

تقدير الكلوروديازيبوكسيد في الأقراص الدوائية باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء- الطور المعاكس

زينة زهير صالح العبدلي الهام سعد الله صالح

قسم الكيمياء / كلية التربية للعلوم الصرفة

جامعة الموصل

تاريخ القبول
2013/08/15

تاريخ الاستلام
2013/06/24

Abstract

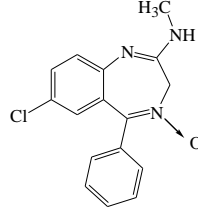
A simple, rapid and sensitive RP-HPLC method has been developed for the determination of chlordiazepoxide on tracer extrasil ODS1 (25mm,0.46mm, 5 μ m) column using mobile phase consisting of acetonitrile and methanol (30:70 v/v) at flow rate of 1.0 ml/min and UV detection at 262 nm in 20° C. The retention time for chlordiazepoxide was found to be 3.37 min . The linearity of development method was achieved in the range 5-220 μ g/ml with average recovery 101.82% and RSD was less than 3.0%. The method was applied successfully to determine chlordiazepoxide in tablet formulation. Statistical analysis proved that the proposed method was both accurate and precise.

الملخص

تم تطوير طريقة بسيطة وسريعة وحساسة لتقدير الكلوروديازيبوكسيد باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء- الطور المعاكس بحقن العينة (النموذج) خلال العمود tracer extrasil ODS1 بأبعاد (25 ملم \times 0.46 ملم، 5مايكروميتر) وباستخدام طور متحرك مكون من الاسيتونايترايل والميثانول بنسبة حجمية 70:30 وبمعدل سرعة جريان للطور المتحرك 1.0 مللتر/دقيقة وبدرجة حرارة 20 °م. والقياس بمكشاف UV عند 262 نانوميتر بزمن احتباس 3.37 دقيقة وقد كانت الاستجابة الخطية للمساحة تحت المنحنى القياسي لمدى التراكيز من 5 إلى 220 مايكروغرام/مللتر (-0.075 - 3.3 مايكروغرام وبحجم 15 مايكروليتر من الكلوروديازيبوكسيد المحقون). بمعدل نسبة استرجاع 101.82% والانحراف القياسي النسبي اقل من 3.0% وطبقت الطريقة المطورة بنجاح لتقدير الكلوروديازيبوكسيد في مستحضره الصيدلاني (الأقراص) ووافقت نتائج الطريقة المحتوى الأصيل للمستحضر الصيدلاني والطريقة القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني.

المقدمة

يعد الكلوروديازيبوكسيد أول بنزودايازيبين تم تصنيعه يمتلك التركيب الآتي (1):



7-Chloro-N-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-amine 4-oxide
Molar mass 299.8 gm/mol

يستخدم الكلوروديازيبوكسيد كمادة مزيلة للقلق والتخفيف من أعراضه ومضادة للكآبة ومسكنة ومنومة وكذلك في حالات التهيج المصاحبة للتوقف عن تناول الكحول. إن عقار الكلوروديازيبوكسيد يثبط المنعكسات الاحادية والعديدة الاشتباك من خلال عمله بوصفه ناقلاً تثبيطياً متعادلاً أو من خلال تثبيطه للانتقال الاشتباكي التهيجي. كما انه قد يثبط مباشرة وطائف الاعصاب الحركية والعضلات والحالات المرتبطة بالقلق بضمنها القولون التهيجي (2).

