تطوير طريقة تحليلية لتعيين كاربينوكسامين ماليئات، ديكستروميتورفان هيدروبروميد وبسودوافدرين هيدروكلوريد باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

جمال محفوض

قسم الكيمياء ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية

تاريــخ الإيداع 2007/05/08

قبل للنشــر في 2007/09/19

الملخص

تصف هذه الدراسة طريقة تحليلية مطوّرة لتقــدير المركبــات الآتيــة: كاربينوكــسامين ماليئــات، ديكستروميتورفان هيدروبروميد وبسودوافدرين هيدروكلوريد في مزائج نقية وفي مستحــضرات دوائيــة باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High performance liquid chromatography . أجري التحليل على عمود من السيليكا (6 ميكرون)، واستخدم كطور متحرك مزيج مؤلف من الإيتانول ــ محلول خلات الأمونيوم 0.05 M وبنسب قدرها [85 : 15] على الترتيب، وكاشف يعمل عند طول موجة قدرها 276 nm ومعدل تدفق هو 1 مل/ دقيقة. النتيجة كانت هناك خطية في مجال التراكيز المدروســة، حيث كانت قيم معامل الارتباط لجميع المواد المدروسة R > 0.9996 . حــسبت قــيم الانحــراف القياســي النــسبي المئــوي (n=6) لدقــة التحليــل اليــومي (intraday assay) ومــابين الأيــام (interday assay) فكانــت 0.931 %، 1.527 % لكاربينوكــسامين ماليئــات و0.717 %، 1.058% لديكــــستروميتورفان هيدروبروميــــد و0.309 %، 0.891 % لبــــسودوافدرين هيدروكلوريد على الترتيب. تفيد هذه الطريقة، اليسيرة والدقيقة والاقتصادية، في ضبط جودة تحاليــل العينات الصيدلانية الدوائية المصنعة في سورية ولأغراض الرقابة الدوائية .

الكلمات المفتاحية: كاربينوكــسامين ماليئــات، ديكــستروميتورفان هيدروبروميــد، وبسودوافدرين هيدروكلوريد، الكروماتوغرافيا الــسائلة عاليــة الأداء.

Development of Analytical Method for the Determination of Carbinoxamine Maleate, Dextromethorphan Hydrobromide and Pseudoephedrine Hydrochloride by HPLC

Jamal Mahfoud
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 08/05/2007
Accepted 19/09/2007

ABSTRACT

A simple and accurate method was developed for the analysis of carbinoxamine maleate, dextromethorphan hydrobromide and pseudoephedrine hydrochloride content in pure form and pharmaceutical preparations using HPLC. Analysis was conducted on a silica column (6 µm) with mobile phase consisting of ethanol – ammonium acetate (0.05 M) in rate [85:15] respectively, and at detection wavelength of 276 nm and flow rate 1ml/ min. Results were linear (correlation coefficient R > 0.9996) in the range of the studied concentrations for the active materials. The relative standard deviations (n=6) of intra and interday assay were 0.931%, 1.527% for carbinoxamine maleate and 0.717%, 1.058 % for dextromethorphan hydrobromide and 0.309%, 0.891% for pseudoephedrine hydrochloride, respectively. This method, proved to be easy, precise and economical, is useful for quality control of pharmaceutical drugs industrial samples.

Key Words: Carbinoxamine maleate, Dextromethorphan hydrobromide,Pseudoephedrine hydrochloride, High performance liquid chromatography (HPLC).

المقــدمة

تعدُّ المواد المراد تحليلها من المركبات المهمة ولاسيما أنهــا تــدخل فــي صــناعة المستحضرات الدوائية حيث يستخدم كاربينوكسامين ماليئات$C_{16}H_{19}Cl\ N_2O.C_4\ H_4\ O_4$ كمادة مضادة للهسيتامين H_1 (للتحــسس)، ومركــب ديكــسترروميتورفان هيدروبروميــد $C_{18}\ H_{25}\ NO.\ HBr.\ H_2O$ يــستعمل كمــضاد للــسعال، ويــستخدم بــسودوافدرين هيدروكلوريد $C_{10}\ H_{15}\ NO.\ HCl$ كمزيل لاحتقان الأغشية المخاطية للمجاري التنفــسية [2،1]. لذلك يستعمل مزيج من هذه المركبات لمعالجة حالات السعال والأعراض التنفسية العلوية والتي تتضمن احتقان الأنف المترافق مع التحسس أو مع الرشح العادي والأنفلونزا والتهاب الجيوب.

ولهذا تعدُّ المركبات المدروسة من المركبات التي تخص الكائن البشري بشكل مباشر. لذلك لابد من إيجاد طريقة تحليلية يستطاع من خلالها تحليل هذه المركبات الموجودة مــع بعضها بعضاً في مستحضرات دوائية.

من المعروف أنه في أثناء وجود كل مركب على حدة، يمكن إيجاد طرائق تحليلية لــه كالمعايرات الحجمية [4،3] أو طرائق طيفية [6،5]. لكن ليس من السهولة تحليــل هــذه المركبات الموجودة سوية بالطرائق السابقة الذكر، وذلك نتيجة التداخل الذي يحدث بــين المركبات، لأن جميع هذه المركبات ذوابة في الوسط المائي، لذلك لا يمكــن اســتخلاص مركب عن الآخر بشكل كامل، أي لا يمكن في النهاية تحديد مركب بوجــود آخــر فــي الطرائق السابقة الذكر [7].

لهذه الأسباب تم اختيار طريقة الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء لتحليل مثل هــذا المزيج من المركبات. درس الباحث Li, K. [8] إمكانية تحليل مزيج من بــسودوافدرين هيدروكلوريد مع كاربينوكسامين ماليئات في مستحضر دوائي على شكل معلــق جــاف باستعمال الكروماتوغرافيا السائلة، مــستخدماً العمــود الكرومــاتوغرافي Lichrospher C_6H_6 وطوراً متحركاً مؤلفاً من أسيتونتريل ــ ماء ــ حمض الفوسفور وبنسب قــدرها [0.1:50:50] على الترتيب وعند قيمة pH=2.5 حيث يحتوي كل ليتر منــه علــى 1غ صوديوم دود سيل سولفات وكاشف يعمل عند طول موجة قــدرها 220 nm، والنتيجــة كانت قيمة الانحراف القياسي النسبي المئوي هي أقل مــن 2.2% أي هنــاك دقــة فــي التحليل، كما كانت قيم الاسترجاعية للمواد المدروسة ضمن المجال المسموح به مرجعياً. كما درس الباحث Mansure,A., M [9] إمكانية تحليــل مــزيج مــن بــسودوافدرين هيدروكلوريد مع ديكستروميتورفان هيدروبروميد في مستحضر نقط فمويــة باســتعمال طريقة الكروماتوغرافيا السائلة مستخدماً عموداً كروماتوغرافيــاً CN- column أبعــاده (3.9 mm× 150mm) وطوراً متحركاً مؤلفاً من أســيتونتريل ــ ميتــانول ــ محلــول

