

تعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي في مجموعة من المستحضرات الدوائية العينية باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

أيهم عبد البر الفاخوري⁽¹⁾ و عصام القلق⁽²⁾ و محمد جمال الخطيب⁽³⁾

تاريخ الإيداع 2013/08/07

قبل للنشر في 2013/11/20

الملخص

طُورت في هذا العمل طريقة تحليلية كروماتوغرافية لتعيين كلوريد البنزألكونيوم في مجموعة من القطرات العينية المحتوية على الجنتاميسين سلفات والتوبراميسين والقطرات العينية اللزجة (الجيل) المحتوية على الفوسيديك أسيد. نُفذت الطريقة باستخدام عمود كروماتوغرافي من النوع KNAUER CN, 5 μ m (4.6 \times 250mm) وطور متحرك يتألف من محلول موقفي خلالي: أسيتونتريل بنسبة مزج حجمية (70:30) على الترتيب ومعدل سرعة تدفق 1.3mL/min وكاشف طيفي ضُبط عند الطول الموجي 215nm ودرجة حرارة فرن العمود 25°C وحجم الحقنة 80 μ L. دُرست الخطية على كامل المجال الممتد من 0.008 mg/mL وحتى 0.028mg/mL وكانت قيمة معامل الارتباط $R^2 = 0.9992$. راوحت القيم المتوسطة للاسترجاعية بين 99.56% وحتى 99.77%، كما بلغ حد الكشف الأصغري 0.0025 mg/mL. أشارت الاختبارات كلها التي أجريت والنتائج التحليلية إلى أن الطريقة تتمتع بالصحة والدقة والصلاحية (validation)، وأمكن تطبيقها بنجاح على تحليل مجموعة من العينات المحلية والأجنبية الصنع دون الحاجة لمعالجة أو فصل مسبق لمواد تدخل في التركيب الكيميائي للمستحضر.

الكلمات المفتاح: البنزألكونيوم، القطرات العينية، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

(1) طالب دكتوراه، (2) الأستاذ المشرف، (3) الأستاذ المشرف المشارك، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية

Chromatographic Determination of Total Benzalkonium Chloride [BAC] in Some of Ophthalmic Preparations by HPLC

A. A. Al-Fakhory⁽¹⁾; I. Al-Kalak⁽²⁾,
and M. J. Al-khatib⁽³⁾

Received 07/08/2013

Accepted 20/11/2013

ABSTRACT

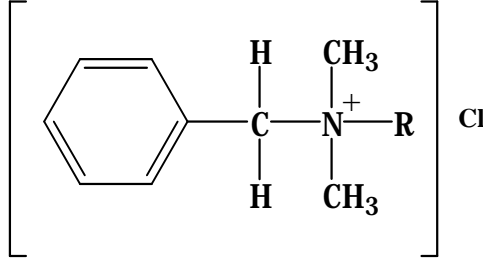
An analytical chromatographic method for determination of total benzalkonium chloride in eye drops preparations samples containing gentamicin sulphate, tobramycin and viscous eye drops samples containing fusidic acid has been developed. The method was carried out using chromatographic column KNAUER CN, 5 μ m (4.6x250mm) and acetate buffer: acetonitrile (30:70, v/v) respectively as a mobile phase with flow rate 1.3mL/min. UV detection carried out at 215nm. The method was linear over the selected concentrations ranged from 0.008 mg/mL to 0.028 mg/mL ($R^2=0.9992$) and the detection limit was 0.0025 mg/mL. The mean percent recovery ranged from 99.56% to 99.77%. The carried out tests in this work, and the analytical results demonstrated that the method has a good accuracy, precision and validation. The method determined successfully the total benzalkonium chloride in local and foreign made samples with no need to separate benzalkonium chloride from its matrix.

Key words: Eye drops, Benzalkonium chloride, HPLC.

⁽¹⁾PhD., Student, ⁽²⁾Supervisor, ⁽³⁾Associated Supervisor, Department of Chemistry, Faculty of sciences, Damascus University, Syria.

المقدمة

يُعرفُ دستور الأدوية الأمريكي كلوريد البنزألكونيوم بأنه مزيج من كلوريدات الألكيل بنزِيل دي ميثيل أمونيوم، وله الصيغة المجرّدة $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]Cl$ إذ يُمثّل الجذر R مزيجاً من الألكيلات التي تتضمن بعض السلاسل الكربونية أو كلها بدءاً من $n-C_8H_{17}$ ووصولاً إلى السلاسل $n-C_{12}H_{25}$ ، $n-C_{14}H_{29}$ ، $n-C_{16}H_{33}$ التي تُشكّل القسم الأكبر من المزيج المشكّل لكلوريد البنزألكونيوم. ولكلوريد البنزألكونيوم الوزن الجزيئي المتوسط 360.



الشكل (1) الصيغة المنشورة لكلوريد البنزألكونيوم

إذ إن R تراوح بين $n-C_8H_{17}$ و $n-C_{16}H_{33}$

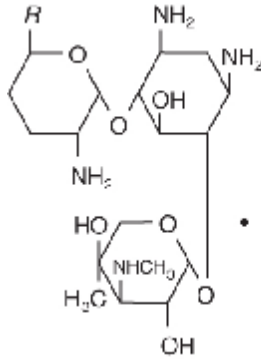
يُعدُّ كلوريد البنزألكونيوم من المركبات الأمونيومية الرابعة التي تُستخدم على نطاق واسع في الصناعات الصيدلانية كمواد حافظة مضادة للبكتيريا مثلها مثل العديد من المركبات الشبيهة بها من مجموعة المواد الفعالة سطحياً الكاتيونية مثل السترامايد.