استخدمت العديد من الطرائق لتقدير الكلوروديازيبوكسيد منها الطرائق الطيفية والتي تضمنت تكوين معقد الشحنة المنقلة مع الكاشف 2، 4 - ثنائي نيتروفينول (3) او بتطبيق مطيافية المشتقة (4-6) والطرائق الفولتامترية (7-8) وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ذات الأداء العالي اذ يتم الفصل باستخدام الطور المتحرك المتكون من رابع كلوريد الكربون - اسيتون - ثلاثي اثيل امين (6:3:0.2 حجم/حجم) (9) وكروماتوغرافيا السائل عالي الأداء باستعمال الميثانول طورا متحركا والفصل على عمود C₁₈ او باستخدام الطور المتكون من ميثانول - اسيتونايتريل - محلول KH₂PO₄ المنظم (pH4) بنسب حجمية (40:20:40) وعمود نوع C₁₈ phenomenex Luna (4، 10).

يهدف البحث الى تطوير طريقة حساسة وسريعة لتقدير الكلوروديازيبوكسيد بشكله النقي وفي الأقرص الدوائية اعتمادا على استخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء - الطور المعاكس.

الجزء العملي

الاجهزة المستخدمة

تم إجراء القياسات باستخدام جهاز Shimadzu يحتوي على عمود فصل نوع tracer extrasil ODS1 5µm بأبعاد 25 ملم × 0.46 ملم ومضخة نوع LC-20At وفرن نوع CTO-20AC ومكشاف نوع (SPD-20) UV-Vis detector ويتم الحقن يدوياً

(manual injection) بوساطة محقنة دقيقة (micro syringe) كما استخدم جهاز Shimadzu U.V spectrophotometer UV-1800 لتحديد الطول الموجي باستخدام خلايا من الكوارتز بسمك 1 سم .

المواد الكيميائية المستخدمة

كانت جميع المواد الكيميائية المستخدمة على درجة عالية من النقاوة فضلاً عن استخدام مذيبات خاصة لاستخدامات كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء.

محلول الكلورديازيبوكسيد

يحضر المحلول بتركيز 500 مايكروغرام/ملتر باذابة 0.0125 غرام من المركب الدوائي بصيغته النقية في 25 ملتر من الاسيتونايترايل ويحضر منه محلول بتركيز 50 مايكروغرام/ملتر بالتخفيف بالمذيب ذاته.

محلول الخلات المنظم (pH4)

يحضر بمزج 41 من محلول حامض الخليك و 9 ملتر من محلول خلات الصوديوم كلاهما بتركيز 0.2 مولاري ثم يكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 ملتر.

محلول الفوسفات المنظم (pH7)

يحضر بمزج 50 ملتر من محلول فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين و 29 ملتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم كلاهما بتركيز 0.1 مولاري ثم يكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 ملتر.

محلول البورات المنظم (pH9)

يحضر المحلول بتركيز 0.05 مولاري باذابة 1.9062 غرام من رباعي بورات الصوديوم في 100 ملتر من الماء المقطر .

طريقة العمل لتقدير الكلورديازيبوكسيد في المحلول المائي

تم حقن 15 مايكروليتر بتركيز 5-220 مايكروغرام/ملتر من محلول الكلورديازيبوكسيد المذاب في الاسيتونايترايل تحت الظروف المثلى تجريبياً والمتضمنة استخدام الطور المتحرك المتكون من الاسيتونايترايل والميثانول بنسبة حجمية (70:30) وسرعة جريان 1.0 ملتر/دقيقة ووزن احتباس 3.429 دقيقة عند درجة حرارية 20° م وباستخدام عمود tracer extrasil ODSI ومكشاف UV عند 262 نانوميتر .

تحليل أقراص الليبروكسيد libroxide

تم وزن 10 أقراص من المستحضر الدوائي (يحتوي كل قرص 10ملغرام من الكلورديازيبوكسيد) بدقة وبعد سحقها وطحنها ومزجها جيداً ، وزن ما يكافئ 0.0125 غرام من