موقي pH = 5.3 ــ ماء وبنسب قدرها [10:4:17:14] على الترتيب، وكاشفاً يعمل عند طول موجة قدرها 262nm، حيث استنتج أن هذه الطريقة هي صالحة لتحليل مثل هذه المزائج كما تتمتع بحساسيتها المرتفعة ودقتها العالية وخطيتها. كما درس الباحث H.-Luo, وآخرون معه [10] إمكانية تحليل مزيج من ديكستروميتورفان هيدروبروميد وديفينهيدرامين هيدروكلوريد وباراسيتامول وبسودوافدرين هيدروكلوريد في مستحضر مضغوطات باستعمال طريقة الـ HPLC مستخدماً العمود الكروماتوغرافي C_{18} أبعاده (4.6 mm× 200mm) وطوراً متحركاً مؤلفاً من أسيتونتريل ــ ميتانول ــ محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 0.05 مول/ليتر وبنسب قدرها [25:1:5] على الترتيب، وكاشفاً يعمل عند طول موجة قدرها 256 nm واستنتج أن هذه الطريقة صالحة لتحليل مثل هذه المستحضرات وإمكانية استخدامها في الرقابة الدوائية. كما درس الباحث ML, -Qi, وآخرون معه [11] إمكانية تحليل مزيج مؤلف من أسيتامينوفين وديكستروميتورفان هيدروبروميد وبسودوافدرين هيدروكلوريد في مستحضر دوائي، مستخدماً عموداً كروماتوغرافياً Hypersil CN-column أبعاده(5 mm×150mm) وطوراً متحركاً مؤلفاً من محلول الزوج الشاردي (ion – pairing solution) -ميتانول- أسيتونتريل وبنسب قدرها [18:57:25] على الترتيب وكاشفاً يعمل عند طول موجة قدرها 220nm، حيث استنتج من دراسته أن هناك فصلاً جيداً للمواد المدروسة وخطية جيدة ضمن المجال المدروس ودقة في التحليل وصحة في النتائج.

هناك كثير من المراجع [12-21] التي درست تحديد المركبات الدوائية المذكورة في هذا البحث وغيره باستخدام طريقة HPLC. حيث أكدت جميع هذه الدراسات أن التحليل باستخدام هذه الطريقة أدى إلى التوصل إلى دقة عالية في التحليل، فضلاً عن الخطية في المجال، كما أكدت دقة وحساسية هذه الطريقة وإمكانية تطبيقها على مزائج من هذا النوع، مما أعطاها صدقاً في التحليل أكثر من غيرها.

مــواد البحــث وطرائقه

1- المواد المستخدمة:

استخدمت مواد قياسية من الاتحاد الأوروبي تراكيزها أعلى من 99.8 % لتحضير جميع محاليل السلسلة العيارية. والمحلات المستخدمة (حمض كلور الماء، الإيتانول) عالية النقاوة من الصنف (HPLC – grade) وهي من شركة BDH البريطانية وتتمتع بنقاوة ما بين 99.7-100 %. إن خلات الأمونيوم الصلبة المستخدمة هي من إنتاج شركة Scharlau الإسبانية وتتمتع بنقاوة أكبر من 98 % وهي خاصة بالتحليل الكروماتوغرافي.

أما العينات المدروسة فهي من إنتاج شركات دوائية سورية، وهي على شكل عينات شراب سائل.

يوضح الجدول (1) اسم المستحضر مع الكميات المصرح عنها من المواد الفعالة من قبل الشركات المصنعة.

الجدول (1) كميات المواد الفعالة المصرح عنها من قبل الشركات المصنعة للمستحضرات.

اسم المستحضر	الكمية المصرح عنها (mg)		
	بسودوافدرين هيدروكلوريد	ديكستروميتورفان هيدروبروميد	كاربينوكسامين مالئات
توسيفان شراب: TUSSIPHAN Syrup يحتوي كل 5 مل منه على:	60	15	4
كريب ستوب : GRIPPE STOP Syrup يحتوي كل 5 مل منه على :	15	7.5	-
توسيفان نقط : TUSSIPHAN Drops يحتوي كل 1 مل منه على:	25	4	2
رينامين نقط : Rhinamine Drops يحتوي كل 1 مل منه على:	25	-	2

2- الأجهزة المستخدمة:

استخدم جهاز الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء الأمريكي الصنع من شركة Waters والذي يتألف من مضخة نموذج Waters 1515, isocratic HPLC pump. وكاشف يعمل في مجال الأشعة المرئية وفوق البنفسجية نموذج Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector. موصولاً مع حاسب يحوي البرامج الخاصة بهذا التحليل.

استخدم العمود الكروماتوغرافي الحاوي على حشوة السيليكا (6 ميكرون) والذي يعرف وفق دستور الأدوية الأمريكي بالعمود L3، أبعاده (3.9 mm × 150 mm) من إنتاج شركة Waters الأمريكية.

استعمل ميزان إلكتروني حساس (Sartorius B120 S) دقة قياسه 0.1 mg ± لوزن جميع المواد المدروسة.

3- اختيار المحل المناسب للعينات المدروسة:

اختير محلول حمض كلور الماء تركيزه 0.01N كمحل للعينات المدروسة وذلك لأسباب متعددة أهمها: جميع المركبات المدروسة تنحل فيه، المحل المستخدم لا يمتص الضوء عند طول الموجة المستخدم في أثناء إجراء التحليل، فضلاً عن رخص ثمن هذا المحل والذي يقلل من الكلفة الاقتصادية للتحاليل.

4- اختيار الطور المتحرك:

استخدم كطور متحرك المزيج المؤلف من الإيتانول – محلول خلات الأمونيوم تركيزه 0.05 M وبنسب قدرها [15:85] على الترتيب. يرشح الطور المتحرك على مرشحه قطر مساماتها لا تتجاوز 0.45 µm، ثم يخلص من جزيئات الغاز باستعمال جهاز الأمواج فوق الصوتية.

اختير هذا المزيج كطور متحرك لملاءمته لتحليل هذه المركبات، كونه لا يمتص الضوء عند طول الموجة الذي يتم عندها التحليل وهي 267 nm، يعطي عامل تفريق عالياً للمزيج المدروس فضلاً عن رخص ثمنه.