وكلوريد البنزألكونيوم من أكثر المواد الحافظة الشائعة الاستخدام في المستحضرات الدوائية العينية وعند تركيز ضمن المجال $0.01-0.02\%$ w/v، وتستخدم عادةً بالتوازي مع استخدام مواد حافظة أخرى من أهمها الـEDTA عند التركيز 0.1% وذلك من أجل تعزيز نشاطها المضاد للبكتيريا. ويراوح تركيز كلوريد البنزألكونيوم في المستحضرات الدوائية الأنفية والأذنية ضمن المجال $0.002-0.02\%$ w/v، ولا تتحصر استعمالته كمادة حافظة في الصناعات الدوائية وإنما تتعداها كمادة حافظة في صناعة مواد التجميل ومادة معززة لامتصاص الأدوية الجلدية مثل الأدوية المحتوية على لورازيبام [1].

طور Santoi ورفاقه [2] طريقة تحليلية كروماتوغرافية سائلة عالية الأداء للتعيين المتزامن لكلوريد البنزألكونيوم وسلفات الأتروبين في القطرات العينية وأجريت عملية الفصل والتعيين باستخدام عمود كروماتوغرافي من النوع C8، وطور متحرك يتألف من الأسيتونتريل وحمض الخل الممدد بنسبة مزج حجمية (20:80) بوجود 6mM من بروميد رباعي ميثيل أمونيوم وعند طول موجة الكاشف الطيفي 260 nm.

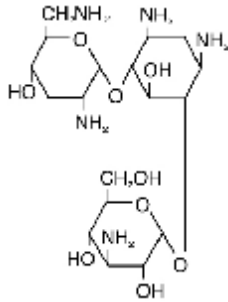
أما Gaber ورفاقه [3] فقد استخدموا مسرياً كربونياً مُعدلاً جديداً يقوم على الارتباط الشاردي بين كلوريد البنزألكونيوم وحمض الفوسفومولبدينيوم، ودرست خطية عملية التعيين ضمن المجال $1.3 \times 10^{-7} - 1.7 \times 10^{-4}$ M، وكان حد الكشف للطريقة المقترحة مساوياً للقيمة 1.0×10^{-7} M، ويتميز المسرى المطور بسرعة استجابته وثباتيته التي راوحت بين 5-8 sec، وحقق المسرى نتائج جيدة جداً في مجال للحموضة يقع ضمن pH 5.7 - 8.6، كما أنه لم يتأثر بما يُرافق كلوريد البنزألكونيوم من مواد عضوية ومعدنية في العينات المحللة. وقدم غوميز ورفاقه في العمل [4] طريقة تحليلية كروماتوغرافية لتعيين كلوريد البنزألكونيوم في القطرات العينية، وتقوم الطريقة على حقن محلول العينة مباشرة في عمود 5µm Spherisorb-CN وطور متحرك مكون من الأسيتونتريل ومحلول 0.1% من ثلاثي إيثيل الأمين في الماء بنسبة مزج حجمية (60:40) بالترتيب فكانت الطريقة سريعة وبسيطة وقابلة للتكرار، وتبين أنها جيدة التطبيق في مخابر الرقابة الدوائية ودراسات الثباتية. وطور الباحث Wilczynska ورفاقه [5] طريقة كروماتوغرافية لتعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي ومكوناته كل منها على حدة في البخاخات المحتوية على الهرمونات والستيرويدات. هدفت الطريقة المطورة، بشكل أساسي، إلى تعيين مكونات كلوريد البنزألكونيوم بشكل إفرادي من أجل الوصول إلى التعيين الكلي له، وقد استخدمت عموداً من نوع CN وطوراً متحركاً مكوناً من محلول موقفي خلالي وأسيونتريل. إن هذه الطريقة سهلة التنفيذ ولا تحتاج العينات المحللة فيها إلى أي معالجات مسبقة لعملية التعيين الكمي عند استخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

وقدم Hou ورفاقه [6] طريقة تحليلية لتعيين كلوريد البنزألكونيوم في المستحضرات الدوائية العينية تقوم على الرحلان الكهربائي الشعري، وكانت الشروط المثلى لهذه الطريقة المقترحة وجود محلول موقفي فوسفاتي وأسيونتريل عند pH يساوي 4.0 وكمون قدره 15kV وحُسنت التكرارية للطريقة وزمن الهجرة بإدخال معيار داخلي هو ثلاثي إيثيل بنزيل أمونيوم كلوريد. أعطت الطريقة خطية جيدة ضمن المجال $1.0 - 20 \mu\text{g/mL}$ ، وكانت قيمة معامل الارتباط R^2 لا تقل عن القيمة 0.99، وتعدّ الطريقة بالمجمل فعالة وبسيطة وسريعة، وأمكن تطبيقها بنجاح على مجموعة من العينات الدوائية. يُستعمل كلوريد البنزألكونيوم بوصفه مادةً حافظةً في القطرات العينية المحتوية على سلفات الجنتاميسين التي تُعد إحدى المواد الصادة القابلة للانحلال في الماء من مجموعة الأمينوغلوكوزيد، وهي فعالة ضد أنواع كثيرة من الجراثيم الممرضة إيجابية الغرام وسلبية الغرام، وتُستطب هذه القطرة في حالات المعالجة الموضعية لأخماج العين الخارجية وملحقاتها الناجمة عن الجراثيم التي لا تقاوم الجنتاميسين، وتشمل هذه الأخماج: التهاب الملتحمة، والتهاب القرنية والملتحمة، والتقرحات القرنية. ويبين الشكل (2) الصيغة المنشورة لسلفات الجنتاميسين [7].