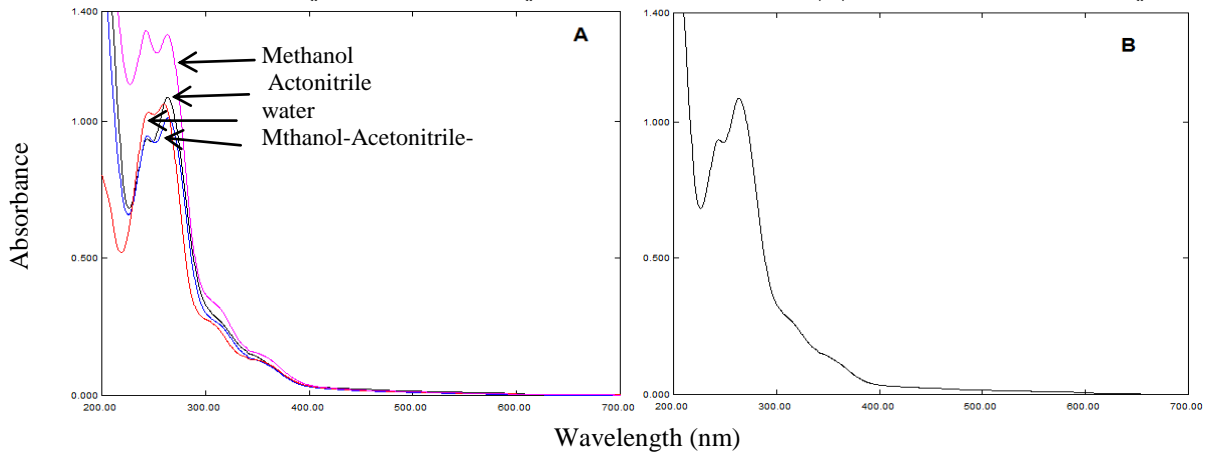
المركب الدوائي وتم اذابته بالاسيتونائيترايل وأكمل الحجم الى حد 25 مللتر في قنينة حجمية، ثم رشح المحلول واكمل الحجم بنفس المذيب ليتم الحصول على محلول بتركيز 500 مايكروغرام/مللتر ومنه حضرت محاليل بتركيز مختلفة باستخدام نفس المذيب وتمت معاملتها باتباع طريقة العمل الموصوفة للمحاليل القياسية وتم احتساب تركيز كل قرص بالاعتماد على المنحنى القياسي للكلوروديازيبوكسيد النقي.

النتائج والمناقشة

تم اجراء جميع القياسات بحقن 15 مايكروليتر من محلول الكلوروديازيبوكسيد بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر خلال عمود الكروماتوغرافيا نوع tracer extrasil ODS1 باستخدام المكشاف الضوئي (UV-Visible).

اختيار المذيب و الطول الموجي المناسبين

تم اخذ أطيف محاليل الكلوروديازيبوكسيد (50 مايكروغرام/مللتر) المحضرة في مذيبات مختلفة وتبين ان اذابة المركب الدوائي بالاسيتونائيترايل أعطى أفضل قمة واضحة عند الطول الموجي 262 نانوميتر، الشكل (1) لذا اعتمد الطول الموجي 262 نانوميتر في التجارب اللاحقة.



الشكل (1) اطيف امتصاص الكلوروديازيبوكسيد (50 مايكروغرام/مللتر)

A: في مذيبات مختلفة B: في مذيب الاسيتونائيترايل

اختيار الطور المتحرك

تم دراسة تأثير أنواع مختلفة من الاطوار المتحركة على شكل الحزمة وحساسيتها متمثلة باستخدام الاسيتونائيترايل والميثانول انفرادياً او مزيج منهما بنسب حجمية مختلفة ومزيج من الاسيتونائيترايل والماء او مزيج من الاسيتونائيترايل و محاليل منظمة مختلفة بنسب حجمية (10:90 حجم/حجم) وذلك بتثبيت مكشاف UV عند الطول الموجي 262 نانوميتر وسرعة جريان 1 مللتر/دقيقة. وأشارت النتائج المستحصلة في الجدول (1) الشكل (2) أن استخدام الطور المتحرك اسيتونائيترايل : ميثانول بنسبة حجمية (70:30) يعطي كروماتوغرام شكله منتظم بكفاءة فصل

عالية ومعامل سعة (k) ضمن المدى (5-1) وعليه تم اعتماده في التجارب اللاحقة علما ان كفاءة الفصل ومعامل السعة [11] تم احتسابهما من العلاقتين (1) و (2) على التوالي.

