Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 29, No: 3, 2020 (46-57)

Spectrophotometric Assay of Piperazine Hexahydrate in its Pharmaceutical Formulation(syrup) with 3,5- Dinitrosalicylic Acid Reagent

Usra I. S. Al-Neaimy[1*], Thabit S. Al-Ghabsha[2]

[1]Department of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Iraq, Mosul, Iraq

[2]Department of Chemistry, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [1*]usraibrahim1960@gmail.com, [2]thabetsaeed@gmail.com

(Received November 29, 2019; Accepted January 25, 2020; Available online September 01, 2020)

DOI: 10.33899/edusj.2020.126231.1023, © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ABSTRACT:

A simple spectrophotometric method for the determination of piperazine hexahydrate was developed. The method was based on the proton transfer reaction with 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) in basic solution to form yellow product showing a maximum absorbance at 410 nm with molar absorptivity of 8350 l/mol.cm . The method is obeyed Beer's law over the concentration range 0.5-20 µg/ml. The average recovery % of the method is 99.12% and RSD % of the method is less than 2%.

The method was applied for the determination of piperazine hexahydrate in pharmaceutical formulation as elixir and the results were in good agreement with the standard addition method .

Keywords : Spectrophotometry ; Piperazine **;** 3,5- Dinitrosalicylic acid ; Proton transfer

التقدير الطيفي للبيبرازين السداسي الماء في مستحضره الصيدلاني(الشراب) مع الكاشف 3, 5 – ثنائي نيترو حامض السالسيليك

يسرى ابراهيم سعيد النعيمي[1*] ، ثابت سعيد الغبشة[2]

[1*]فرع الفسلجة والكيمياء الحياتية والأدوية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

[2]قسم الكيمياء، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

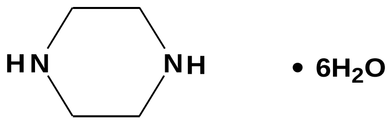
تم تطوير طريقة طيفية بسيطة لتقدير البيبرازين السداسي الماء. وأساس الطريقة هو تفاعل انتقال البروتون مع 5,3 – ثنائي نيترو حامض السالسيليك في وسط قلوي مكونا ناتج ذي لون أصفر يقاس أقصى امتصاص له عند طول موجي 410 نانوميتر وبامتصاصية مولارية 8350 لتر/مول. سم وكان قانون بير ينطبق ضمن مدى التراكيز 0.5–20 مايكروغرام/مللتر. لقد بلغ معدل الاسترجاعية% للطريقة99.12% والانحراف القياسي النسبي % أقل من 2%. وطبقت الطريقة في تقدير البيبرازين السداسي الماء في المستحضر الصيدلاني بهيئة شراب وتمت مقارنة النتائج مع طريقة الإضافة القياسية.

الكلمات المفتاحية: المطياف الضوئي ; بيبرازين ; 5,3– ثنائي نيترو حامض السالسيليك ;انتقال البروتون

المقدمة

يعد البيبرازين من عائلة anthelmintic (طاردة ديدان الأمعاء) لاسيما البيبرازين السداسي الماء (piperazine .6H_2O) و سترات البيبرازين (piperazine citrate) وهو من الأدوية الفعالة والمضادة للهستامين ويستخدم لمعالجة عدوى الديدان الدبوسية (pin worms) والديدان المستديرة (round worms) مثل دودة الاسكارس أو الديدان الخيطية (thread worms) حيث يعمل على شل هذه الطفيليات و بالتالي إزالتها بسهولة من جسم المضيف [1] .

يمتلك البيبرازين السداسي الماء الصيغة التركيبية الآتية :



