تطوير طريقة تحليلية كروماتوغرافية سائلة عالية الأداء لتعيين هيوسين بوتيل بروماید في الشرابات السائلة

أيهم عبد البر الفاخوري[1] و عصام القلق[2] و محمد جمال الخطيب[3]

تاريخ الإيداع 2013/02/27
قبل للنشر في 2013/07/10

الملخص

طوِّرت طريقة تحليلية سريعة وبسيطة لتعيين مادة هيوسين بوتيل بروماید في الشرابات الفموية السائلة باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء. حُلّلت في هذه العمل العينات مباشرةً دون الحاجة للجوء إلى أي معالجات مسبقة، باستخدام عمود كروماتوغرافي من النوع Intersil ODS-3 column (4.6mm x 250 mm, i.d., 5- micron particle size) واعتماد المزيج الآتي: أسيتونتريل: وقاء فوسفاتي ذو pH= 6.80±0.05 (70:30= حجم: حجم) كطور متحرك ومذيب للمحاليل العيارية ومحاليل العينات ومعدل سرعة تدفقه 1.5mL / min. ضبط طول موجة الكاشف عند الطول الموجي 210nm. ودُرست الخطية على كامل المجال الممتد من 0.02 mg /mL وحتى 0.14 mg /mL وكانت قيمة معامل الارتباط (r^2=0.9992). وراوحت القيم المتوسطة للاسترجاعية بين 99.00% وحتى 100.09%، كما بلغ حدُّ الكشْف 0.0012 mg/mL. أشارت النتائج إلى صحّة الطريقة ودقّتها. وطُبِّقَتْ بنجاح على مجموعة من العينات التجريبية، والمستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: تعيين، هيوسين بوتيل بروماید، كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء، شرابات.

[1]طالب دكتوراه، [2] الأستاذ المشرف، [3] الأستاذ المشرف المشارك، قسم الكيمياء، كليةالعلوم، جامعة دمشق، سورية.

Determination of Hyoscine butyl bromide in Liquid Oral Solutions by Using HPLC-DAD

A. A. Al-Fakhory[(1)], I. Al-Kalak[(2)] and M. J. Al-Khatib[(3)]

Received 27/02/2013
Accepted 10/07/2013

ABSTRACT

A simple and rapid analytical method for routine quantification of Hyoscine butyl bromide (scopolamine butyl bromide) in liquid oral formulations by high-performance liquid chromatography was developed and validated. The oral solution samples can be directly analyzed by reversed-phase HPLC on Intersil ODS-3 column (4.6 mm x 250 mm, i.d., 5-micron particle size) with acetonitrile-phosphate buffer of pH= 6.80± 0.05 (30:70 v/v) respectively as a mobile phase that has a flow rate of 1.5 mL /min. UV Detection was carried out at 210 nm. The method was linear over the selected concentration and ranged from 0.02 to 0.14 mg/mL (r^2 = 0.9992) and the detection limit was 0.0012 mg/mL. The mean percent recoveries ranged from 99.0% to 100.09%. The results demonstrated good linearity, accuracy, and precision. The method was applied to determine commercial liquid oral formulations.

Keywords: Determination, Hyoscine butyl bromide, HPLC, Syrups.

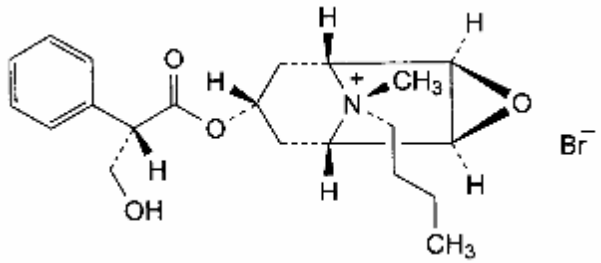
[(1)] Ph.D., Student, [(2)]Superviser, [(3)] Associated Superviser, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة

يُعدُّ مركب هيوسين بوتيل بروماید Hyoscine butylbromide **[HBB]** (أو ما يُعرف بـــ سكوبولامين بوتيل بروماید، أو بوتيل سكوبولامين، أو بوتيل هيوسين) من مـــضادات التشنج (المعدية/المعوية) وحالات الكولّين (مضادات الفعل الكولّيني)، وسُجِّل أول مرة في ألمانيا عام 1951، وسوِّق بشكله التجاري المعروف حول العالم عام 1952 [1]، إن مادة هيوسين بوتيل بروماید من مشتقات الأمونيوم الرابعية، ولها خواص فعالة سطحياً، تـــؤثر في العقد اللاودية في جدران الأحشاء، إذْ تمارس تأثير مضاد تشنج خاصاً في العضلات الملساء للقناة المعدية - المعوية والقناة البولية والحويصلة الصفراوية، ويُستطبُّ هيوسين بوتيل بروماید لمعالجة الحالات المترافقة مع التقلصات المعدية المعوية [1,2].

وفيما يأتي نورد تسمية مركب هيوسين بوتيل بحسب قواعد الـــ **IUPAC**:

Hyoscine butylbromide:
1R,2R,4S,5S,7s,9r)-9-Butyl-7-[[(2S)-3-hydroxy-2-phenylpropanoyl]oxy]-9-methyl-3-oxa-9-azoniatricyclo[3.3.1.$0^{2,4}$]nonane bromide.