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad \text{---- (1)}$$

$$N = 5.56 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 = 5.56 \left(\frac{V_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{---- (2)}$$

t_R : زمن الاحتباس (retention time) وهو الزمن بين حقن المادة المحللة في العمود وظهور قمته في المكشاف.

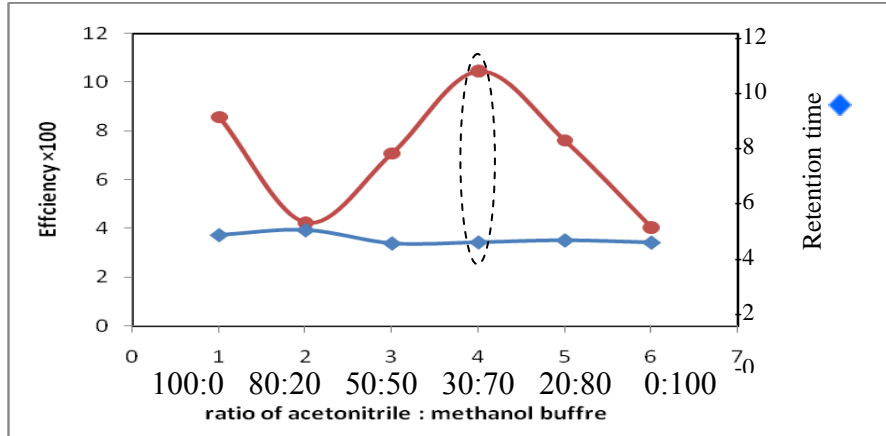
t_0 : (dead time) هو زمن الاصناف غير المحتبسة (nonretained species) التي تصل الى المكشاف.

V_R : حجم الاحتباس (retention volume) هو حجم المادة المحللة التي تصل الى المكشاف.

V_0 : (dead volume) الزمن الغير محسوب.

الجدول (1) اختيار مكونات الطور المتحرك

Mobile phase	Mobile	Retention time	K'
	phase ratio	(min.)	
acetotnitrile	100	3.508	1.90
Acetotnitrile- methanol	80:20	3.924	1.21
Acetotnitrile- methanol	50:50	3.386	0.13
Acetotnitrile- methanol	30:70	3.429	1.10
Acetotnitrile- methanol	20:80	3.509	1.18
Methanol	100	3.420	3.42
Acetotnitrile-water	90:10	3.416	3.41
Acetotnitrile-acetate buffer(pH4)	90:10	5.718	3.39
Acetotnitrile-phosphate buffer(pH7)	90:10	5.795	3.35
Acetotnitrile-borate buffer(Ph9)	90:10	6.035	1.34