Gentamicin	R
C ₁	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{HN} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
C ₂	$\text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3$
C _{3A}	CH_2NH_2

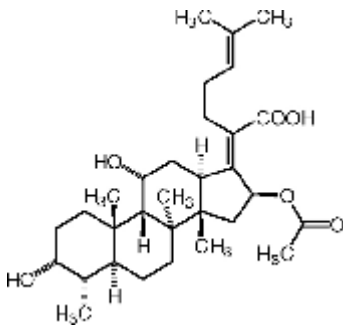
الشكل (2) الصيغة المنشورة لسلفات الجنتاميسين



الشكل (3) الصيغة المنشورة للتوبراميسين

كما أن كلوريد البنزالكونيوم يدخل في تركيب القطرات العينية المحتوية على التوبراميسين، وتعد مادة التوبراميسين مضاداً حيوياً واسع الطيف في المعالجة موضعية للأخماج الخارجية التي تصيب العين، وهو من زمرة الأمينوغليكوزيدات التي لها تأثير فعال ضد الجراثيم سلبية الغرام والجراثيم إيجابية الغرام المسببة للأمراض العينية، وتستخدم هذه القطرة في معالجة الأخماج الخارجية للعين وملحقاتها الناشئة من بعض الجراثيم [7].

أما في القطرات العينية اللزجة المحتوية على الفوسيديك أسيد فإن المادة الحافظة المعتمدة فيها هي أيضاً كلوريد البنزالكونيوم. إن حمض الفوسيديك هو مضاد حيوي ويعطى علاجاً موضعياً (ككريم أو مرهم) لملوثات الجلد مثل القوباء والدواخس (التهاب الجلد حول الظفر)، أو كعلاج موضعي لالتهابات مصدرها ملتحمة العين. ويبيّن الشكل (4) الصيغة المنشورة للفوسيديك أسيد [7].



الشكل (4) الصيغة المنشورة للفوسيديك أسيد

أهمية البحث وأهدافه

هدف هذا العمل إلى تعيين كلوريد البنزألكونيوم الذي يدخل بوصفه مادةً حافظةً في العديد من المستحضرات الدوائية، بطريقة سهلة وسريعة باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المدمجة مع كاشف طيفي من نوع (PDA: Photodiode Array)، علماً بأن دستورَي الأدوية الأمريكي والبريطاني يقدمان طريقة تحليلية كروماتوغرافية لتعيين مكونات كلوريد البنزألكونيوم في حالتها النقية فقط، إلا أن هذه الطريقة غير فعالة لتعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي في المستحضرات الدوائية [8,9]

مواد البحث وطرائقه

الأجهزة المستخدمة

- جهاز كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء Chromatograph من طراز HITACHI مؤلف من الوحدات الآتية:
- واجهة حوسبة الكترونية لربط جهاز الكروماتوغرافيا بالحاسوب (Organizer).
- مضخة رباعية المآخذ مدمجة مع طارد للغازات (L-2130) Pump.
- حاقتن آلي (L-200) Auto-sampler يتسع لعدد من المحاليل العيارية والعينات تصل حتى 200 عينة.
- فرن لضبط درجة حرارة العمود الكروماتوغرافي (L-2300) Column Oven .
- كاشف طيفي يعمل في المجالين المرئي وفوق البنفسجي وفق تقنية محزوزة الحيود Diode Array Detector (L-2455) DAD .
- ويجري التحكم بالوحدات جميعها من خلال الحاسوب.
- العمود الكروماتوغرافي: KNAUER CN, 4.6x 250mm, 5µm
- 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 و بمجس حراري.
- مرشحات ميكرونية لترشيح المحاليل قبل حقنها في جهاز الـHPLC ولترشيح الطور المتحرك بعد تحضيره وقبل إمراره في الجهاز من نوع (Millipore Millex-HN) (0.45µm Nylon).
- أجريت التجارب كلها باستخدام أدوات زجاجية من الصنف 'A class'.

- الماء المستخدم في تحضير الطور المتحرك والاستعمالات الأخرى كلها هي من النوع عالي النقاوة 'Ultra-Pure Water' إذ تمّ الحصول عليه من جهاز مخبري لتنقية الماء ذي ثلاث مراحل 'SG'.
- جرت تخلية الطور المتحرك من الغازات باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية 'Ultrasonic Bath - Elma'.