الشكل (1) الصيغة المنشورة لمركب هيوسين بوتيل بروماید (HBB) [3]

وانطلاقاً من الأهمية الطبية للـــهيوسين بوتيل بروماید ووجـــوده فـــي العديـــد مـــن المستحضرات الصيدلانية منفرداً أو حتى مشاركاً مع مركبات دوائية أخرى، نُشرت العديد من المقالات عن طرائق تعيين هذا المركب في الأشكال الصيدلانية المتنوعة التي وجـــد فيها. فالـــهيوسين بوتيل بروماید يوجد في المستحضرات الصيدلانية على شكل تحاميـــل وأقراص ونقط فموية وشرابات سائلة.

وصفت في العمل [4] طريقة حركية حساسة لتعيين الـــ HBB فـــي المستحـــضرات الصيدلانية، إذ ترتكز الطريقة على تفاعل أكسدة المادة الدوائية ببرمنغنات البوتاسيوم عند درجة حرارة الغرفة مدة 15 دقيقة وقياس امتصاصية شاردة المنغنات عند الطول الموجي 610nm. كان حد كشف الطريقة 0.092 µg/mL، كما دُرســـت خطيـــة العلاقـــة بـــين الامتصاصية والتركيز ضمن المجال 1.0–10 µg/mL وكان معامـــل الارتبـــاط مـــساوياً

القيمة (r^2=0.9999). أمَّا في العمل [5] فقد طُوّرتْ أربعة أغشية حساسة لتعيين الهيوسين بوتيل بروميد (HBB)، ودُرست خواص هذه الأغشية الحساسة اعتماداً على قواعد الـIUPAC ذات الصلة، وأشارت هذه الدراسة إلى أن المساري المُطورة سريعة الاستجابة، وثابتة القراءات، وأبدت خطية جيدة للمساري المطوّرة كلّها. وقد أعطت المساري المطوّرة الاسترجاعيات المتوسطة الآتية على الترتيب: (99.92±1.11, 99.93±1.0, 99.94±1.18, 99.87±1.93)، وقد استخدمت هذه المساري بنجاح لتعيين الـ HBB في مجموعة من المزائج التجريبية والمستحضرات الصيدلانية والبلازما.

كما وصف العمل [6] طريقة طيفية للمشتق الثاني للتعيين المتزامن لكل من الميديزيبام، والـHBB دون اللجوء إلى عمليات فصل مسبقة لتعيينها في الأقراص ذات التلبيس السكّري، وقد كان الانحراف المعياري النسبي 0.56% للميديزيبام، و0.08% للـHBB، وطبقت الطريقة بنجاح على مستحضرات صيدلانية (أقراص ملبسة). أمَّا العمل [7] فقد طور طريقة استخلاصية طيفية للتعيين المتزامن لكل من الـHBB والفامسيكلوفير (FCV) في الحالة النقية أو بوجودهما في المستحضرات الصيدلانية. وتقوم الطريقة على تشكيل معقدات الزوج الشاردي للمواد المحللة مع أصبغة سلفونفتالين أسيد (بروموكريزول الأخضر، الأزرق، الأرجواني) والبروموتيمول الأزرق، في وسط يحوي وقاء الفتالات عند (pH:3.0-3.5) ودُرست الخطية ضمن المجال من التراكيز 1.0-20 µg/mL وكان معامل الارتباط $r^2 \geq 0.997$، كما راوحت قيم الاسترجاعية المئوية المتوسطة ضمن المجال (99.8-100.26%)، وأبدت الطريقة فعالية ونجاحاً كبيرين عند استخدامها في تحليل الـHBB و FCV سواءً بحالتهما النقية أو ضمن المستحضرات الصيدلانية.

اقترح العمل [8] طريقة كروماتوغرافية سائلة عالية الأداء HPLC إذْ استخدم فيها الكشف غير المباشر للناقلية في تعيين مركبات الأتروبين والقلويدات الشبيهة بالأتروبين في المستحضرات الصيدلانية. واستخدمت الطريقة عموداً كروماتوغرافياً من نوع (Ultrasphere 5 µm CN (250 mm×4.6 mm)) وطور متحرك مكوُن من الماء: الأسيتونتريل: رباعي هيدروفوران بنسبة (3:30:67 حجماً) على الترتيب ويحتوي على 1mM $HClO_4$ وقد عُدلت الطريقة عند تعيين الـHBB لتصبح نسبة الماء إلى الأستونتريل (50:47) بالترتيب في الطور المتحرك وأبدت الطريقة المُقترحة خطيةً ضمن المجال 0-500 µg L^{-1}، وقد طُبّقت الطريقة بنجاح لتعيين هذه المركبات في مجموعة من المستحضرات الصيدلانية.

طور العمل [9] طريقة كروماتوغرافية سائلة عالية الأداء لتعيين الـHBB والليدوكائين هيدروكلورايد (LID) في الحُقن العضلية معاً، وقد سبقت عملية التعيين هذه

عملية فصل استخدمت فيها مبادلات كاتيونية قوية (SCX, benzensulfonic acid) كخطوة استباقية لعملية التعيين. اعتُمد في عملية التعيين عمود كروماتوغرافي من النوع (BDS C-18)، وطور متحرك تدفقُه 1.2 mL/min، مؤلّف من مزيج مكون من الأسيتونتريل ومحلول وقاء 0.2M من خلات الأمونيوم بنسبة مزج حجمية (30:70) بالترتيب. كما أمكن وفق الطريقة المقترحة تعيين كل من الـ HBB والـLID والباراسيتامول معاً وكانت حدود كشف هذه المواد هي 1.05 – 0.96 – 0.67 µg/mL على الترتيب.