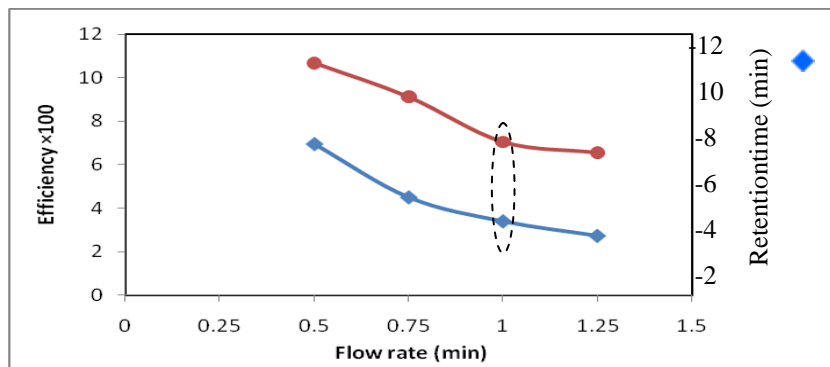


الشكل (2) تأثير اختلاف نسب الطور المتحرك على كفاءة الفصل وزمن الاحتباس

اختيار معدل سرعة جريان الطور المتحرك

تمت دراسة تأثير معدل سرعة جريان الطور المتحرك وذلك بأخذ معدل سرعة مختلفة بين 0.5 و 1.25 مللتر/دقيقة. واتضح من خلاصة النتائج المثبتة في الجدول (2) الشكل (3) إن أفضل كروماتوغرام يتم الحصول عليه بضغط الطور المتحرك بسرعة 1.0 مللتر/دقيقة بكفاءة فصل وزمن احتباس (3.38 دقيقة) جيدين وان قيمة معامل السعة ضمن المدى المسموح به .
الجدول (2) تأثير معدل سرعة جريان الطور المتحرك على زمن الاحتباس ومعامل سعة الكروماتوغرام

Flow rate (ml/min.)	Retention time (min.)	K'
0.5	6.931	1.11
0.75	4.483	1.06
1.0	3.380	1.07
1.25	2.715	1.05



الشكل (3) تأثير سرعة جريان الطور المتحرك على الكفاءة

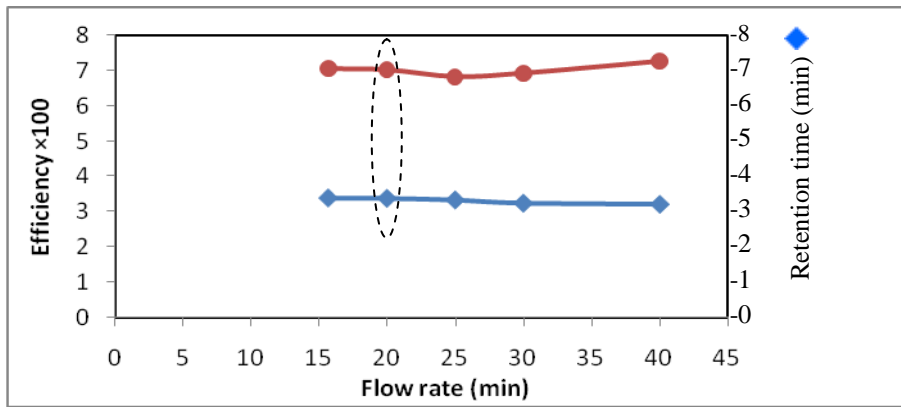
تأثير درجة الحرارة

تمت دراسة درجات حرارية مختلفة على زمن الاحتباس ومعامل السعة وشكل الكروماتوغرام ويظهر الجدول (3) والشكل (4) النتائج التي تم الحصول عليها، اذ يتبين أن أفضل درجة حرارة

يمكن اعتمادها في الدراسات اللاحقة هي 20 °م إذ تم الحصول على شكل كروماتوغرام منتظم ويزمن احتباس 3.371 دقيقة وكفاءة فصل عالية وبقيمة معامل سعة ضمن المدى (1-5).