M.wt = 194.23 g / mole

على الرغم من استخدامات البيبرازين الطبية إلا أنه لا يخلو من بعض التأثيرات الجانبية , إذ ان الجرعة العالية منه تؤدي إلى التقيؤ والغثيان وكذلك الطفح الجلدي , وأن الإفراط في تناوله قد يؤدي إلى الإصابة بداء الشقيقة والإسهال [2] .
وقد استخدمت طرائق مختلفة في تقدير البيبرازين سداسي الماء وتضمنت تقدير البيبرازين طيفياً باستخدام الكاشف Sodium-1,2-naphthoquinone-4-sulfonate [3] و3,5-dichloro-p-benzoquinone chloramine [4] و الأسيتون بعد ترسيبه بحامض الهيدروكلوريك المخفف[5] و نتريت الصوديوم بوصفه كاشفا لتكوين N- نتروزو البيبرازين [6] و بارا- كلورانيل [7] و البنزوكوينون [8] وبارا- بنزوكونيون [9] والفينوثيازين بوجود عامل الاكسدة N- بروموسكسنميد [10] و dichlone [11] و 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone والكاشف 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone [12] و dichlone وبوجود الاسيتالديهايد [13] و أورثو- كلورانيل [14] والمعقد Cu-nitrilotriacetic acid [15] وكذلك أمكن تقدير البيبرازين ومشتقاته باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة [16] وتقنية RP-HPLC [17][18] وتقنية كروماتوغرافيا الغاز[19] [20] و تقنية HPLC [21-27] . استخدمت في هذا البحث طريقة طيفية بسيطة لمعرفة كمية البيبرازين سداسي الماء باستعمال الكاشف 5,3 – ثنائي نيترو حامض السالسيليك عن طريق تفاعل انتقال البروتون لتكوين ناتج ملون يقاس امتصاصه عند 410 نانوميتر.

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة

تم القياس الطيفي باستخدام جهاز Shimadzu UV-210 Double Beam Spectrophotometer واستخدام خلايا من السليكا ذات عرض 1 سم. وتم الوزن بميزان حساس نوع Mettler H10 . وقيس الأس الهيدروجيني للمحاليل باستخدام (pH meter) نوع Philips PW 9420 .

المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة

جميع المواد الكيميائية من إنتاج شركتي Fluka و BDH .

محلول البيبرازين سداسي الماء 250 مايكروغرام/ مللتر

تحضر بإذابة 0.0250 غم من البيبرازين سداسي الماء في 100 مللتر من الماء الخالي من الأيونات.

محلول 5,3 – ثنائي نيترو حامض السالسيليك (1×10^{-3} مولاري)

يحضر المحلول بإذابة 0.0228 غرام في 100 مللتر من الماء الخالي من الأيونات.

محاليل القواعد (5×10^{-3} مولاري)

تم تحضير محاليل كل من هيدروكسيد الصوديوم وهيدروكسيد البوتاسيوم وهيدروكسيد الامونيوم وخلات الصوديوم و كاربونات الصوديوم وكاربونات الصوديوم الحامضية وذلك بإذابة الكمية المطلوبة من المادة النقية في 100 مللتر من الماء الخالي من الأيونات.

التقدير الطيفي للبيبرازين في المحلول المائي

يوضع في مجموعة من القناني الحجمية سعة 25 مللتر حجوم متزايدة من محلول البيبرازين السداسي الماء لتغطية المدى 0.5–20 مايكروغرام/مللتر, حيث تحتوي هذه القناني على 2 مللتر من الكاشف DNS و0.5 مللتر محلول هيدروكسيد الامونيوم ويكمل الحجم بالماء الخالي من الأيونات, وتركت المحاليل عند الظروف المثلى، ثم تم قياس الامتصاصات مقابل المحلول الصوري عند 410 نانوميتر .

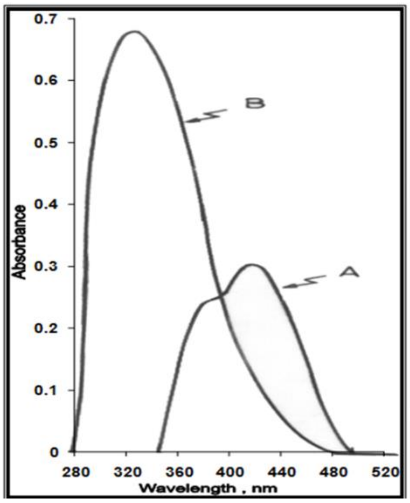
تحليل شراب البيروسيل (Pirosile elixir): (الشركة العامة للأدوية والمستلزمات الطبية – سامراء (SDI) / العراق)

تم تحضير محلول أولي 466.8 مايكروغرام/ مللتر بتخفيف 1 مللتر من محتوى عبوة شراب pirosile (يحتوي على 583.5 مليغرام/ 5 مللتر بيبرازين سداسي الماء) إلى 250 مللتر بماء خالي من الايونات ثم حضر محلول 250 مايكروغرام/ مللتر, إذ استخدمت حجوم مختلفة من المحلول الأخير للحصول على التراكيز 5 و 10 و 16 مايكروغرام/ مللتر من البيبرازين و تم إيجاد كمية البيبرازين في المستحضر الدوائي باستعمال المنحنى القياسي للمركب بالصيغة النقية .