5- طريقة العمل:

1- الشروط الكروماتوغرافية المطبقة:

في أثناء عملية التحليل طُبّقت الشروط الكروماتوغرافية الآتية:

ــ العمود المستخدم هو من السيليكا أو ما يعرف بالعمود L3 أبعاده (3.9 mm×150mm).

ــ درجة الحرارة المستخدمة هي درجة حرارة الغرفة.

ــ الكاشف المستخدم هو كاشف الأشعة فوق البنفسجية ويعمل عند طول الموجة l = 267 nm.

ــ زمن التحليل الكلي 15 دقيقة.

ــ حجم خلية الحقن 20 ميكروليتراً.

ــ المحل المستخدم لجميع العينات هو محلول من حمض كلور الماء تركيز (0.01 N).

ــ الطور المتحرك المستخدم هو مزيج من [الإيتانول ــ محلول خلات الأمونيوم M 0.05] بنسبة [15:85] على الترتيب.

ــ تدفق الطور المتحرك هو 1 مل/دقيقة.

ــ عدد التحاليل المكررة n = 6.

2 – تحديد نقاوة المواد الفعالة القياسية المستخدمة:

تم التأكد من نقاوة المواد الفعالة القياسية المستخدمة بمعايرتها وفق الطرائق المتبعة في دستور الأدوية الأمريكي [22]، وذلك بطريقة المعايرة اللامائية فكانت نقاوة كل من كاربينوكسامين ماليئات، ديكستروميتورفان هيدروبروميد وبسودوافدرين هيدروكلوريد هي 99.8 %، 100.1 %، 99.9 % على الترتيب.

3- تحضير محاليل السلسلة العيارية:

لتحضير محاليل السلسلة العيارية تم وزن بدقة 180 مغ من بسودوافدرين هيدروكلوريد العياري و45 مغ من ديكستروميتورفان هيدروبروميد العياري و12 مغ من كاربينوكسامين ماليئات العياري. أذيبت جميع الأوزان السابقة بكمية مناسبة من حمض كلور الماء تركيزه 0.01N ثم نقل المحلول كمياً إلى دورق حجمي سعة 100 مل وأكمل الحجم بالحمض حتى العلامة. يمثل المحلول الناتج محلول الأم (المحلول الأول من محاليل السلسلة العيارية). من هذا المحلول تم تحضير محاليل السلسلة العيارية الأخرى وذلك بإجراء التمديد المناسب له. ويبّين الجدول (2) تراكيز محاليل السلسلة العيارية المحضرة.

الجدول (2) تراكيز محاليل السلسلة العيارية.

المحاليل العيارية	تراكيز المواد الفعالة (mg/ml)		
	بسودوافدرين هيدروكلوريد	ديكستروميتورفان هيدروبروميد	كاربينوكسامين ماليئات
المحلول العياري(1)	1.800	0.450	0.120
المحلول العياري(2)	1.500	0.375	0.100
المحلول العياري(3)	1.200	0.300	0.080
المحلول العياري(4)	0.900	0.255	0.060
المحلول العياري(5)	0.600	0.150	0.040

4- تحضير محاليل العينات المدروسة :

استخدمت جميع العينات المدروسة من مستحضرات صيدلانية مصنعة من قبل شركات دوائية سورية.

لتحضير محاليل العينات المدروسة تم أخذ بدقة 10، 20، 4.8، 4.8 مل من توسيفان شراب وكريب ستوب شراب وتوسيفان نقط وريناميين نقط على التسلسل. وضع كل منها في دروق حجمي سعة 100 مل ثم مدّدت كمياً بمحلول من حمض كلور الماء (N 0.01) حتى الحجم وبالتالي تراكيز المواد الفعالة الافتراضية (وفق الشركة المصنعة) في كل من المستحضرات السابقة الذكر وهي موضحة في الجدول (3).

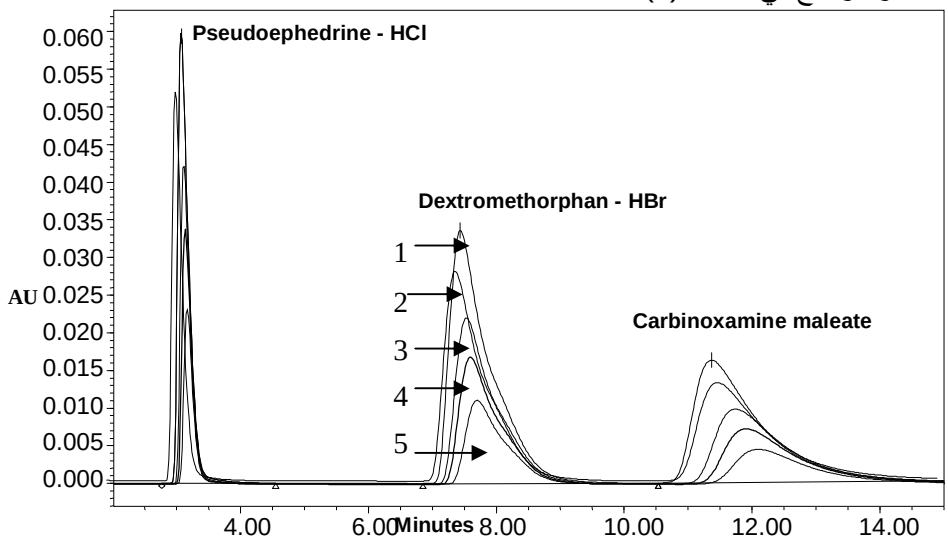
الجدول (3) تراكيز المواد الفعالة في عينات التحاليل المحضرة (وفق الشركة المصنعة).

اسم المستحضر	تراكيز المواد الفعالة في عينات التحليل (mg/ml)		
	بسودوافدرين هيدروكلوريد	ديكستروميتورفان هيدروبروميد	كاربينوكسامين مالنات
توسيفان شراب: TUSSIPHAN Syrup	1.200	0.300	0.080
كريب ستوب: GRIPPE STOP Syrup	0.600	0.300	-
توسيفان نقط: TUSSIPHAN Drops	1.200	0.192	0.096
رينامين نقط: Rhinamine Drops	1.200	-	0.096

