cabusas, M., 1998. Chiral separation on HPLC derivatised polysaccharide CSPs: Temperature, Mobile phase and chiral recognition mechanism studies. Ph. D. Thesis, Blacksburg, Virginia.
- [19]: He, X., Lin, R., He, H., Sun, M. and Xiao, D., 2012. Chiral Separation of Ketoprofen on a Chirobiotic T Column and Its Chiral Recognition Mechanisms, *Chromatographia*, Vol. 75, pp 1355–1363.
- [20]: Smet, E., staelens, L., hryden, Y., Baeyens, W., Aboul- Enein, H., Van Der Weken, G. and Cmpapa, A., 2001. Optimization of the Chiral Separation of Some, 2-Aryl propionic Acids on an Avidin Column by Modeling a Combined Response, *Chirality*, Vol.13, pp 556–567.
- [21]: Ribeiro, A., Grasa, N., Pais, L. and Rodrigues, R., 2008. Preparative separation of ketoprofen enantiomers, science direct, *Separation and Purification Technology*, Vol. 61, pp 375–383.
- [22]: Matarashvili, I., Chankvetadze, L., Fanali, S., Farkas, T. and Chankvetadze, B., 2013. HPLC separation of enantiomers of chiral aryl propionic acid derivatives using polysaccharide-based chiral columns and normal-phase eluents with emphasis on elution order, *J.Sep.Sci.*, Vol. 36, pp 140–147.
- [23]: Tanaka, M., Nagamatsu, K. and Nishi, H., 2014. High-performance enantiomer separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by 3µm reversed-phase chiral columns and applications to the optical purity testing of Naproxen drug substances and its formulations, *Analytical science, Japan*, Vol.30.
- [24]: Zhou, J., Zheng, X., Liu, Q. and Zhang, Z., 2013. Chiral Separation and Quantitative Determination of Ketoprofen on New Cellulose Bonded Chiral Stationary Phase by HPLC, *Advances in Biomedical Engineering Research (ABER)*, Vol.1, No. 4.
- [25]: Reddy, I. and Mehvar, R., 2004. *Chirality in Drug Design and Development*, CRC Press.
- [26]: Kavuri, A., Voleti, M., Lakshmi, T., Soumya, M. and Chowdary, Y., 2013. Influence of stereospecificity on drug bioavailability, *international journal of pharmaceutical & biological archives*, Vol. 4, No. 1, pp 9-15.
- [27]: Berthod, A., 2010. *chiral recognition in separation methods–mechanisms and applications*, springer, Springer Berlin Heidelberg.
- [28]: www.kromasil.com, publication of Eka Chemicals AB 2007.
- [29]: Dong, M., 2006. *Modern HPLC for practicing scientist*, John Wiley & Sons Ltd.
- [30]: BF₃ specifications and applications, Sigma-Aldrich catalog 1998.