النتائج والمناقشة

طيف الامتصاص

تم تفاعل البيبرازين السداسي الماء مع كاشف DNS لتكوين ناتج أصفر حيث بلغ أعلى امتصاص له عند طول موجي مقداره 410 نانوميتر, في حين أعطى المحلول الصوري أقصى امتصاص عند 350 نانوميتر (الشكل 1).



شكل 1 : طيف امتصاص

A: ناتج بيبرازين (7 مايكروغرام / مللتر)– DNS مقابل المحلول الصوري .

B: المحلول الصوري مقابل الماء الخالي من الايونات.

دراسة الظروف المثلى للتفاعل

تمت دراسة ظروف التفاعل التي توثر في امتصاص المحلول الملون عن طريق استخدام 1 مللتر من 250 مايكروغرام/ مللتر بيبرازين سداسي الماء في حجم نهائي مقداره 25 مللتر.

تأثير نوع القاعدة

بغية اختيار أفضل قاعدة تم تحضير قواعد مختلفة مثل هيدروكسيد الصوديوم و هيدروكسيد البوتاسيوم و هيدروكسيد الامونيوم و كاربونات الصوديوم و بيكاربونات الصوديوم و خلات الصوديوم بتركيز 5×10^{-3} مولاري بإضافتها (0.5 مللتر) كل على انفراد إلى محاليل حاوية على كميات متساوية من محلول البيبرازين و بوجود كميات ثابتة من الكاشف DNS (1.0 مللتر) بتركيز 1×10^{-3} مولاري و أكمل الحجم بالماء الخالي من الايونات.و تم قياس الامتصاص عند درجة حرارة الغرفة بعد مرور 20 دقيقة كما في جدول 1.

جدول 1: تأثير أنواع القواعد في امتصاص الناتج بيبرازين–DNS

Base ($5x\ 10^{-3}$ M)	Absorbance
Sodium hydroxide	0.104
Potassium hydroxide	0.092
Sodium carbonate	0.112
Sodium bicarbonate	0.097
Ammonium hydroxide	0.126
Sodium acetate	0.091

النتائج في جدول 1 تبين أن أعلى حساسية كانت عند استخدام هيدروكسيد الامونيوم وتم تثبيت استخدامه لاحقا.

تأثير كمية هيدروكسيد الامونيوم

تم دراسة تأثير القاعدة من خلال إضافة كميات من محلول هيدروكسيد الامونيوم الى قناني حجمية سعة 25 مللتر فيها كمية ثابتة من محلول البيبرازين و محلول DNS و أكمل الحجم بالماء الخالي من الايونات و تم قياس الامتصاص عند درجة حرارة الغرفة بعد مرور 20 دقيقة والنتائج مبينة في جدول 2 .

جدول 2: تأثير كمية هيدروكسيد الامونيوم في امتصاص الناتج

Volume of $5x10^{-3}$ M NH_4OH (ml)	Absorbance
0.4	0.109
0.5	0.129
0.6	0.107
0.8	0.091
1.0	0.076

يتضح أن الحجم 0.5 مللتر هو الأمثل في تقدير البيبرازين وعليه استخدم لاحقا.

تأثير درجة الحرارة

تبين النتائج المدرجة في الجدول 3 تأثير الدرجات الحرارية المختلفة (0 – 50 °م) في امتصاص الناتج المتكون و استقراره . وقد أثبتت التجارب أن الناتج الملون يتكون بأعلى حساسية عند درجة حرارة الغرفة وبزمن تكوين عشرة دقائق وبثبوتية لمدة 80 دقيقة . واستخدمت هذه الظروف لاحقاً .