النتائج والمناقشة

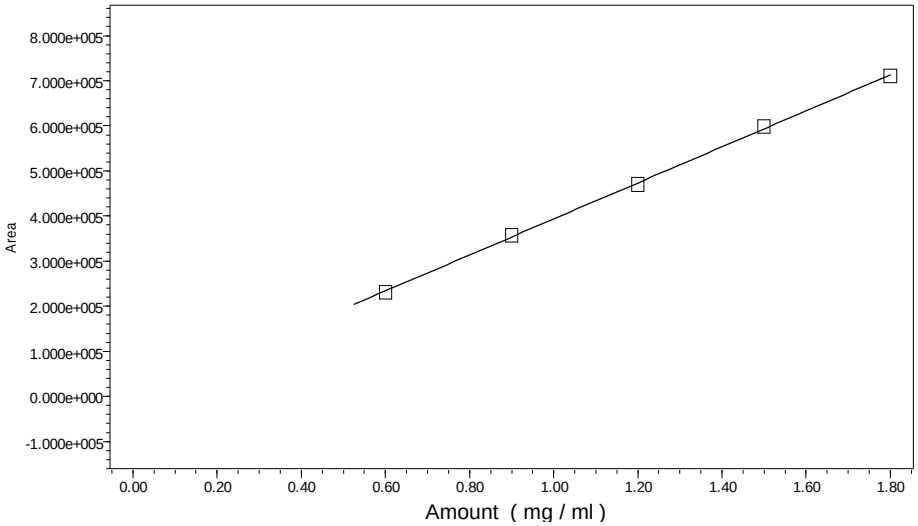
يعود اختيار طريقة الكروماتواغرفيا السائلة العالية الأداء في تحليل مثل هذه المزائج المدروسة دون غيرها من الطرائق الأخرى لعدة أسباب منها: عند تطبيق هذه الطريقة لا يحدث تداخل بين المواد الفعالة في أثناء عملية التحليل كما هو الحال عند استخدام طرائق المعايرات الحجمية أو الطرائق الطيفية، والتي غالباً ما تحتاج إلى عملية استخلاص كل مكون على حدة ومن ثم معايرته، وعملية الاستخلاص هذه لا تتم بشكل ناجح دائماً بسبب أن جميع المواد الفعالة منحلة في الوسط المائي، وعملية الإستخلاص لمكون لا تتم أحياناً بشكل كامل، كما يمكن أن يستخلص مكون آخر معه جزئياً، فضلاً عن الوقت الطويل اللازم لإنجاز مثل هذه الطرائق من استخلاص، ومن ثم معايرة، والكلفة الاقتصادية المرتفعة في أثناء تطبيق هذه الطرائق.

للأسباب السابقة الذكر تفضل طريقة التحليل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء عن غيرها لتحليل مثل هذه المزائج، لأنها لا تحتاج إلى وقت طويل أي بحدود 15 دقيقة تعادل 15مل من الطور المتحرك يتم تحليل المواد الفعالة الثلاثةالمدروسة دفعة واحدة، إمكانية تكرار التحاليل مرات عديدة وبدقة عالية، لا داعي لاستخلاص مكون عن غيره من المكونات فضلاً عن الكلفة الاقتصادية القليلة للتحاليل مقارنة مع بعض الطرائق التحليلية الأخرى. لإثبات خطية التحليل ضمن المجال المقيس لمحاليل السلسلة العيارية الموجودة في الجدول (2)، تم تحليل هذه المحاليل، ومن ثم رسمت الكروماتوغرامات لها كما هو موضح في الشكل (1).



الشكل (1) كروماتوغرامات محاليل السلسلة العيارية من الرقم 1 وحتى الرقم 5 الموجودة في الجدول (2).

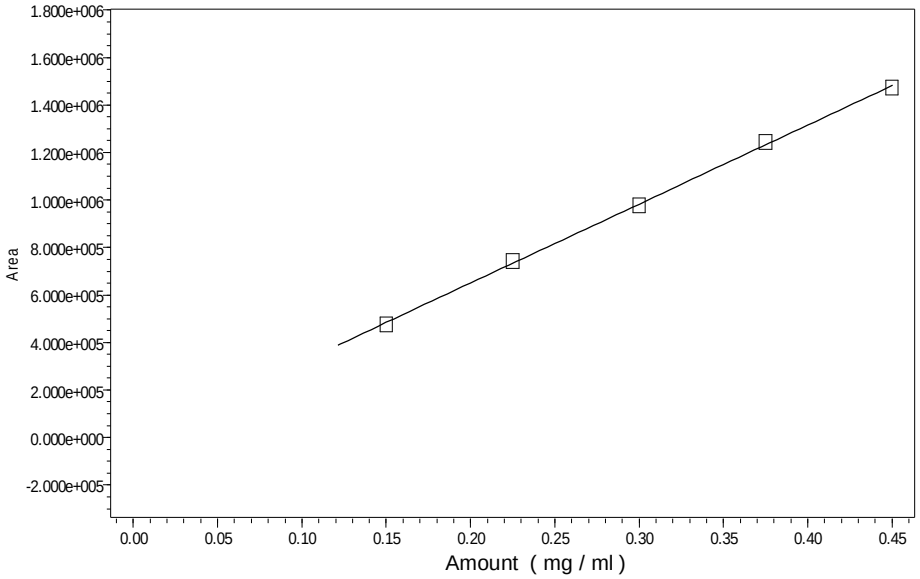
من كروماتوغرامات محاليل السلسلة العيارية السابقة تم رسم المنحنيات العيارية لتراكيز محاليل السلسلة العيارية مقابل مساحة قممها كما هو موضح بالأشكال (2)، (3)، (4) والتي تمثل المنحنيات العيارية لكل من بسودوافدرين هيدروكلوريد، ديكستروميتورفان هيدروبروميد وكاربينوكسامين ماليئات على الترتيب، والتي تحتوي كل منها على معامل الارتباط، والعلاقة الخطية التي تمثل الخط البياني، وجدول يوضح كمية المادة الفعالة العيارية كما هي محضرة مقارنةً مع كميتها المحسوبة بيانياً، والنسبة المئوية للانحراف.