المواد الكيميائية

- محاليل كلوريد البنزألوكونيوم محضرة من مواد قياسية مرجعية دستورية 'USP reference Standards'.
- خلات الصوديوم ثلاثية الهيدرات، وأسييتونتريل، وحمض الخل الثلجي من شركة 'ROTH' وكانت كلها ذات نقاوة تلبية متطلبات تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC Grade).
- عينات واقعية لمستحضرات دوائية عبارة عن قطرات عينية تحتوي على الجنتاميسين سلفات وقطرات عينية تحتوي على التوبراميسين وقطرة عينية لزجة (جل عيني) تحتوي على الفوسيديك أسيد، وهي من إنتاج مختبرات ميديكو للصناعات الدوائية- سورية، وعينات أجنبية الصنع من إنتاج شركات ألكون الأمريكية (ALCON) وشركة ليو الدنماركية (LEO).
- أجريت الاختبارات والتحليل المخبرية كلها في شركة مختبرات ميديكو للصناعات الدوائية (حمص)، وقد أمنت الشركة الأجهزة والأدوات والمواد الكيميائية المخبرية اللازمة لإنجاز البحث.

تحضير المحاليل

- المحلول الموقى: حضر المحلول الواقي الداخلى في تركيب الطور المتحرك بحل 10.88g من خلات الصوديوم المائية في 975mL من الماء عالي النقاوة، ويضبط pH المحلول عند القيمة 4.5 باستخدام حمض الخل الثلجي، ثم يتم الحجم حتى 1000 mL باستخدام الماء المقطر.
- الطور المتحرك: كنتيجة للاختبارات التي تم القيام بها تبين أن الطور المتحرك الأمثل، لتعيين كلوريد البنزألوكونيوم، يتألف من الأسييتونتريل ومحلول موقى خلاتي (pH=4.5±0.05) بنسبة مزج حجمية (30:70) على الترتيب، وبعد تمام مزج مكونات الطور يرشح باستخدام ورق ترشيح ميكروني 0.45µm ثم يوضع الطور المتحرك في حمام جهاز أمواج فوق صوتية مدة خمس دقائق قبل إمراره في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة لطرده الغازات المنحلة في الطور المتحرك.

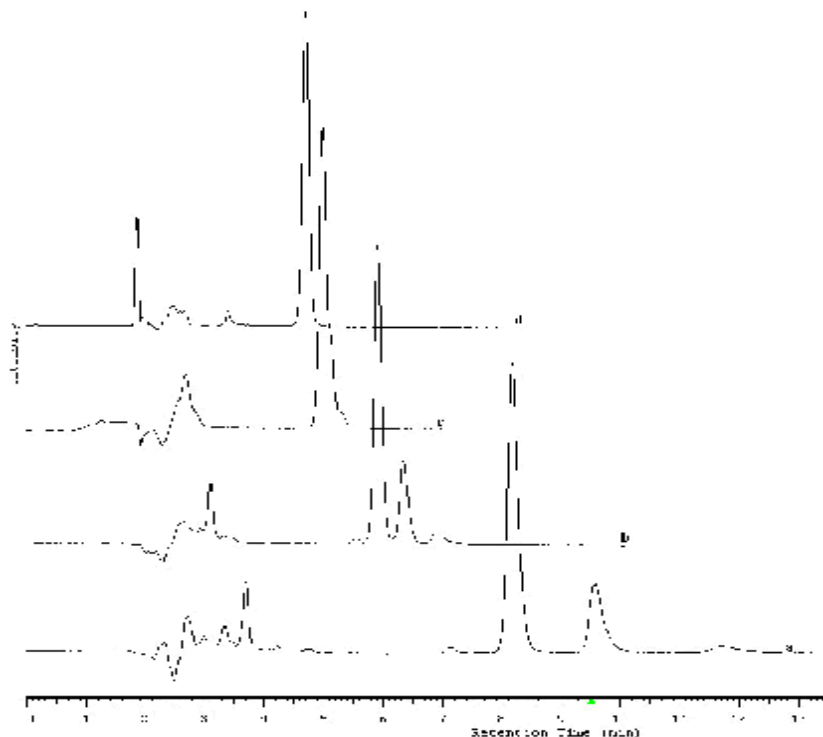
- المذيب: اعتمد الماء المقطر كمذيب لمحاليل الشواهد والعينات، عدا تحليل عينات الجل العيني المحتوي على الفوسيديك أسيد، فقد استخدم الميثانول، ولم يكن لهذا الأمر أي تأثير في حساسية الطريقة أو أي معايير أخرى، عدا كون الماء أقل تكلفةً وضرراً كيميائياً على الصحة.
- المحلول المرجع: يوزن بدقة 25mg من مادة البنزألكونيوم كلوريد عالي النقاوة، وتنتقل إلى دورق حجمي سعة 50mL، ثم تحل في 20mL من المذيب، ويتم الحجم حتى العلام باستخدام المذيب نفسه. ينقل 2mL من المحلول باستخدام ماصة عيارية إلى دورق حجمي سعة 50mL ويتم الحجم حتى العلام باستخدام المذيب نفسه، يرشح قسم من المحلول باستخدام مرشحة ميكروئية 0.45 µm يصبح بذلك المحلول جاهزاً للتحليل.
- محلول عينات القطرة: يؤخذ 5 mL من محلول القطرة إلى دورق حجمي سعة 25mL باستخدام ماصة عيارية، ويتم الحجم حتى العلام باستخدام المذيب، يرشح قسم من المحلول باستخدام مرشحة ميكروئية 0.45 µm يصبح بذلك المحلول جاهزاً للتحليل.
- محلول عينة الجل العيني: تؤخذ وزنة قدرها 5g من عينة الجل العينية في بيشر سعة 100 mL ويضاف إليها 25 mL من الميثانول، وتوضع العينة على محرك مغناطيسي مدة 15 دقيقة. يُنقل قسم من المحلول الناتج إلى أربعة أنابيب اختبار، وتوضع في المثقلة مدة 20 دقيقة ذات السرعة 4500 RPM، ومن ثم يرشح قسم من المحلول الرائق في الطبقة العلوية من الأنابيب باستخدام مرشحة ميكروئية 0.45 µm. يصبح بذلك المحلول جاهزاً للتحليل.