جدول 3: تأثير درجة الحرارة في زمن تكوين الناتج الملون و استقراره

Temp (°C)	Absorbance / min standing time							
	10	20	30	40	50	60	90	120
0	0.133	0.132	0.137	0.138	0.121	0.101	_	_
Room temp	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.127	0.110
40	0.135	0.131	0.130	0.123	0.120	0.101	_	_
50	0.134	0.130	0.124	0.117	_	_	_	_

تأثير كمية الكاشف DNS على امتصاص الناتج

تم فحص تأثير حجوم مختلفة (0.5– 3.0 مللتر) من الكاشف DNS ذي التركيز 1×10^{-3} مولاري في امتصاص الناتج . و يستدل من النتائج الموضحة في الجدول 4 إن الحجم 2.0 مللتر هو الأمثل في تقدير البيبرازين .

جدول 4: تأثير كمية محلول الكاشف DNS في امتصاص الناتج

Volume of 1x10^{-3} M DNS (ml)	Absorbance
0.5	0.056
1.0	0.129
1.5	0.219
2.0	0.386
2.5	0.137
3.0	0.093

تأثير تسلسل الإضافة

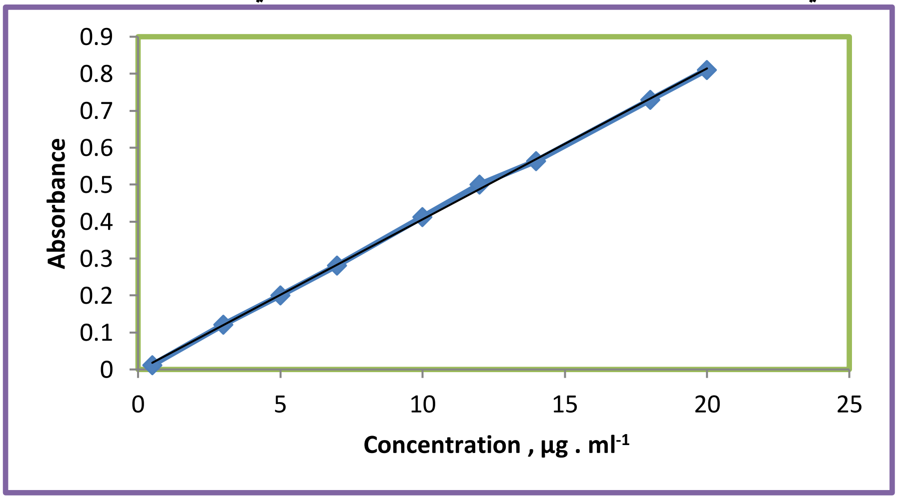
تم دراسة تأثير كيفية الاضافة على الامتصاصية حيث تم اختبار التسلسلات المبينة في الجدول 5 فوجد من النتائج المدونة أن الترتيب IV هو الملائم لتكوين الناتج بأقصى امتصاص .

جدول 5: تسلسل الإضافة لمكونات التفاعل

Reaction components	Order number	Absorbance
P + D + H	I	0.377
P + H + D	II	0.385
D + P + H	III	0.372
D + H + P	IV	0.403

المنحني القياسي

بإتباع الطريقة المذكورة أعلاه تم رسم الامتصاصات مقابل التراكيز و الحصول على الشكل 2 الذي يوضح أن الطريقة تتبع مدى التركيز 0.5 – 20 مايكروغرام/مللتر وكان هناك انحرافا سلبيا بعد الحدود التقديرية العليا كما يلاحظ من القيم في الجدول 6 أن معامل الارتباط للبيبرازين سداسي الماء هو 0.9986 مما يبين على أن المنحنى القياسي جيد .



شكل 2: المنحني القياسي لتقدير البيبرازين سداسي الماء

جدول 6: الامتصاصية المولارية والمدى التقديري والميل ومعامل الارتباط والمقطع للبيبرازين سداسي الماء

Drug	Linearity range (μg/ml)	Molar absorptivity l / mol·cm	Slope	Intercept	Correlation coefficient
Piperazine Hexahydrate	0.5-20	8350	0.0430	- 0.0236	0.9986

دقة الطريقة وتوافقها

اختبرت دقة الطريقة وتوافقها من خلال قياس ثلاثة من التراكيز في حجم نهائي 25 مللتر (ست مرات لكل تركيز) , ويبين الجدول 7 النتائج التي تم الحصول عليها.