Peak: Pseudoephedrine - HCl

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Standard (5)	Pseudoephedrine - HCl		0.600	2.315e+005	0.594046	-0.992	No	No
2	Standard (4)	Pseudoephedrine - HCl		0.900	3.574e+005	0.909299	1.033	No	No
3	Standard (3)	Pseudoephedrine - HCl		1.200	4.702e+005	1.191773	-0.686	No	No
4	Standard (2)	Pseudoephedrine - HCl		1.500	5.982e+005	1.512374	0.825	No	No
5	Standard (1)	Pseudoephedrine - HCl		1.800	7.101e+005	1.792508	-0.416	No	No

الشكل (2) المنحنى العياري لبسودوافدرين هيدروكلوريد

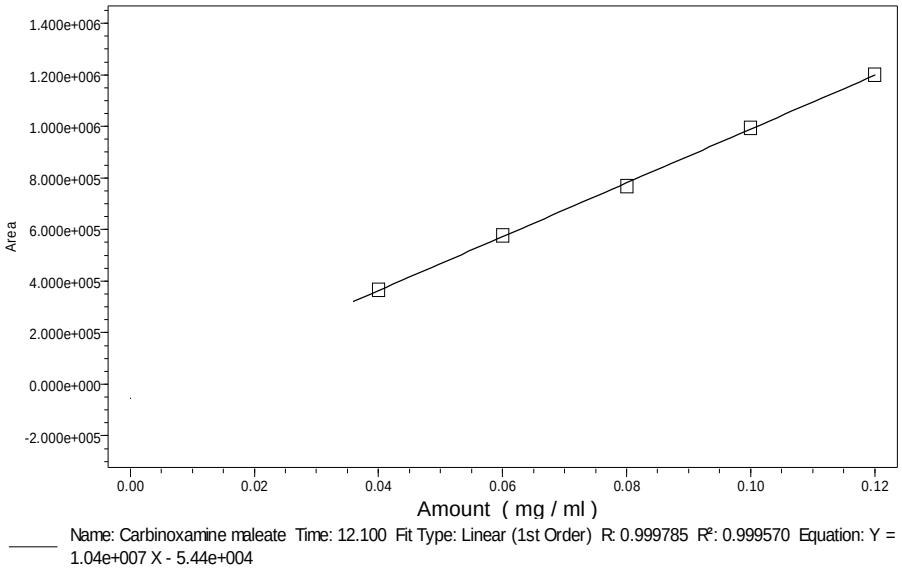


Name: Dextromethorphan - HBr Time: 7.700 Fit Type: Linear (1st Order) R: 0.999670 R^2: 0.999340 Equation: Y = 3.32e+006 X - 1.45e+004

Peak: Dextromethorphan - HBr

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Standard (5)	Dextromethorphan - HBr		0.150	4.770e+005	0.147853	-1.431	No	No
2	Standard (4)	Dextromethorphan - HBr		0.225	7.432e+005	0.227926	1.300	No	No
3	Standard (3)	Dextromethorphan - HBr		0.300	9.764e+005	0.298052	-0.649	No	No
4	Standard (2)	Dextromethorphan - HBr		0.375	1.245e+006	0.378706	0.988	No	No
5	Standard (1)	Dextromethorphan - HBr		0.450	1.473e+006	0.447463	-0.564	No	No

الشكل (3) المنحنى العياري لديكستروميتورفان هيدروبروميد



Peak: Carbinoxamine maleate

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Standard (5)	Carbinoxamine maleate		0.040	3.650e+005	0.040173	0.433	No	No
2	Standard (4)	Carbinoxamine maleate		0.060	5.764e+005	0.060423	0.706	No	No
3	Standard (3)	Carbinoxamine maleate		0.080	7.687e+005	0.078841	-1.449	No	No
4	Standard (2)	Carbinoxamine maleate		0.100	9.933e+005	0.100356	0.356	No	No
5	Standard (1)	Carbinoxamine maleate		0.120	1.201e+006	0.120207	0.173	No	No

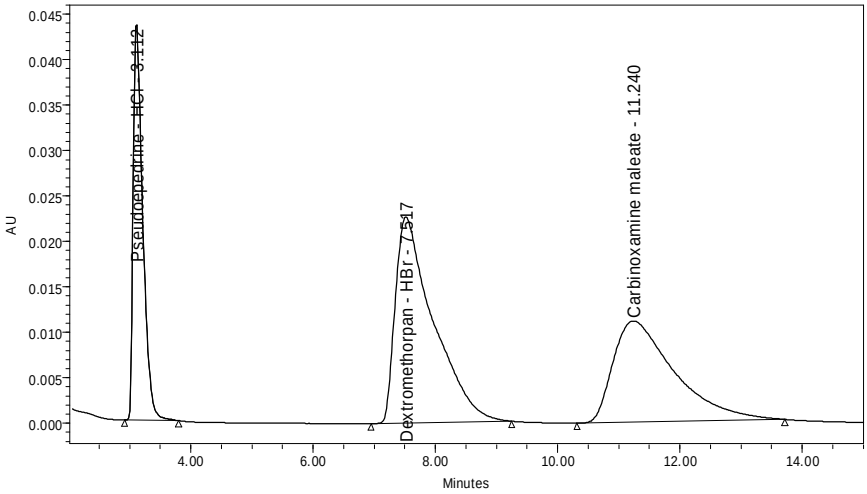
الشكل (4) المنحنى العياري لكاربينوكسامين ماليئات

دُرس تأثير السواغات الموجودة ضمن العينات المدروسة في نتائج التحليل فوجد أن جميع السواغات الموجودة تنفصل عند زمن احتفاظ أقل من 2 دقيقة أي تنفصل السواغات قبل زمن فصل المواد الفعالة المدروسة. وبذلك لا يوجد تأثير للسواغات في نتائج التحليل لأنها لا تتداخل مع القمم الكروماتوغرافية الناتجة عن المواد الفعالة، وبالتالي تأثير السواغات هنا مهمل تماماً، وهذا ما يؤدي إلى إعطاء دعم كبير لهذه الطريقة لاعتمادها دون الحاجة إلى فصل السواغات قبل إجراء عملية التحليل هذه.

وللتأكد من صلاحية الطريقة تم اختبارها على عينات مختلفة من المستحضرات المدروسة والموجودة في الجدول (3) التي اختيرت بشكل عشوائي، وبعد تحليلها تم الحصول على الكروماتوغرامات الموضحة في الأشكال (5)، (6)، (7)، (8) مع جداول تبين بعض المقادير المحسوبة من هذه الكروماتوغرامات مثل: اسم القمة، زمن الاحتفاظ، مساحة القمة ونسبتها المئوية، ارتفاعها ونسبتها المئوية، التركيز (الكمية) محسوباً من خلال حساب مساحة القمة الناتجة، ومن ثم تم إسقاطها على المنحنيات العيارية لحساب التركيز.