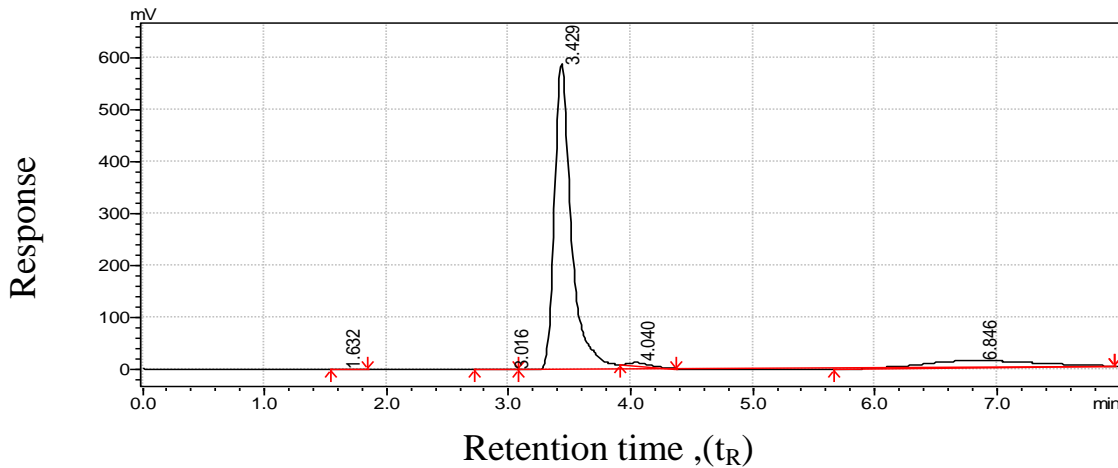
الجدول (3) تأثير درجة الحرارة على زمن الاحتباس ومعامل السعة

Temperature (°C)	Retention time (min.)	K'
R.T 15.7	3.380	1.07
20	3.371	1.42
25	3.323	1.68
30	3.236	1.38
40	3.203	3.72



الشكل (4) تأثير درجة الحرارة على الكفاءة

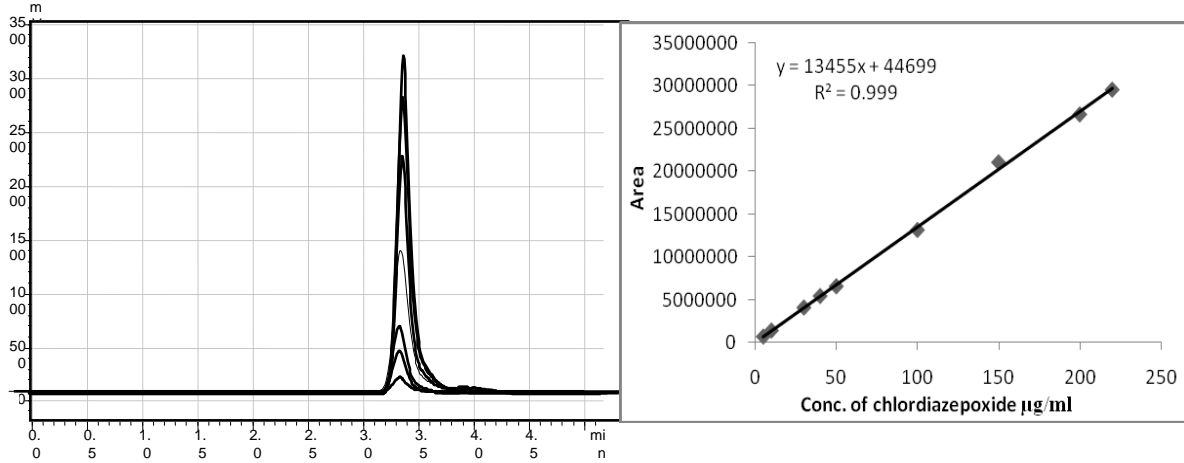
وبعد تثبيت الظروف المثلى تم اخذ الكروماتوغرام النهائي، الشكل (5)



الشكل (5) الكروماتوغرام النهائي

المنحنى القياسي

يظهر الشكل (6) وجود علاقة خطية بين تركيز الكلوروديازيبوكسيد والمساحة تحت المنحنى للكروماتوغرام المقابل ضمن المدى الخطي 0.075-3.3 مايكروغرام من المركب الدوائي المحقون بحجم 5 مايكروليتر (5-220 مايكروغرام/ملتر) في الجهاز وان هناك انحراف ايجابي بعد الحدود التقديرية العليا. كما تدل قيمة مربع معامل الارتباط والتي هي اكبر من 0.99 على أن المنحنى القياسي يمتلك مواصفات خطية ممتازة.