جدول 7: الدقة والتوافق لتقدير البيبرازين سداسي الماء

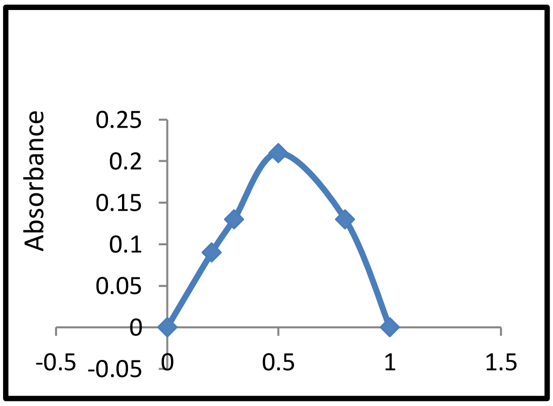
Compound	Amount added (μg/ml)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD* (%)
Piperazine hexahydrate	5	97.91	99.12	1.86
	10	99.53		0.60
	16	99.94		0.23

* Average of six determinations

يتضح من جدول 7 ان معدل الاسترجاعية% هو 99.12% و بلغ الانحـــــراف القياسي النسبي أقل من 2%.

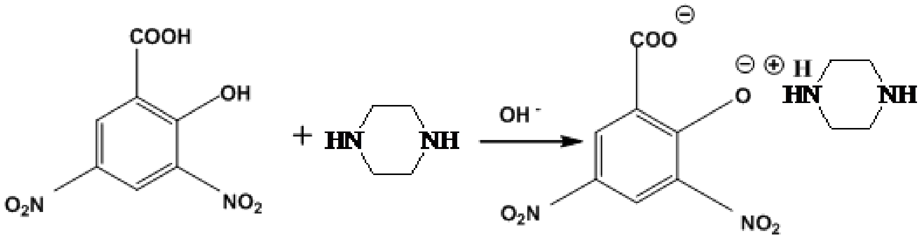
دراسة طبيعة الناتج الملون المتكون وثابت استقراره

استنادا إلى طريقة جوب للتغييرات المستمرة [28] لوحظ أن المركب الناتج كان بنسبة 1 من البيبرازين السداسي الماء إلى 1 من الكاشف (بتركيز $1x 10^{-3}$ مولاري لكل من الكاشف والدواء) كما في شكل 3.



شكل 3: طريقة التغيير المستمر لناتج DNS مع البيبرازين سداسي الماء

وعليه يكون التركيب الكيمياوي للمركب الملون المتكون كالآتي:



كما تم حساب ثابت الاستقرارية ووجد أن قيمته مساوية لـ 4.31 x 10^5 لتر/مول باستخدام المعادلة التالية [29] :

$Kc=1-\alpha/\alpha^2C$

إذ إن C تمثل تركيز الناتج و α تمثل درجة التفكك

التطبيقات التحليلية

لقد طبقت الطريقة المقترحة بنجاح على تقدير البيبرازين سداسي الماء في مستحضره الصيدلاني المتضمن شراب البيروسيل ودونت النتائج في الجدول 8 إذ يلاحظ الدقة العالية للطريقة المقترحة واتفاقها على نحو جيد مع المحتوى الأصيل للمركب الدوائي في مستحضره الصيدلاني .

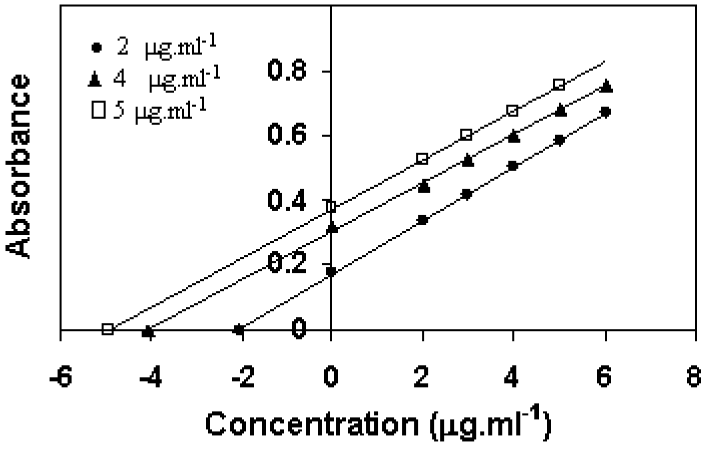
جدول 8: تقدير الدواء في شكله الصيدلاني بالطريقة المقترحة