أهمية البحث وأهدافه

تكمن أهمية هذا البحث باقتراح طريقة سهلة وبسيطة لتعيين هيوسين بوتيل بروميد (HBB) باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، والمدمجة مع كاشف طيفي [HPLC-DAD]، في الشرابات الفموية السائلة دون الحاجة إلى اللجوء إلى معالجة مسبقة للعينات المدروسة قبل القيام بتحليلها، مع ملاحظة خلو دستوريّ الأدوية البريطاني والأمريكي من طرائق تحليلية لتعيين الـ HBB بتقنية HPLC في الشرابات الفموية السائلة.

مواد البحث وطرائقه

الأجهزة المستخدمة

- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء من طراز HITACHI مؤلف من الوحدات الآتية:

- وحدة ربط الكترونية لجهاز الكروماتوغرافيا مع الحاسوب (Interface).
- مضخة رباعية المآخذ مدمجة مع طارد للغازات (L-2130) Pump.
- حاقن آلي (L-2100)Auto-sampler.
- فرن لضبط درجة حرارة العمود الكروماتوغرافي (L-2300) Column Oven.
- مكشاف طيفي يعمل في المجالين المرئي و فوق البنفسجي DAD Diode Array Detector (L-2455) ويجري التحكم بالوحدات جميعاً من خلال الحاسوب.

- ميزان تحليلي بدقة ±0.1mg ألماني الصنع SARTORIUS، نموذج ED224S.
- مقياس pH/mV إنتاج شركة SARTORIUS نموذج PB-11 ألماني الصنع مزود بمسرى زجاجي مدمج مع مجس حراري.
- مراشح ميكروية لترشيح المحاليل قبل حقنها في جهاز الـ HPLC ولترشيح الطور المتحرك بعد تحضيره وقبل تمريره في الجهاز من نوع (Millipore Millex-HN Nylon) 0.45µm.

- أجريت التجارب كلّها باستخدام أدوات زجاجية من الصنف 'A class'.
- الماء المستخدم في تحضير الطور المتحرك وفي الاستعمالات الأخرى كلّها هو من النوع العالي النقاوة 'Ultra-Pure Water' تم الحصول عليه من جهاز مخبري لتنقية الماء ذي ثلاث مراحل 'SG'.
- أُجريت تخلية الطور المتحرك من الغازات باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية 'Ultrasonic Bath – Elma'.

المواد الكيميائية

- المواد والمذيبات كلّها كانت من النوعية عالية النقاوة، واستخدمت بشكل مباشر في التجارب التي أجريت في البحث، دون اللجوء إلى عمليات تنقية.
- الأسيتونتريل من النوع المخصص لأغراض الكروماتوغرافيا السائلة من إنتاج شركة (MERCK- Lichrosolv).
- فوسفات أحادية البوتاسيوم من إنتاج شركة (Lobachemie)، وهو ملح من الدرجة التحليلية بنقاوة 99.80%.
- عينات تجارية لمستحضر طبي يحوي مادة الهيوسين بوتيل بروميد (HBB) [Buscomed Syrup] من إنتاج مختبرات ميديكو للصناعات الدوائية – حمص – سورية و[Buscopan Syrup] من إنتاج شركة Boehringer Ingelheim ألمانيا، إذْ إنَّ تركيب الشراب هو: كل 5 mL من الشراب تحوي 5 mg هيوسين بوتيل بروميد.
- تم الحصول على مادة الهيوسين بوتيل بروميد عالية النقاوة (99.8%) من مختبرات ميديكو للصناعات الدوائية في محافظة حمص حيث اختُبرت نقاوتها أصولاً وفق متطلبات دستوريّ الأدوية الأمريكي والأوربي، وهي مادة مرجعية قياسية (USP Reference Standard) من إنتاج شركةLinneaSA(Locamo),Switzerland.
- أجريت الاختبارات والتحاليل كلّها في مخابر شركة ميديكو، كما وفّرت الشركة الأجهزة والأدوات والمواد الكيميائية المخبرية اللازمة لإنجاز البحث.

تحضير المحاليل

- محلول الوقاء: وهو محلول 0.02M من فوسفات أحادية البوتاسيوم، حيث حُل 2.8g من فوسفات أحادية البوتاسيوم بنحو 950 mL من الماء المقطر، وضُبطت بعدها قيمة الـpH عند القيمة 6.80±0.05 باستخدام محلول 1M من هيدروكسيد البوتاسيوم، ويُتمم حجم المحلول حتى 1000 mL في دورق حجمي سعته 1 لتر بالماء المقطر.