الشروط الكروماتوغرافية:

- بهدف التوصل إلى أنسب الشروط الكروماتوغرافية لتعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي، أجريت مجموعة من التجارب المخبرية وتم التوصل إلى الشروط الآتية:
- العمود الكروماتوغرافي: KNAUER CN, 4.6×250 mm, 5µm.
 - الطور المتحرك: أسيتونتريل: محلول موقفي خلاتي بنسبة حجمية (30:70) بالترتيب.
 - سرعة تدفق الطور المتحرك: 1.3mL/min.
 - طول موجة الكاشف الطيفي: 215nm.
 - حجم الحقنة 80 µL.
 - درجة حرارة فرن العمود 25°C.
 - المذيب: الماء المقطر.

الطريقة المقترحة وتطويرها:

درست العوامل كلها التي قد تؤثر في عملية تعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي في القطرات العينية الخاضعة للدراسة إذ جرى الحرص على الحصول على قمة وحيدة تمثل كامل المحتوى من كلوريد البنزألكونيوم سواء في محلول الشاهد أو العينات، ففي أثناء دراسة تأثير تركيب الطور المتحرك المحضر من مزج محلول الأسيونتريل والمحلول الموقى بنسب مختلفة واستخدام الجرف الثابت تمكنا من الحصول على أربعة كروماتوغرامات تعود للسلاسل المختلفة لكلوريد البنزألكونيوم وهي: $n-C_{10}H_{21}$ و $n-C_{12}H_{25}$ و $n-C_{14}H_{29}$ و $n-C_{16}H_{33}$ كما هو مبين في الشكل (6).

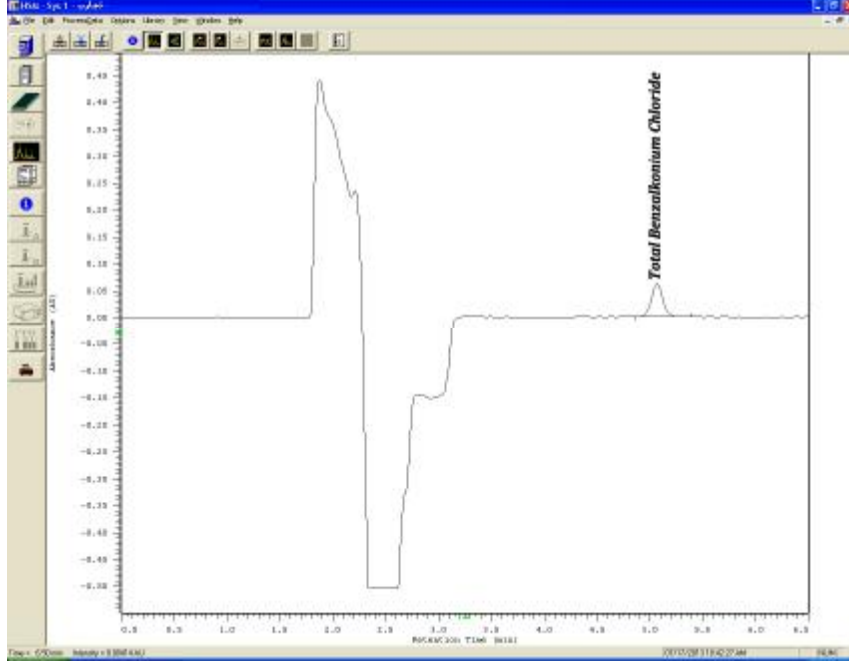


الشكل (6) تأثير تركيب الطور المتحرك في فصل مكونات كلوريد البنزألكونيوم بالجرف الثابت

Column: CN, 5 μ m – $\lambda=260$ nm

المحلول الموقى (%)	الأسيتونتريل (%)	الكروماتوغرام
60	40	a
50	50	b
40	60	c
30	70	d

في أثناء الدراسة لوحظ كما ورد في الشكل (6) السابق اتحاد القمم الكروماتوغرافية العائدة لكلوريد البنزألكونيوم معاً لتشكل قمة كروماتوغرافية واحدة (الكروماتوغرام d في الشكل 6) التي تعبر عن كلوريد البنزألكونيوم الكلي، إلا أن تعيينه عند طول الموجة 215nm كما هو الحال في الشكل (7) أعطى حساسية أكبر واسترجاعية أفضل لذلك اعتمدت نتائج القياسات المنفذة عند طول الموجة 215nm.



الشكل (7) الكروماتوغرام العائد لكلوريد البنزألكونيوم الكلي في المحلول المرجع

Column: CN, 5 μ m – λ =215 nm – Mob. Phase: ACN: Buffer (70:30) respectively.