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	TUSSIPHAN Syrup LOT:(318)
Sample Type:	Unknown
Vial:	1
Injection #:	6
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	15.00 Minutes
Column Type:	Silica

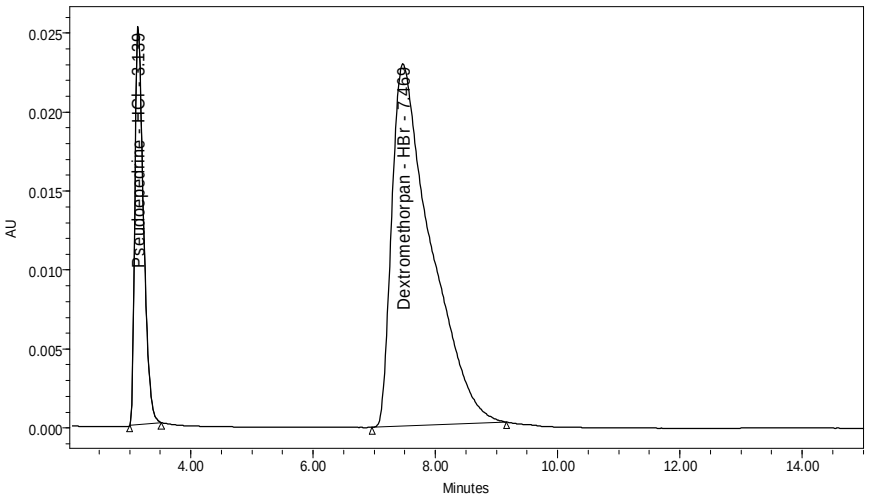


	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	Pseudoepedrine - HCl	3.112	471889	21.23	43556	56.31	1.204	mg / ml
2	Dextromethorpan - HBr	7.517	977147	43.96	22666	29.30	0.300	mg / ml
3	Carbinoxamine maleate	11.240	773945	34.82	11129	14.39	0.081	mg / ml

الشكل (5) كروماتوغرام عينة الاختبار لمستحضر توسيفان شراب وجبة رقم (318).

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	GRIPPE STOP Syrup LOT:(113)
Sample Type:	Unknown
Vial:	1
Injection #:	4
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	15.00 Minutes
Column Type:	Silica

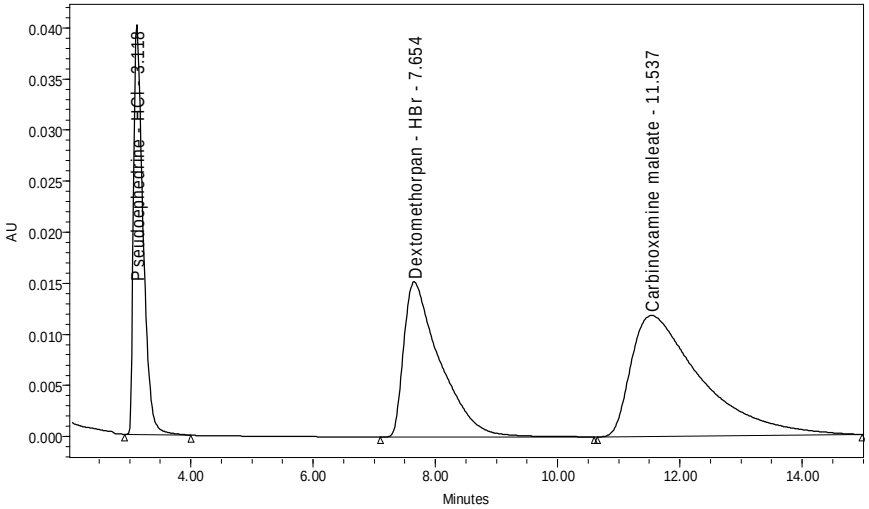


	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	Pseudoepedrine - HCl	3.139	245892	19.42	25257	52.39	0.617	mg / ml
2	Dextromethorpan - HBr	7.469	1020447	80.58	22954	47.61	0.303	mg / ml

الشكل (6) كروماتوغرام عينة الاختبار لمستحضر كريب ستوب شراب وجبة رقم (113).

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	TUSSIPHAN drops LOT:(045)
Sample Type:	Unknown
Vial:	1
Injection #:	7
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	15.00 Minutes
Column Type:	Silica

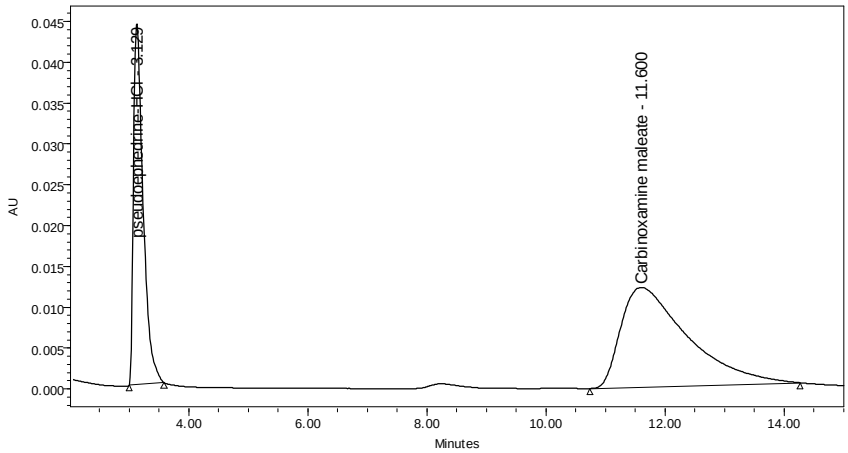


	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	Pseudoephedrine - HCl	3.118	435418	21.69	40089	59.71	1.203	mg / ml
2	Dextomethorpan - HBr	7.654	627780	31.28	15204	22.65	0.193	mg / ml
3	Carbinoxamine maleate	11.537	943849	47.03	11845	17.64	0.098	mg / ml

الشكل (7) كروماتوغرام عينة الاختبار لمستحضر توسيفان نقط وجبة رقم (045).

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Rhinamine drops LOT:(002)
Sample Type:	Unknown
Vial:	1
Injection #:	1
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	15.00 Minutes
Column Type:	Silica



	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	pseudoephedrine-HCl	3.129	492803	34.12	44212	78.35	1.258	mg / ml
2	Carbinoxamine maleate	11.600	951507	65.88	12219	21.65	0.099	mg / ml

الشكل (8) كروماتوغرام عينة الاختبار لمستحضر رينامين نقط وجبة رقم (002).

ولمعرفة مدى صحة نتائج تحليل عينات الاختبار بهذه الطريقة، تم حساب تراكيز المواد الفعالة الناتجة عن التحليل من ثم مقارنتها مع التراكيز المحضرة من المستحضر وفق ما هو مصرح عنه من قبل الشركات المصنعة، ومن ثم أمكن حساب نسبها المئوية المحققة (الاسترجاعية) كما هو موضح في الجدول (4).

الجدول (4) يوضح تراكيز المواد الفعالة بعد تمديد المستحضر مع تراكيزها المحسوبة نتيجة التحليل والإسترجاعية.