- الطور المتحرك المعتمد هو مزيج من الأسيتونتريل والوقاء الفوسفاتي السالف الذكر بنسبة مزج حجمية (70:30) على الترتيب، وبعد تمام مزج مكونات الطور رُشّح الطور المتحرك باستخدام مرشحة ميكروية 0.45 µm، ويوضع الطور في حمام جهاز أمواج فوق صوتية مدة خمس دقائق قبل تمريره في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة لطرد الغازات المنحلة في الطور المتحرك، واستُخدم الطور المتحرك كمذيب لمحاليل الشواهد والعينات.
- المحلول المرجع: يُوزن 50mg من مادة هيوسين بوتيل بروميد النقية، وتُنقل إلى دورق حجمي سعته 50 mL وتحل بـ 30 mL من المذيب، ويُتمم الحجم حتى العلام بالمذيب ويمزج جيداً حتى تمام الانحلال. يُنقل 5 mL من المحلول الأخير إلى دورق حجمي سعة 50 mL ويُتمم الحجم بالمذيب حتى العلام، ويكون بذلك تركيز المحلول الأخير هو 0.1 mg/mL. يُرشح جزء من المحلول الأخير (المحلول المرجع) باستخدام مرشحة 0.45µm قبل حقنه في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC).
- محلول العينات: يُنقل 5mL من عينة الشراب المراد تحليلها إلى دورق حجمي سعته 50mL وتُغسل الماصة جيداً بالمذيب للتأكد من نزول كامل الشراب في الدورق، ويتمم الحجم حتى العلام بالمذيب، ويمزج المحلول جيداً ويُرشح جزء من المحلول الأخير باستخدام مرشحة 0.45µm قبل حقنه في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC).

الشروط الكروماتوغرافية:

للتوصل إلى أنسب الشروط التحليلية لتعيين هيوسين بوتيل بروميد (HBB)، دُرست العوامل المحتملة التي قد تؤثر في الطريقة المقترحة مثل تأثير نسبة مزج كل من الوقاء والأسيتونتريل في الطور المتحرك وتأثير قيم الـ pH العائدة للوقاء المُحضّر وخاصةً مع تعقيد تركيب حامل العينة التي تحوي مجموعة من المركبات التي لها خصائص كروماتوغرافيَّة، أي إنَّها تملك احتمالية التشويش على المادة المُحلَّلة هيوسين بوتيل بروميد (HBB). وكنتيجة لسلسلة التجارب التي أُجريت تم التوصل إلى الشروط الآتية لتعيين هيوسين بوتيل بروميد (HBB) وفق ما يأتي:

- العمود الكروماتوغرافي: Intersil–C18–ODS3–GL Sciences, 4.6×250 mm.
- الطور المتحرك: أسيتونتريل 30: وقاء فوسفاتي 70 [حجم:حجم].
- تدفق الطور المتحرك: 1.5 mL /min.
- طول موجة الكاشف: 210 nm.
- حجم الحقنة 20 µL.
- درجة حرارة فرن العمود $25^{O}C$.
- زمن احتفاظ مادة (HBB): RT = 5.6 min.

النتائج والمناقشة

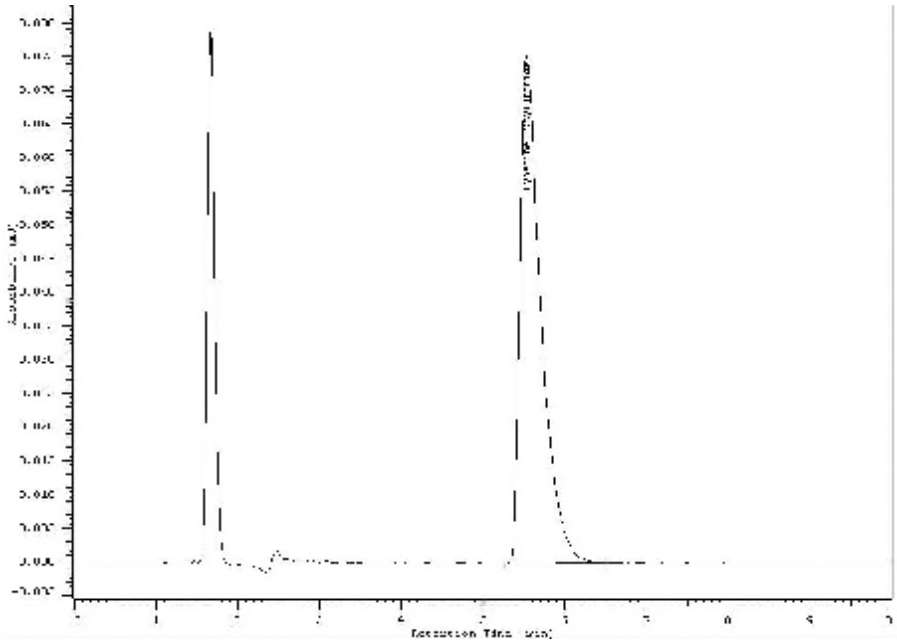
اختبار ملاءمة المنظومة System Suitability Test:

حُقن في هذا الاختبار المحلول المرجع ست مرات متتالية، وحُسبت بعدها قيم الـ%RSD لتكرارية: المساحة (AREA)، وزمن الاحتفاظ (Retention Time)، وعامل التذييل (Tailing Factor) وعدد الصفائح النظرية (N, Theoretical Plates)، وذلك بغرض التأكد من استقرارية عمل الجهاز من جهة، واستقرار الطريقة من حيث تكرارية القرائن الكروماتوغرافية المدروسة عند حقن المحلول المرجع نفسه ست مرات متتالية في الجهاز من جهةٍ أخرى.

الجدول (1) ملخص نتائج اختبار ملاءمة المنظومة، α=95% (confidence level) سوية الثقة، n=6

المحلول المرجع (تركيز [HBB]: 0.1002 mg/mL)				
الحقنة No.	**المساحة AREA**	**عامل التذييل Asy.**	**عدد الصفائح النظرية N**	**زمن الاحتفاظ R.T.(min)**
1	693153	1.84	3498	5.65
2	694081	1.84	3544	5.62
3	688911	1.80	3548	5.64
4	692306	1.84	3559	5.62
5	691540	1.80	3598	5.64
6	692483	1.83	3598	5.63
الوسطي	**692079**	**1.825**	**3557**	**5.63**
RSD%	**0.25**	**1.08**	**1.06**	**0.21**

نلاحظ من الجدول انخفاض قيمة الانحراف المعياري النسبي المئوي للقرائن الكروماتوغرافية المدروسة كلّها، وهذا يدلّ على مدى استقرارية المنظومة الكروماتوغرافية وتكرارية القرائن الكروماتوغرافية للطريقة المقترحة.