صلاحية الطريقة (Method Validation):

أجريت مجموعة من الاختبارات للتأكد من فاعلية الطريقة وهي: اختبار ملاءمة المنظومة والخطية والدقة والصحة وحدّ الكشف.

اختبار ملاءمة المنظومة (System Suitability Test):

في هذا الاختبار حُقِن المحلول المرجع ست مرات متتالية، وحُسبت بعدها قيم 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 جهة أخرى، كما هو موضح في الجدول (1):

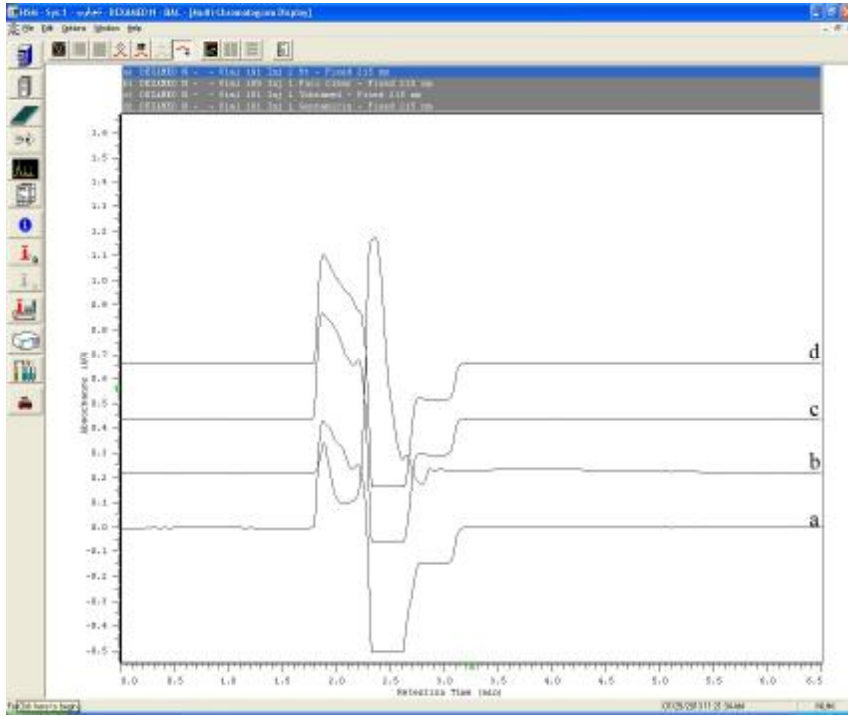
الجدول (1) ملخص نتائج اختبار ملاءمة المنظومة، ($n = 6, \alpha = 95\%$)

المحلول المرجع (تركيز [BAC]: 0.02mg/mL)				
الحقنة No.	المساحة AREA	عامل التذييل Asy.	عدد الصفائح النظرية N	زمن الاحتفاظ R.T.(min)
1	259872	1.05	9782	5.08
2	259330	1.06	9722	5.08
3	258892	1.06	9736	5.09
4	259487	1.05	9802	5.08
5	259932	1.05	9782	5.09
6	259244	1.06	9809	5.09
القيمة المتوسطة	259459	1.055	9772	5.085
RSD%	0.15	0.52	0.36	0.11

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

اختبار الدواء الوهمي PLACEBO Test:

والمقصود بالدواء الوهمي بأنه عبارة عن مستحضر دوائي تركيبه مماثل للمستحضر التجاري المراد تحليله، إذ يُحضّر مخبرياً بحيث يخلو من المادة الفعالة دوائياً المطلوب تحليلها، أي إنه قطرة مؤلفة من السواغات فقط (Excipients). في البداية ولمعرفة تأثير كل سواغ على حدة يُحضّر محلول إفرادي لكل سواغ، ومن ثم يُحقن في جهاز HPLC لتحديد زمن احتفاظ كل سواغ على حدة، ومن ثم تحضر قطرة تتكون فقط من سواغات القطرة المراد تحليلها، وتحلل هذه القطرة الوهمية المحضرة وفق طريقة التحليل المقترحة نفسها، إذ تراقب القمم العائدة للسواغات بعد مزجها معاً، للتأكد من أن القمم العائدة للسواغات لا تتداخل مع قمة المادة المحللة (قمة كلوريد البنزألونيوم). إن تراكيب الأدوية المراد تحليلها يُستحصل عليها من المراجع العالمية [10]. ولاحظنا من خلال الدراسة أن أياً من السواغات والمواد الدوائية الفعالة لم تتداخل مع قمة كلوريد البنزألونيوم المستهدفة بالدراسة كما في الشكل (9).



الشكل (8) الكروماتوغرام العائد لحقنة اختبار الـ PLACEBO للقطرات الداخلة في الدراسة
Column: CN, 5 μ m – λ =215 nm – Mob. Phase: ACN:Buffer \equiv 70:30
a: المحلول الشاهد، b: دواء وهمي للفوسيديك أسيد، c: دواء وهمي للتوبراميسين، d: دواء وهمي لسلفات الجنتاميسين

يلاحظ من الشكل (8) خلو الكروماتوغرام من أي قمم كروماتوغرافية قد تتداخل مع قمة كلوريد البنزألكونيوم في القطرات المُحللة، وهذا يؤكد عدم وجود تداخلات ناجمة من السواغات.