Pharmaceutical preparation	Certified value (mg)	Amount present (µg/ml)	Recovery* (%)	Drug content found (mg)
Piperazine Hexahydrate (Elixir)	583.5 mg/5ml	5	101.01	589.45
		10	100.92	588.86
		16	100.74	587.81

* Average of three determinations

تقييم نتائج الطريقة المقترحة

من أجل توضيح انتقائية الطريقة المقترحة للبيبرازين السداسي الماء وخلوها من تداخل المضافات فقد تم تطبيق طريقة الإضافة القياسية على شراب البيروسيل لعدم توافر مستلزمات الطريقة القياسية الموجودة في دستور الأدوية البريطاني [30] ودستور الأدوية الأمريكي[31]. يمكن الاستنتاج من الشكل4 والجدول 9 بأن نتائج طريقة الإضافة القياسية متفقة مع الطريقة الحالية بشكل جيد.



شكل 4: رسم منحني الاضافة القياسية لتقدير البيبرازين سداسي الماء في شراب البيروسيل

جدول 9 : تقدير البيبرازين سداسي الماء في شكله الصيدلاني بطريقة الاضافة القياسية

Pharmaceutical preparation	Certified value (mg)	Amount present (µg/ml)	Recovery* (%)	Drug content found (mg)
Piperazine pirosile elixir	583.5 mg/5ml	2	102.65	598.96
		4	101.01	589.39
		5	101.79	594.00

*** Average of three determinations**

المقارنة مع طرائق أخرى

تمت مقارنة هذه الطريقة لتقدير البيبرازين مع الطرائق الطيفية المعتمدة على تفاعلات تكوين معقدات الشحنة المنتقلة (charge–transfer complex formation reactions) المنشورة في الأدبيـات العلميــة ويلخص الجـــدول 10 مقارنـــة المتغيرات التحليلية للطرائـــق , إذ أوضحت نتائـــج المقارنـــة أن الطريقة الجديدة تتفق مع الطرائق الأخرى في الحساسية ودرجة الحرارة .

جدول 10: مقارنة نتائج الطريقة المطورة لتقدير البيبرازين سداسي الماء مع نتائج عدد من الطرائق الأخرى

Analytical parameters	Present proton transfer method	Charge-transfer Methods	
		o-Chloranil method [14]	p-Benzoquinone method [9]
λ max (nm)	410	540	516
pH	Basic medium	5.0	5.4
Temperature (C°)	R.T	R.T	R.T
Development time (min)	10	30	30
Molar absorptivity (1/mol.cm)	8350	1916	9600
Beer's law range (µg/ ml)	0.5-20	10-400	2-10
Average recovery (%)	99.12	100.25	94.42
RSD (%)	< 2.0	0.28	<1.0
Analytical application	Elixir	Tablet , Elixir	Tablet

الاستنتاج

تـم اقتـراح طريقـة طيفيـة لتقـدير البيبـرازين السداسـي المـاء باسـتخدام 5,3 – ثنـائي نيتـرو حـامض السالسـيليك عـن طريـق تفاعـل انتقـال البروتـون وتكـوين نـاتج ذي لـون أصـفر يقـاس أقصـى امتصـاص لـه عنـد 410 نـانوميتر. وأظهـرت النتائج المستحصلة أن الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين، كما بلغت الامتصاصية المولارية 8350 لتر/مول. سم .

وطبقت الطريقة بنجاح في تقدير البيبرازين السداسي الماء في مستحضره الصيدلاني المتضمن شراب البيروسيل، وكانت النتائج متطابقة مع المحتوى الأصيل للشكل الصيدلاني وكذلك مع طريقة الإضافة القياسية

و تمتاز الطريقة ببساطتها حيث إنها لا تحتاج إلى تسخين و خطوات الاستخلاص بالمذيب حيث نجح التفاعل في الوسط المائي و عند درجة حرارة الغرفة .