الشكل (2) كروماتوغرام المحلول العياري
محلول HBB, 0.1002 mg/mL، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210nm

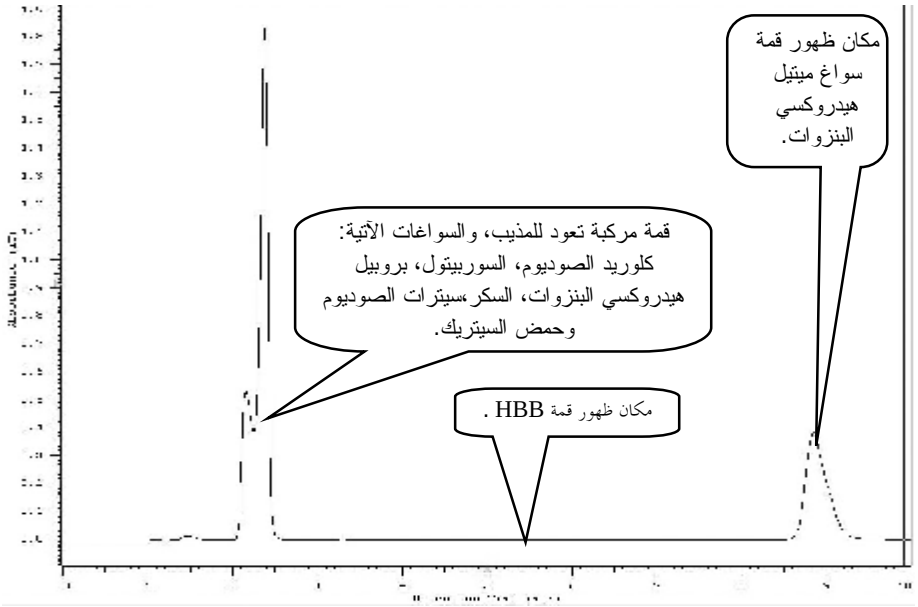
اختبار الدواء الوهمي Placebo Test:

والمقصود بالدواء الوهمي بأنه عبارة عن مستحضر دوائي تركيبه مماثل للمستحضر التجاري المراد تحليله، إذْ يُحضَّر مخبرياً بحيث يخلو من المادة الفعالة دوائياً المطلوب تحليلها، أي إنّه شراب مؤلف من السواغات فقط (Excipients). في البداية ولمعرفة تأثير كل سواغ على حدة يُحضَّر محلول إفرادي لكل سواغ، ومن ثم يُحقنُ في جهاز الـHPLC لمعرفة زمن احتفاظ كل سواغ على حدة ومن ثم يُحضّر شراب مكون فقط من سواغات شراب الـ(HBB)، ويُحلل هذا الشراب الوهمي المحضّر وفق طريقة التحليل المقترحة نفسها، إذْ تُراقب القمم العائدة للسواغات بعد مزجها معاً، للتأكد من أن القمم العائدة للسواغات لا تتداخل مع قمة المادة المحللة. إن تراكيب الأدوية المراد تحليلها يُستحصل عليها من المراجع العالمية [10]، وكان لشراب الـ(HBB) التركيب الموضّح في الجدول (2) الآتي:

الجدول (2) تركيب شراب هيوسين بوتيل بروماید 5 mg/5 mL

المادة الفعالة	هيوسين بوتيل بروماید	100 mg
السواغات	السكر	66000 mg
	محلول سوربيتول 70%	1930 mg
	سكارين الصوديوم	250 mg
	كلوريد الصوديوم	700 mg
	حمض الليمون	14 mg
	ميتيل هيدروكسي البنزوات	100 mg
	بروبيل هيدروكسي البنزوات	30 mg
	سيترات الصوديوم	15 mg
	نكهة البرتقال	0.0125 mL
	ماء نقي حتى	100 mL

فعند حقن مادة السوربيتول، لم تظهر لها إشارة تحليلية حتى بعد الانتظار مدة تزيد على ثلاثة أضعاف زمن الحقن المفترض، ولم تظهر سوى قمم صغيرة جداً لكل من السكر، وأيون الكلوريد الذي مصدره كلوريد الصوديوم، وحمض السيتريك وسيترات الصوديوم وبروبيل هيدروكسي البنزوات والسوربيتول، وذلك عند أزمنة احتفاظ R.T.<2min، أمَّا السكارين فأعطى قمة كروماتوغرافية زمن احتفاظها R.T.=2.1min، كما أعطت مادة ميتيل هيدروكسي البنزوات قمة كروماتوغرافية زمن احتفاظها R.T.=8.9min.



الشكل (3) الكروماتوغرام الخاص بحقنة تعود إلى محلول اختبار الدواء الوهمي محلول PLACEBO، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210nm

نلاحظ من الشكل خلو الكروماتوغرام العائد لحقنة الدواء الوهمي من أي قمم كروماتوغرافية قد تتداخل مع قمة الهيوسين بوتيل بروميد، وتظهر القمم الكروماتوغرافية العائدة لبعض السواغات عند أزمنة احتفاظ تبعدُ بقدرٍ كاف عن قمة الـHBB بشكلٍ ينفي أية مخاوف من أي تداخل ناتج من خلفية العينات علىً عمليةً تعيين الـHBB.