الخطية:

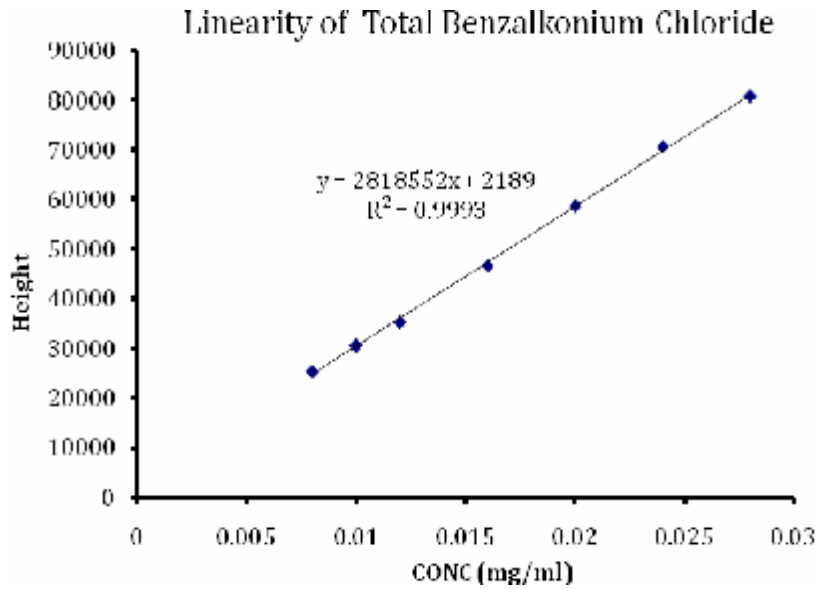
تُحضّر في هذا الاختبار سلسلة عيارية من كلوريد البنزألكونيوم بهدف مراقبة مدى العلاقة الخطية بين مساحة (و/أو ارتفاع) القمة الكروماتوغرافية والتركيز، وكان الخط العياري التالي والمرسوم وفق طريقة أصغر المربعات هو نتاج السلسلة المعيارية المحضرة ضمن المجال من 0.008mg/mL، وحتى 0.028mg/mL كما هو موضّح في الجدول (2) والشكلين (9,10):

الجدول (2) ملخص نتائج اختبار الخطية

محلول BAC، 0.008-0.028 mg/mL، المذيب: الماء المقطر، λ : 215nm

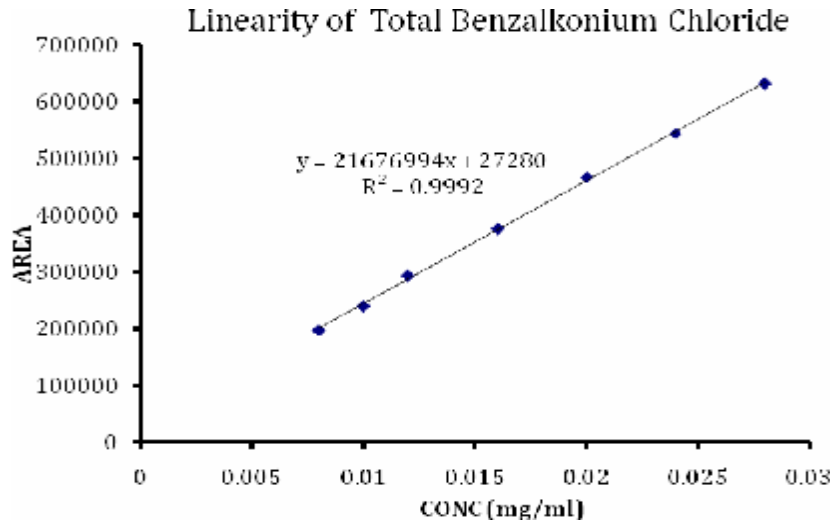
St	C, mg/mL	AREA	Height
I	0.008	196862	25317
II	0.010	240191	30427
III	0.012	292835	35358
IV	0.016	375628	46751
V	0.020	467738	58701
VI	0.024	543956	70648
VII	0.028	631636	80714
R ²		0.9992	0.9993
SLOPE		21676994	2818552
LOD	0.0025		
LOQ	0.0113		

حد الكشف الكمي الأصغري (LOQ) و حد الكشف الكيفي الأصغري (LOD) (limit of detection) حد الكشف الكمي الأصغري.



الشكل (9) المنحنى العياري الممثل للعلاقة الخطية بين تركيز الـ BAC والارتفاع

محلول BAC، 0.008-0.028 mg/mL، المذيب: الماء المقطر، λ : 215 nm



الشكل (10) المنحنى العياري الممثل للعلاقة الخطية بين تركيز الـ BAC ومساحة القمة

محلول BAC، 0.008-0.028 mg/mL، المذيب: الماء المقطر، λ : 215 nm

نلاحظ من الجدول (2) والأشكال [9، 10] أن معامل الارتباط كان قريباً جداً من القيمة (1.00)، وهذا يدل على أن الخطية جيدة جداً ضمن مجالات التركيز المدروسة لمادة الـ (BAC) المُحللة.