المصادر

1. Blacow N.W., ″Martindale: the extra pharmacopoeia ″ , 26th Edn. , Royal Pharmaceutical Society of Great Britain , London,(1973) , pp. 153 – 154.
2. Scherer J.C and Roach S.S., ″Introductory clinical pharmacology ″ ,5th Edn. , Lippincott-Raven Publishers , Philadelphia, (1996), p. 111.
3. Dessouky Y.M. and S. A. Ismaiel S.A. , Analyst , 99 : 482 (1974).
4. Baggi R.T. , Mahajan S.N. and Rao R.G. , J. Assoc. Anal . Chem . ,57:1144 (1974) ;Anal. Abst. , 28 : 4E54 (1975).
5. Shirsat P.D., Indian J.Pharm. Sci. , 37 : 101 (1975);Anal. Abst. , 30 :3E43 (1976).
6. Walash M.I., Rizk M.S. and Ibrahim F.A. , J.Assoc. Anal.Chem.,62:1138 (1979);Anal.Abst. , 38: 4E73 (1980) .
7. Belal S. , El-Sayed M.A. ,Abdel-Hamid M.E. and Abdine H., J.Pharm.Sci. , 70: 127 (1981) ;Anal .Abst., 41 : 5E7 (1981).
8. Krishna U.M. , Murthy M.K. and Rao N.S. , Analyst , 109: 1277 (1984) .
9. Wahbi A.M. ,Abounassif M.A. and Gad-kariem E.A. , Talanta ,33: 179 (1986) .
10. El-Shabouri S.R. , Mohamed F.A. and Mohamed A.I., Talanta , 34 : 968 (1987) .
11. Filip′eva S.A. , Peternko V.V. , L.N.Strelets L.N. and Buryak V.P., Farm. Zh. , 1: 42 (1989) ;Chem .Abst . ,110:219193n (1989).

12. Krishna U.M., Babu K. and Murthy M.K., Talanta , 37 :353 (1990) .
13. Shishoo C.J . , Suhagia B.N. , Rathod I.S. and Thakore S.S. , Indian J.Pharm.Sci. , 58 : 219 (1996) .
14. Al-Jabri F.M. and Fayadh R.H. , Basrah J. Sci. , 16: 85 (1998) .
15. Al-Abachi R.Y. (2000) , M. Sc. Thesis , Mosul University.
16. Rao G.S. , Sep. Sci. , 12: 569-571 (1977);Anal. Abst. , 34: 6C48 (1978) .
17. Edward C. M. and Farquharson R.A., J. Chromatogr. A , 178 : 358 (1979).
18. Huange Y. , Zeng J. and Liang M. , Yaowu Fenxi Zazhi , 9 :194 (1989) ; Anal. Abst. , 52 :6D64 (1990) .
19. Ramachandran K.M. and Kumar G.S. ,Talanta , 43: 1269 (1996) .
20. Raj S. , Kumari K.S. and Bhaskar B.V. , Anal. Chem. An Indian . J. , 10 : 453 (2011) .
21. Morely J. , Elrod L. , Linton C., Shaffer D. , and Krogh S. , J. Chromatogr . A ,766 : 77 (1997).
22. McClintic C.,Remick D.M., Peterson J.A.and Risley D.S., J. liq.Chromatogr., 26:3093 (2003).
23. Moreno I.E.D., da Fonseca B.M.,Barroso M., Costa S.,Queiroz J.A. and Gallardo E.,J.Pharm.Biomed.Anal.,61:93 (2012).
24. Byrska B.,Zuba D. and Stanaszek R. , Zagadnien Nauk Sadowych , 81 : 101 (2009).
25. McClintic C. , Remick D.M. , Peterson J.A. and Risley D.S. , J. Liq. Chromatogr. & Related Techn. , 26 : 3093 (2003) .
26. Lin H., Tian Y., Zhang Z., Wu L., Chen Y. , Anal. Chim. Acta , 664 : 40 (2010) .
27. Dong S. , Yan Z. and Yang H. , Anal.Sci. , 32 : 1333 (2016) .
28. Kenner C.T., ″Quantitative analysis ″, Macmlliam Publishing Co. , Inc . , New York ,(1979) , p. 32 .

29. Haris L.G., ″Analytical chemistry ″ , Prentice – Hall , Inc. , New Jersey, (1988), p . 427 .

30. British Pharmacopoeia on CD-ROM. London, 3rd Edn., System Simulation Ltd. The Stationary Office (2000).

31. United State Pharmacopoeia, The National Formulary, United State Pharmacopoeia Convention, INC, 12601, Twin Book Parkway, Rockville, MD (1995) .