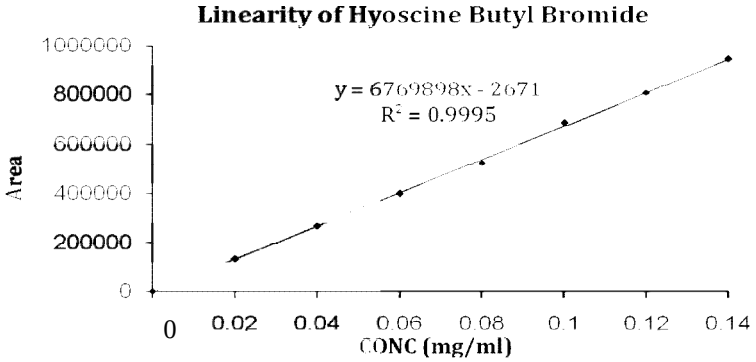
الخطية:

تُحضّر في هذا الاختبار سلسلة عيارية من الهيوسين بوتيل بروميد، بهدف مراقبة مدى العلاقة الخطية بين مساحة (و/أو ارتفاع) القمة الكروماتوغرافية والتركيز، وكان الخط العياري التالي، المرسوم وفق طريقة أصغر المربعات هو نتاج السلسلة العيارية المحضرة ضمن المجال من 0.02 mg/mL وحتى 0.14 mg/mL كما هو موضّح في الجدول (3) والشكلين(4،5) :

الجدول (3) ملخص نتائج اختبار الخطية

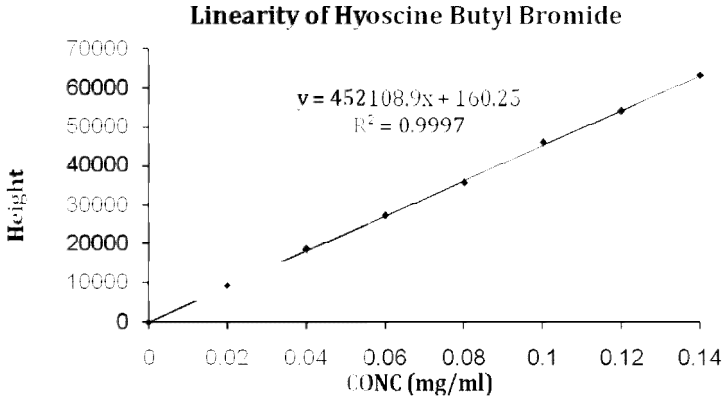
محلول HBB, 0.02-0.14 mg/mL، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210nm

St	C, mg/ml	AREA	Height
I	0.02	133518	9207
II	0.04	269119	18579
III	0.06	399547	27335
IV	0.08	525620	35747
V	0.10	688765	45979
VI	0.12	808221	54173
VII	0.14	944986	63443
R^2		0.9992	0.9996
SLOPE		6788975	450964
LOD	0.0012		
LOQ	0.004		



الشكل (4) المنحنى العياري الممثل للعلاقة الخطية بين تركيز الـــــ HBB والمساحة

محلول HBB, 0.02-0.14 mg/mL، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210 nm



الشكل (5) المنحنى العياري الممثل للعلاقة الخطية بين تركيز الـــــ HBB والارتفاع
محلول HBB ,0.02-0.14 mg/mL، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210 nm

نلاحظ من الجدول (3)، والأشكال [4-5] أن معامل الارتباط كان قريباً جداً من القيمة (1.00)؛ وهذا يدل على أن الخطية جيدة جداً تحليلياً ضمن مجالات التراكيز المدروسة لمادة الـــ(HBB) المُحللة.

الاسترجاعية:

تُحضّر هنا في هذا الاختبار محاليل معلومة التركيز من الهيوسين بوتيل بروماید وفق الطريقة المقترحة، وتُحقن بعدها في جهاز الكروماتوغرافيا، ومن ثم يُحسب تركيزها بنسبة مساحاتها إلى السلسلة العيارية المحضرة، وتحسب استرجاعية هذه المحاليل بنسبة التراكيز المحسوبة (الفعلية) على التراكيز المُحضّرة وضربها بـــ100 من العلاقة رقم (1).

$$Recovery_{\%} = \frac{C_A}{C_{Theo.}} \times 100 \ldots\ldots\ldots (1)$$

إذْ إنَّ:

Recovery%: الاسترجاعية محسوبة كنسبة مئوية.

C_A: تركيز المادة المحسوب وفق الطريقة.

$C_{Theo.}$: تركيز المادة المُحضّر (التركيز النظري).

نجد في الجدول الآتي نتائج استرجاعية ثلاث عينات تجريبية منسوبة إلى السلسلة العيارية السابقة:

الجدول (4) ملخص نتائج اختبار الاسترجاعية

محلول HBB ,0.11 – 0.07 – 0.05 mg/mL المذيب: الطور المتحرك، λ: 210nm

المادة	التركيز النظري mg/mL	التركيز المحسوب mg/mL	SD	RSD%	الاسترجاعية R%	X±δx
HBB	0.0500	0.0498	3.61×10^{-4}	0.72	99.60	0.0498±0.0007
	0.0700	0.0699	1.53×10^{-4}	0.22	99.90	0.0699±0.0030
	0.11	0.1100	1.53×10^{-4}	0.14	100.06	0.110±0.0003

نلاحظ من النتائج مدى التقارب بين التراكيز المحضرة والتراكيز المحسوبة وفق الطريقة المقترحة، وهذا ما تجلى من خلال قيم الاسترجاعية الجيدة، كما لاحظنا الدقة الجيدة من خلال انخفاض قيم الـ%RSD للمكررات المحللة (n=3) للهيوسين بوتيل بروماید.