الشكل (6) المنحنى القياسي لتقدير الكلوروديازيبوكسيد بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء

كما تم حساب قيمتا LOD و LOQ للكلوروديازيبوكسيد والتي بلغت 0.546 و 1.821 مايكروغرام/ملتر على التوالي لخمس مكررات ولأقل تركيز من المنحنى القياسي للمركب الدوائي بشكله النقي وحسب العلاقة الآتية [12]:

$$LOD=3\sigma C_{low}/X, LOQ=10\sigma C_{low}/X$$

دقة الطريقة وتوافقها

لفحص دقة الطريقة وتوافق نتائجها تم احتساب نسبة الاسترجاع والانحراف القياسي النسبي باستخدام ثلاث تراكيز مختلفة تحت الظروف المثلى، إذ تشير النتائج المثبتة في الجدول (4) أن الطريقة المقترحة ذات دقة وتوافق جيدين.

الجدول (4) دقة الطريقة وتوافقها لتقدير الكلوروديازيبوكسيد

Amount added (µg/ml)	Found (µg/ml)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
50	50.93	101.86	101.82	0.783
100	101.60	101.60		1.385
200	204.00	102.00		2.578

*Average of five determinations.

تطبيق الطريقة المقترحة في تقدير الكلورديازيبوكسيد في الأقراص الدوائية

تم تطبيق الطريقة المقترحة لتقدير الكلورديازيبوكسيد في الأقراص الدوائية لإثبات كفاءتها ونجاحها في تقدير المركب الدوائي وخلوها من تداخلات المضافات في مستحضره الصيدلاني . فقد طبقت الطريقة الطيفية القياسية المعتمدة في دستور الادوية البريطاني[1] وأجريت مقارنة وتقييم احصائي بين الطريقة التحليلية المقترحة لتقدير الكلورديازيبوكسيد في الأقراص الدوائية والطريقة القياسية لمعرفة مدى دقة وصلاحيه التطبيق التحليلي للطريقة المقترحة باستخدام اختباري F و t عند مستوى ثقة 95% اذ بلغت قيمتا F و t التجريبية اقل من القيم في الجداول الإحصائية 2.45 و 9.28 على التوالي وهذا يشير الى ان الاختلاف غير معنوي بين الطريقة المطورة والطريقة القياسية مما يدل على ان الطريقة ذات صلاحية تطبيق جيدة ، الجدول (5).

جدول (5) نتائج الجزء التطبيقي لتقدير الكلورديازيبوكسيد

Pharmaceutical preparation	Recovery** (%)		t-test	F-test
	Present method	Standard method ⁽²⁴⁰⁾		
Chlordeazepoxide (libroxide-10)	100.40	101.33	0.714	8.136
	102.27	101.33		
	99.72	100.50		
	99.58	100.67		

*S.D.I - Iraq

**Average of three determinations.

المقارنة مع الطرائق الأخرى

تم مقارنة الطرائق المطورة بتقنية HPLC المقترحة والمنشورة في الادبيات العلمية في تقدير الكلورديازيبوكسيد، ويلخص الجدول (6) نتائج المقارنة والتي تشير الى ان الطريقة المقترحة سريعة في تقدير المركب الدوائي مقارنة مع الطرائق الاخرى .

الجدول (6) مقارنة الطريقة المقترحة لتقدير الكلوروديازيبوكسيد بتقنية (HPLC) مع الطرائق الأخرى

Analytical parameters	Present method	Literature method ⁽²³⁴⁾	Literature method ⁽²³⁸⁾
Column type	C ₁₈	C ₁₈	phenomenex Luna C ₁₈
Mobile phase	Acetonitrile: 30:70Methanol	Methanol	Acetonitrile:Methanol:KH ₂ PO ₄ 40:40:20
λ_{max} , nm	263	275	220
Temperature	20°C	27±2°C	---
Flow rate (ml.min ⁻¹)	1.0	---	1.0
Retention time (min)	3.371	5.3	13.36
Linearity range (µg/ml)	5-220	1-10	5-500