اسم المستحضر	بسودوافدرين هيدروكلوريد			ديكستروميتورفان هيدروبروميد			كاربينوكسامين ماليئات		
	المحضرة من المستحضر mg/ml	المحسوبة نتيجة التحليل mg/ml	الإسترجاعية %	المحضرة من المستحضر mg/ml	المحسوبة نتيجة التحليل mg/ml	الإسترجاعية %	المحضرة من المستحضر mg/ml	المحسوبة نتيجة التحليل mg/ml	الإسترجاعية %
توسيفان شراب	1.200	1.204	100.3	0.300	0.300	100.0	0.080	0.081	101.3
كريب ستوب شراب	0.600	0.617	102.8	0.300	0.301	101.0	-	-	-
توسيفان نقط	1.200	1.203	100.3	0.192	0.193	100.5	0.096	0.098	102.1
رينامين نقط	1.200	1.258	104.9	-	-	-	0.096	0.099	103.1

من خلال دراسة دقة التحليل اليومي intraday assay ومـــابين الأيـــام interday assy تمت المعالجة الإحصائية للمواد الفعالة المراد تحليلها في مستحضر توسيفان شراب على ســـتة عينات (n =6)، حيث تم حساب كل من الانحراف القياسي والانحراف القياسي النسبي المئـــوي وقيمة الاختبار t (t-test) وقيمة الاختبار F (F-test) كما هو موضح في الجدول (5).

رقم القياس	تراكيز المواد الفعالة في عينات التحليل (mg/ml)					
	بسودوافدرين هيدروكلوريد 1.200		ديكستروميتورفان هيدروبروميد 0.300		كاربينوكسامين ماليئات 0.080	
	Interaday Assay	interday Assay	Interaday Assay	interday Assay	Interaday Assay	interday Assay
1	1.204	1.201	0.300	0.300	0.081	0.080
2	1.200	1.185	0.302	0.301	0.080	0.078
3	1.198	1.180	0.298	0.295	0.082	0.081
4	1.201	1.190	0.304	0.302	0.080	0.078
5	1.206	1.206	0.301	0.295	0.081	0.079
6	1.196	1.182	0.303	0.301	0.081	0.080
المتوسط الحسابي Average	1.201	1.191	0.301	0.299	0.081	0.079
الانحراف القياسي SD	0.004	0.011	0.002	0.003	0.001	0.001
الانحراف القياسي النسبي المئوي RSD %	0.309	0.891	0.717	1.058	0.931	1.527
الاختبار t- t-test	0.612	-2.004	1.225	-0.816	2.449	-2.449
الاختبار F- F-test	25.000	3.305	100.000	44.444	400.000	400.000

الجدول (5) بعض القيم الإحصائية لمستحضر توسيفان شراب

من خلال ملاحظة النتائج السابقة يمكن مناقشة ما يأتي:

إن أسباب اختيار كل من المحل والطور المتحرك المستخدمين في عملية التحليل هذه ناتجة عن عدة عوامل مهمة منها: إمكانية الحصول على فعالية فصل جيدة للمكونات المدروسة، والثمن الرخيص لكل مكونات المحاليل.

اختيرت سرعة تدفق الطور المتحرك 1 مل/دقيقة، وهي غالباً ما تستخدم في الـ HPLC [23-27]، حيث كان زمن الفصل بحدود 15 دقيقة.

عند دراسة تأثير السواغات في نتائج التحليل وجد أنه لم يكن هناك أي تداخل بين السواغات والمواد الفعالة المدروسة، ومن ثم لا داعي إلى استخلاص السواغات من المستحضر قبل إجراء عملية التحليل، وهذا ما يؤدي إلى توفير في الزمن وفي الكلفة الاقتصادية لهذا التحليل، مما يعطي لهذه الطريقة دعماً قوياً لاعتمادها.

من خلال ملاحظة المنحنيات العيارية لكل من المواد الفعالة المدروسة (الأشكال 2، 3، 4) نجد أن هناك خطية محققة في الرسوم البيانية، كما أن جميع قيم معاملات الارتباط لهذه لمنحنيات هي $R > 0.9996$، وجميع قيم الانحراف المئوي لمحاليل السلسلة العيارية المحسوبة بيانياً بالنسبة للمحضرة هي أقل من 2% (الموجودة في جداول الأشكال السابقة الذكر)، وهذا ما يؤكد أن الخطية محققة في مجالات التراكيز المدروسة.

يلاحظ من الجدول (4) أن جميع قيم الاسترجاعية (النسبة المئوية المحققة) المحسوبة في أثناء تحليل العينات المدروسة كانت ضمن المجال المسموح به دستورياً والتي تقع ما بين 90% إلى 110% من الكمية المصرح عنها [28]، وهذا يدل على صحة الطريقة المتبعة، ومن ثم تراكيز المواد الفعالة هي موافقة لما هو مصرح عنه في المستحضرات من قبل الشركات المنتجة. وهذا ما يؤكد جودة الأدوية السورية المدروسة.

من خلال دراسة دقة التحليل اليومي intraday assay ومابين الأيام interday assy (الجدول5) نجد أن قيم الانحراف القياسي النسبي المئوي لهما 0.931 %، 1.527 % لكاربينوكسامين ماليئات و0.717%، 1.058 % لديكسترومیتورفان هيدروبروميد و0.309 %، 0.891 % لبسودوافدرين هيدروكلوريد على الترتيب، أي أن قيمة الانحراف القياسي النسبي المئوي $RSD\% < 2\%$ مما يدل ذلك على دقة التحليل، وهذا يؤدي إلى إمكانية تكرار التحليل مرات عديدة وبدقة جيدة.

في أثناء المقارنة بين قيمة الاختبار t المجدولة ($t = 2.57$) عند درجة ثقة 95% و$n = 6$ وما بين قيم الاختبار t المحسوبة تجريبياً (الجدول 5) يلاحظ أنه لا يوجد خطأ معنوي عائد لطريقة التحليل، حيث جميع قيم t المحسوبة تقع ضمن المجال من 2.57- وحتى 2.57+ وهذا ينطبق على جميع المواد الفعالة المدروسة في عينات التحليل سواء

كان التحليل يومياً أو مابين الأيام، وبهذا يمكن اعتماد درجة الثقة 95% بعدم وجود خطأ معنوي عائد لطريقة التحليل.