التطبيق العملي:

طُبِّقت الطريقة المقترحة لتعيين الهيوسين بوتيل بروماید في المستحضرات الصيدلانية التجارية (الشرابات السائلة)، وكُرر قياس العينة ثلاث مرات ومن أجل مجموعة من العينات المختلفة، ثم أُخذ المتوسط الحسابي حسبما هو موضّح في الجدول (5). إذ لوحظ أن قيم الانحراف المعياري منخفضة وقيم الاسترجاعية مقبولة تحليلياً، مما يشير إلى دقة الطريقة وقابلية التكرارية الجيدة كما يتضح من الجدول (5)، وحُسبت النتائج بعدها كنسب مئوية، ووفق دستور الأدوية الأمريكي فمن المفترض أن تكون نسبة الهيوسين بوتيل بروماید تراوح ضمن المجال %[107.5–92.5] من الكمية المُصرَّح بها في تركيب الدواء، فعندما يكون التركيب المُصرح به للشراب على العبوة هو 5mg مادة فعالة في كل 5ml من الشراب، يكون تركيب الشراب موافقاً للدستور الأمريكي إذا كان التركيب الفعلي له واقعاً ضمن المجال السابق، أي ضمن mg [5.375 -4.625] لأجل كل 5 mL، ويُحسب تركيز الـ (HBB) كنسبة مئوية في العينة المُحلّلة مقارنةً بالتركيز الواجب توافره – نظرياً - في الشراب والمُعدّ كتركيز معادل [100%] من العلاقة رقم (2) [11].

الجدول (5) ملخص نتائج تحليل عينات لمستحضرات طبية تجارية

محلول [BUSCOMED & BUSCOPAN SYRUPS]، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210nm (α=95%، n=3)

اسم المستحضر	الشركة المنتجة	كمية الـ HBB، [mg/5mL]		C %	RSD%
		نظري	محسوب		
Buscomed Syrup	MEDICO [SYRIA]	5.0000	5.1115	102.23	0.062
Buscopan Syrup	Boehringer Ingelheim GmbH [GERMANY]	5.0000	5.2245	104.49	0.053

$$API\,\% = \frac{\text{Avg}(AREA)_{\text{pro}}}{\text{Avg}(AREA)_{\text{ref}}} \times \frac{\text{W}_{\text{ref}}}{V_{\text{pro}}} \times \frac{\text{Dilution pro}}{\text{Dilution ref}} \times \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots(2)$$

$$\frac{\text{Dilution Factore}_{\text{pro}}}{\text{Dilution Factore}_{\text{ref}}} \times \frac{\text{Dose}}{\text{Active Ing/Dose}} \times Potency = \%$$

إذ إنَّ: API%: النسبة المئوية للمادة الفعالة الموجودة في التركيبة (مثلاً: كل 5mL شراباً تحوي 5mg من مادة (HBB)، فتكون القيمة 5 mg /5mL تعادل 100% من القيمة المصرحة (نظرية بحسب التركيب)، أمّا API% فتكون القيمة الفعلية المحسوبة وفق الطريقة المقترحة.

$\text{Avg(Area)}_{\text{Pro/Ref}}$: متوسط قيم المساحة لثلاث حُقن مكررة للمحلول المستحضر/ المرجع.

W_{ref}: وزن المادة المرجعية مقدراً بـــ mg.

V_{Pro}: حجم محلول العينة mL.

$\text{Dilution}_{\text{Pro/Ref}}$: حجم المحلول الذي أُذيبت فيه العينة/المرجع.

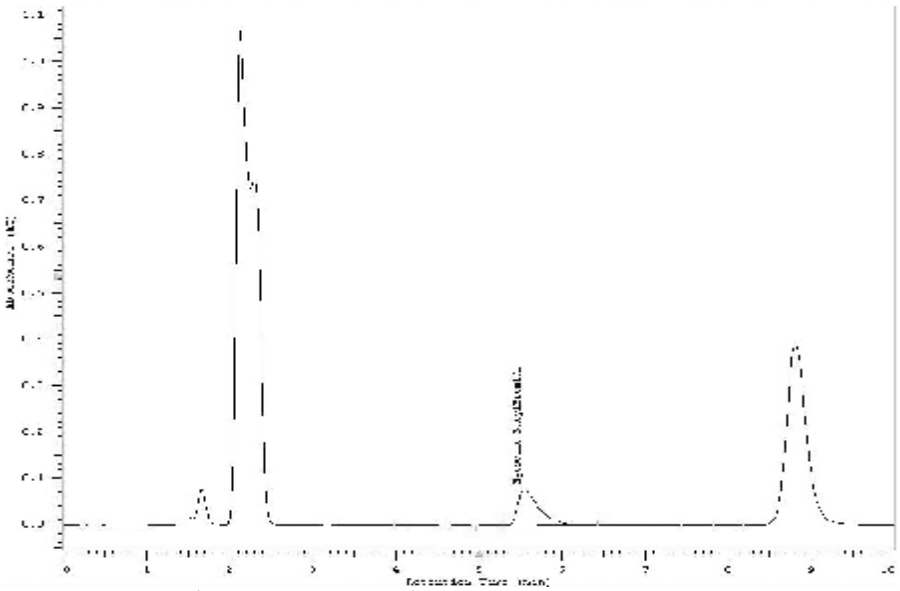
$\text{Dilution Factor}_{\text{Pro/Ref}}$: معامل تمديد محلول المستحضر/ المرجع.