الاستنتاج

تم تطوير طريقة سهلة وسريعة لتقدير الكلوروديازيبوكسيد بتقنية HPLC - الطور المعاكس بالاعتماد على حقن المركب الدوائي خلال عمود tracer extrasil ODS1 باستخدام الطور المتحرك المتكون من اسيتونايترايل والميثانول بنسبة حجمية (70:30) بمعدل سرعة جريان 1 مللتر/دقيقة وبدرجة حرارة 20°م والقياس بمكشاف UV عند 262 نانوميتر. طبقت الطريقة بنجاح لتقدير المركب الدوائي في الأقراص الدوائية ووجد من نتائج الطريقة أنها توافق المحتوى الاصيل للمستحضر الدوائي ونتائج الطريقة القياسية المعتمدة في دستور الأدوية البريطاني، فضلا عن كونها ذات دقة وصلاحية تطبيق تحليلي جيدة إذ كانت قيم اختباري F و t التجريبية اقل من القيم الجدولية عند مستوى ثقة 95%.

المصادر

- 1- "British Pharmacopeia on 2000,Version 4, CD-ROM", Her Majesty's Stationery Office, PDF.
- 2- C. H. Boxel, B. Santoso and I. R. Edwards,"Drug benefits and risks", John Wiley and Sons, LTD, New York, pp 289, (2006).
- 3- L. Yanwei, Z. Yansheng, X. Chunsheng and W. Wenlong, "Spectriphotometric determination of chlordiazepoxide using its charge-transfer complex with 2,4- dinitrophenol", J. Chinese Pharm. Sci., 4, 196-199 (2001).

- 4- M. Toral, P. Richter, N. Lara and P. Jaque, "Simultaneous determination of chlordiazepoxide and clidinium bromide in pharmaceutical formulations by derivative spectrophotometry", *Int. J. Pharm.*, 189,67-74 (1999).
- 5- S. Patel, N. Patel and S. Patel, "Simultaneous spectrophotometric estimation of imipramine hydrochloride and chlordiazepoxide in tablets", *Ind. J. Pharm. Sci.*, 71, 468-472 (2009) .
- 6- S. P. Gupta, N. Upmanyu and G. Garg "Development and validation of spectrophotometric HPTLC and HPLC methods for the determination of imipramine and chlordiazepoxide in pharmaceutical dosage forms", *Der Pharm. Sin.*, 3, 185-192(2012) .
- 7- G. O. El-Sayed, S. A. Yasin and A. A. Badawy, "Adsorptive voltammetric determination of chlordiazepoxide in pure and dosage forms", *J. Chem. Pharm. Res.*, 1, 225-232(2009) .
- 8- A. H. Naggari, M. ElKaoutita, I. Naranjo-Rodriguez and A. Y. El-Sayedb, "Use of a sonogel-carbon electrode modified with bentonite for the determination of diazepam and chlordiazepoxide hydrochloride in tablets and their metabolite oxazepam in urine", *Talanta*, 89, 448-454 (2012).
- 9- S. Patel and N. Patel, "Spectrophotometric and chromatographic simultaneous estimation of amitriptyline hydrochloride and chlordiazepoxide in tablet dosage forms", *Ind.J. Pharm. Sci.*, 71,472-476 (2009).
- 10 - A. Pathak, P. Rai, and S. J. Rajput, " Stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of clidinium bromide and chlordiazepoxide in combined dosage forms", *J. Chromatogr.*, 48, 235-239 (2010).
- 11- Y. Z. Won, "Fundamentals of HPLC" *Agilent Technologies* , PP. 12-15(2007).
- 12- M. Valcarcel, "Principles of analytical chemistry", *Springer Verily*, Berlin, Germany, pp 67-68(2000) .