عند مقارنة قيمة الاختبار F المجدولة (F = 5.05) عند درجة ثقة 95% و n = 6 مع قيم الاختبار F المحسوبة كما هو موضح في الجدول (5) (وذلك بالاعتماد على أن قيمة الانحراف القياسي النسبي المئوي المسموح به هو 2%) نجد أن قيم الاختبار F المحسوبة أكبر من قيمة F المجدولة لجميع المواد الفعالة المدروسة (عدا القيمة الناتجة عن تحليل بسودوافدرين هيدروكلوريد مابين الأيام حيث كانت قيمة F=3.305 وهي أصغر من القيمة المجدولة، إذ أن الانحراف القياسي ناتج عن خطأ عشوائي لا يتعلق بطريقة التحليل، لأن قيمة الانحراف القياسي لمجموعة القياسات هذه SD = 0.011 وهو أصغر من قيمة الانحراف القياسي المرجعي المعتمد (0.02) وهكذا نظراً لأن قيم F المحسوبة أكبر من قيمة F المجدولة لذلك تكون دقة القياسات في هذه الطريقة أفضل من دقة الطريقة المرجعية المعتمدة تحليلياً [28].

لهذه الأسباب مجتمعة يجعل تطبيق طريقة التحليل هذه مهمة جداً ولها ما يميزها عن غيرها من الطرائق الأخرى.

الخــلاصة

إن اختيار شروط التحليل الكروماتوغرافي من عمود كروماتوغرافي وطور متحرك وطول موجة الكاشف المستخدم هي ذات أهمية كبيرة. في أثناء تطبيق طريقة الـ HPLC في تحليل مثل هذه المستحضرات تعطي نتائج دقيقة وموثوقاً بها. الكلفة الاقتصادية القليلة لهذه الطريقة تؤدي إلى إمكانية استخدامها بشكل كبير وواسع في تحليل المستحضرات الدوائية، إمكانية تطبيقها على تحليل الأدوية بغية استخدامها في الرقابة الدوائية.

REFERENCES

[1] Physician desk reference (PDR). (2005). USA .

[2] Duterhoff, H. und Kover, K-M. (1977). Identifizierung von Arzneistoffen, Stuttgart, Germany.

[3] British pharmacopoeia. (1993). vol. (2), P. 208.

[4] European pharmacopoeia. (1997). 3rd Edition, vol. (1), P. 727.

[5] David Harvey. (2000). Modern Analytical chemistry, Depauw University, USA.

[6] Silverstem, R.M. and Webster, F. X. (1998). Spectrometric Identification of Organic Compounds, sixth Edition State of University of New York .

[7] Caddy, B. (1991). In the Analysis of Drugs of Abuse, ed. T. A. Gough, Wiley, Chichester.

[8] Li, K. (2005). Simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide in composite pseudoephedrine hydrochloride dry suspension by HPLC, 23(1):82-4.

[9] Mansour, A. M. (1998). Determination of pseudoephedrine hydrochloride and carbinoxamine maleate in combination drug formulation by liquid chromatography.J AOAC Int., 81(5):958-62.

[10] Luo, -H; Wang, -LJ; Wang, -J. (2002). Studies on quantitative determination of ingredients in "Dextromethorphan Hydrobromide Diphenhydramine Hydrochloride Paracetamol Pseudoephedrine Hydrochloride dispersed tablets" by HPLC, Yaowu–Fenxi-Zazhi,22(3): 222-224.

[11] Qi,-ML; Wang, -P; Zhou, -L; Gu, -JL; Fu, -RN. (2003). Simultaneous determination of acetaminophen, dextromethorphan hydrobromide and pseudoephedrine hydrochloride in a new drug formulation for cold treatment by HPLC, Chromatographia, 57(3-4): 139-142

[12] Li, -YQ; Tian, -ZX; Zhao, -W; Zhu, -JH. (2000). "HPLC determination of guaiphenesin, pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide in Redentai oral solutions" Yaowu –Fenxi-Zazhi, 20(2):97-98

[13] Shervington, -LA, "A quantitative simultaneous high-chromatographic determination of pseudoephedrine hydrochloride, guaifenesin and dextromethorphan hydrobromide", Anal-Lett.; 30 (5):927-944

[14] Sodhi, -RA; Chawla, -JL; Sane,-RT. (1997). "Simultaneous determination of pseudoephedrine sulfate, azatadine maleate and dextromethorphan hydrobromide by high–performance thin-layer chromatography", Indian-Drugs, 34(8):433-436.

[15] Gu, X., Li, H., Macnair, K.R., Simons, F.E., Simons, K.J. (2005). Simultaneous analysis of the H1-antihistamine acrivastine and the decongestant pseudoephedrine hydrochloride by high-performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal.37(4):663-7. 2004 .

[16] Murtha, J. L., Julian, T. N., Radebaugh, G. W. (1988). Simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride, chlorpheniramine maleate, and dextromethorphan hydrobromide by second-derivative photodiode array spectroscopy. J Pharm Sci., 77(8):715-8.

[17] Carnevale, L. (1983). Simultaneous determination of acetaminophen, guaifenesin, pseudoephedrine, pholcodine, and paraben preservatives in cough mixture by high-performance liquid chromatography. J Pharm Sci.; 72(2):196-8.

[18] Wu. Z. C., Goodal, l. D. M., Lloyd, D. K. (1990). Determination of enantiomeric purity of ephedrine and pseudoephedrine by high-performance liquid chromatography with dual optical rotation/UV absorbance detection. J. Pharm Biomed Anal.;8(4):357-64

[19] Makhija, S.N., Vavia, P. R. (2001). Stability indicating HPTLC method for the simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizine in pharmaceutical formulations. J. Pharm Biomed Anal.; 25(3-4):663-7.

[20] Mc Sharry,W.O., Savage, I. V. (1980). Simultaneous high-pressure liquid chromatographic determination of acetaminophen, guaifenesin, and dextromethorphan hydrobromide in cough syrup. J. Pharm Sci.; 69 (2): 212-4.

[21] Noggle, F. T., Jr, DeRuiter., J, Clark. C. R. (1986). Liquid chromatographic determination of the enantiomeric composition of methamphetamine prepared from ephedrine and pseudoephedrine. Anal Chem.; 58(8):1643-8.

[22] The United States Pharmacopoeia. (2005). 28, vol. (2) P. 348, 610.

[23] Miller, J. M. (1988). Chromatography, concepts and constructs, Wiley – Interscience, P. 188 , New York .

[24] Karba, P. M. and Marton, L. J. (1984). Clinical Liquid Chromatography, vols. I and II, CRC press, Boca Raton , FL.

[25] Lough, W. J. (2003). High Performance Liquid chromatography fundamental principles and practice, School of health science, University of Sunderland, USA.

[26] Wells, d. I. (1988). Pharmaceutical per formation the physicochemical properties of Drugs ,Ellis Horwood , Chi Chester .

[27] Poole, G. F. and Poole, S. K. (1991). Chromatography today, Elsevicr, New York.

[28] The United States Pharmacopoeia. (2002). 25, vol. (2) P. 1486 .