Dose: الجرعة (مثلاً كل 5mL شراباً تحوي 5mg مادة فعالة، فتكون الـــ 5mL هي الجرعة).

Active ing.Dose: تركيز المادة الفعالة المحللة في الجرعـــة (5 mg/5mL فتكـــون 5mg هـــي القيمة).

Potency: فعالية المادة المرجعية التي حُضّر منها المحلول المرجع (نقاوة المادة المرجع).

معظم تطبيقات HPLC عند تعيين كميّ لدواء في مستحضر صيدلاني لايحتاج عادة إلى كثير من الخيارات لإيجاد الشروط المثالية للطور المتحرك وانتقاء العمود والمكشاف، ومن ثمَّ يمكن تنفيذ التحليل بسهولة فغالباً مايستعمل العمود ODS وطوراً متحركاً مكونـــاً من الميتانول أوالأسيتونتريل أو رباعي هيدروفوران مع الماء أومزائجهـــا فـــضلاً عـــن محلول وقاء مناسب لايؤثر في تأين بعض الزمر الوظيفية في الـــدواء ولا فـــي الطـــور الساكن؛ وهذا مايمكن ملاحظته في طرائق HPLC المستعرضة في المقدمة، ولكن الأمر يزداد صعوبة وتحدياً عند تعيين دواء في مستحضر صيدلاني، ويكـــون مطلوبـــاً حـــذف تداخل المواد الحافظة والملونات وبعض المواد التي لها خواص كيميائية مختلفة، ومن ثم تُجرف من العمود عند أزمنة مختلفة مما يُصّعب الحصول على زمن تحليل قصير. ولعل ماتميّزت به الطريقة المقترحة في هذه البحث هونجاحها في تعيـــين مـــادة دوائيـــة دون الحاجة إلى فصل أومعالجة مسبقة والحصول على نتائج مرضية.



الشكل (6) الكروماتوغرام الخاص بحقنة تعود إلى محلول عينة الشراب
محلول [BUSCOMED SYRUP]، المذيب: الطور المتحرك، λ: 210nm

الخلاصة

طُوِّرَت طريقة تحليلية كروماتوغرافيَّة سائلة عالية الأداء لتعيين الهيوسين بوتيل برومايد في الشرابات السائلة، وتتمتع الطريقة بالصِّحَّة والدقة ومدى خطية و استرجاعية جيدتين؛ وهذا ما أكدته الحسابات الإحصائية من حيث الاستَرجاعية والتكرارية وموافقة النتائج المحسوبة مع القيم المُصرّح بها من قبل الشركات الدوائية الصانعة.

REFERENCES

1. **Tytgat GN., 2007. Hyoscine butylbromide: a review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain; *PubMed [Drugs]*, Volume 67, Issue 9 , pp 1343-1357.**
2. **http://en.wikipedia.org/wiki/Quaternary_ammonium_compound.**
3. **en.wikipedia.org/wiki/Buty/Scopo/amine.**
4. **Ayman A. Gouda, 2010. Kinetic spectrophotometric determination of Hyoscine butylbromide in pure form and in pharmaceutical formulations; *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 3, Issue 1, Pages 33-38.**
5. **El-Saharty, Y. S., Metwaly F. H., Refaat M., El-Khateeb S. Z.; 2007. Development of membrane electrodes for the selective determination of hyoscine butylbromide, *Talanta*, Volume 72, Issue 2, Pages 675-681.**
6. **Nilgün Karali, Sumru Özkirimli, Aysel Gürsoy; 1998. Simultaneous determination of medazepam and hyoscine butylbromide in tablets by second-derivative ultraviolet spectrometry, *Il Farmaco*, Volume 53, Issue 1, Pages 62-64.**
7. **Ayman A. Gouda, Zeineb El Shafey, Nagda Hossny, Rham El-Azzazy; 2008. Spectrophotometric determination of hyoscine butylbromide and famciclovir in pure form and in pharmaceutical formulations, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 70, Issue 4, Pages 785-792.**
8. **Oi-Wah Lau, Chuen-Shing Mok; 1997. High-performance liquid chromatographic determination of atropine and atropine-like alkaloids in pharmaceutical preparations with indirect conductometric detection, *Journal of Chromatography A*, Volume 766, Issues 1–2,4, Pages 270-276.**
9. **Parissi-Pouloua M. & Panderia, I. 1999. Determination of Hyoscine N-Butyl Bromide, Lidocaine Hydrochloride, and Paracetamol in Injection Forms using Solid-Phase Extraction, High-Performance Liquid Chromatography, and UV-VIS Spectrophotometry, *J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL.* , V.22(7), pp. 1055 – 1086.**
10. **Sarfaraz K. Niazi; 2009 - Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations Liquid Products; *Informal Healthcare USA, Inc.*, Second Edition, 2738P.**
11. **Michael W. Dong; 2006. MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS; *A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION*, 286P.**