الاسترجاعية:

تُحضّر، هنا في هذا الاختبار، محاليل معلومة التركيز من كلوريد البنزألكونيوم وفق الطريقة المقترحة ويجري بعدها حقنها في جهاز الكروماتوغرافيا، ومن ثم يُحسب تركيزها بنسبة مساحتها إلى السلسلة المعيارية المحضرة، وتحسب استرجاعية هذه المحاليل بنسبة التراكيز المحسوبة (الفعلية) على التراكيز المُحضّرة وضربها بـ 100 من العلاقة رقم (1).

$$Recovery\% = \frac{C_A}{C_{Theo.}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

إذ إنّ:

Recovery%: الاسترجاعية محسوبة كنسبة مئوية.

C_A : تركيز المادة المحسوب وفق الطريقة.

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

نجد في الجدول (3) نتائج استرجاعية ثلاث عينات تجريبية منسوبة إلى السلسلة العيارية السابقة:

الجدول (3) ملخص نتائج اختبار الاسترجاعية

محلول BAC، 0.0090 – 0.0140 – 0.0250، المذيب: الماء المقطر، λ : 210 nm

X± δ x	الاسترجاعية R%	RSD%	SD	التركيز المحسوب mg/mL	التركيز النظري mg/mL	المادة
0.00896±0.00016	99.56	0.89	8.00×10 ⁻⁵	0.00896	0.0090	BAC
0.01396±0.00170	99.69	0.61	9.00×10 ⁻⁵	0.01396	0.0140	
0.02494±0.00013	99.77	0.26	6.00×10 ⁻⁴	0.02494	0.0250	

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 RSD% للمكررات المحللة (n=3) لكلوريد البنزألكونيوم.

التطبيق العملي:

طبقت الطريقة المقترحة لتعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي في المستحضرات الصيدلانية التجارية (القطرات العينية)، وكرر قياس العينة ثلاث مرات، ثم أخذ المتوسط الحسابي حسبما هو موضح في الجدولين (4-5).

الجدول (4) ملخص نتائج تعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي في مجموعة من القطرات العينية المحلية والأجنبية

RSD%	كمية كلوريد البنزألكونيوم mg/mL		الشركة المنتجة	اسم المستحضر
	نظري	محسوب		
0.22	0.10039	0.100	ميديكو MEDICO	Gentamicin_Medico
0.19	0.10043		ميديكو MEDICO	TOBRAMED
0.25	0.10019		الدلتا DELTA	TOBRABIOTIC
0.31	0.10059		ألكون ALCON	Gentamicin Sulphate ophthalmic solution
0.24	0.10176		ألكون ALCON	TOBREX

الجدول (5) ملخص نتائج تعيين كلوريد البنزألكونيوم الكلي في مجموعة من القطرات العينية للزجة (الجل العيني) المحلية والأجنبية

RSD%	كمية كلوريد البنزألكونيوم mg/g		الشركة المنتجة	اسم المستحضر
	محسوب	نظري		
0.37	0.10194	0.100	MEDICO ميدكو	FUCI CLEAR
0.54	0.10086		LEO ليو	FUCITHALMIC

الخلاصة

أثبتت النتائج التحليلية والاختبارات التي أجريت في هذا البحث صلاحية الطريقة المقترحة وصحتها ودقتها، وأمكن تطبيقها بنجاح على مجموعة من العينات الدوائية الأجنبية والمحلية. ومن الجدير ذكره أن العينات لا تحتاج -وفق هذه الطريقة- إلى معالجات مسبقة معقدة تسبق عملية التحليل كعملية الاستخلاص وغيرها، ومن ثمّ يمكن اعتمادها في مخابر الرقابة الدوائية من أجل التعيين الكمي لكلوريد البنزألكونيوم فيها.

REFERENCES

1. R. C. Rowe, P. J. Sheskey, M. E. Quinn; 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th. ed., *Pharmaceutical Press*, 917P. English.
2. G. Santoni, A. Tonsini, P. Gratteri, P. Mura, S. Furlanetto, S. Pinzauti; 1993. Determination of atropine sulphate and benzalkonium chloride in eye drops by HPLC, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 93, Issues 1–3, PP. 239-243.
3. M. Gaber, M. Hazem Abu Shawish, M. Abdalla Khedr, I. Khalid Abed-Almonem; 2012. Determination of benzalkonium chloride preservative in pharmaceutical formulation of eye and ear drops using new potentiometric sensors, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 32, Issue 8, PP. 2299-2305.
4. M. M. Gomez - Gomar, J. Gonzalez - Aubert, Garces - Torrents, J. Costa - Segarra; 1990. Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 8, Issues 8–12, PP.871-876.
5. J. D. Wilczyńska, J. Tautt, I. Roman; 2004. Application of the HPLC method for benzalkonium chloride determination in aerosol preparations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 34, Issue 5, pp. 909-920.
6. Y. H. Hou, C. Y. Wu, W. H. Ding; 2002. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of benzalkonium chlorides in ophthalmic solutions, *Journal of Chromatography A*, V.976, Issues 1–2, PP. 207-213.
7. K. K. Sengupta, M. Ranabir; 2006. Essentials of Ocular Pharmacology and Therapeutics, *BL Publications PVT Ltd.* 288P. English.
8. United States Pharmacopoeia, 2013.
9. British Pharmacopoeia, 2013.
10. S. K. Niazi; 2009. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations Liquid Products; *Informa Healthcare USA, Inc.*, Second Edition, 2738P.