

تقدير الغليمبيرايد في المستحضرات الصيدلانية بواسطة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء

عماد طارق حنون¹ حسين حسن خرنوب²

1- جامعة تكريت ، كلية العلوم ، العراق ، تكريت.

2- جامعة تكريت ، كلية الصيدلة، العراق ، تكريت .

الكلمات المفتاحية : غليمبيرايد ، أسيتونتريل ، ماء ، ميثانول.

الخلاصة :

تم تطوير طريقة دقيقة وحساسة لتقدير الغليمبيرايد في المستحضرات الصيدلانية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء. إذ تم حقن 20 مايكروليتر من محلول الدواء ذو التركيز 10 جزء من المليون من العقار بأستخدام عمود نوع L₁ بطول 25سم وقطر 4,6 ملم وبأستخدام الاسيتونتريل والماء والميثانول وفسفات الصوديوم احادية القاعدة بنسبة (10:10:20:60) كطور متحرك عند سرعة الجريان 1.5 مل . دقيقة⁻¹ وبأستخدام كاشف الاشعة فوق البنفسجية عندالطول الموجي 230 نانوميتر وقد تم استقصاء الظروف التجريبية من(نوع العمود , والطور المتحرك , pH , الطول الموجي , الكاشف , معدل سريان الطور المتحرك) تراوحت خطية الطريقة بين (10-50 ppm) وزمن الاحتجاز 8.916 دقيقة, وحد الكشف 2.7×10^{-5} .

وكانت الطريقة ذات دقة وضبط جيدين ذات استرجاعية 100.23 % . وطبقت الطريقة بنجاح لتقدير الغليمبيرايد في المستحضرات الصيدلانية .

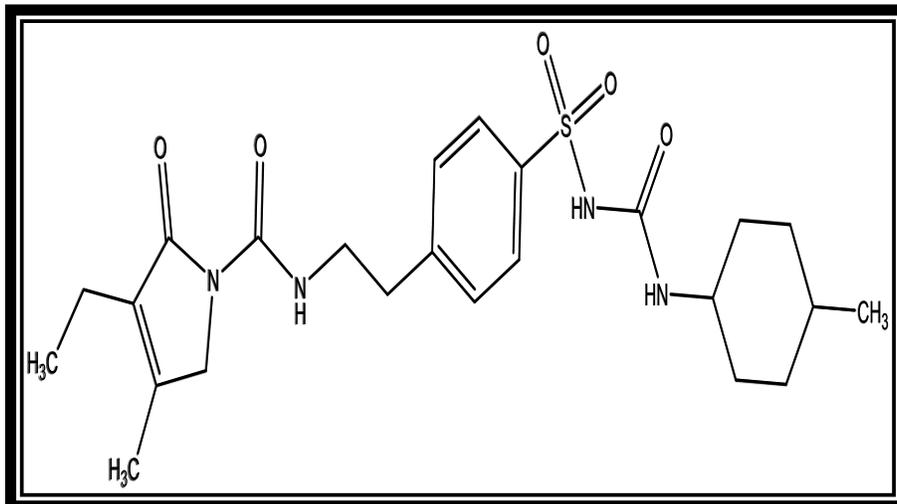
Introduction

المقدمة :

أن دواء Glimperide الاسم العلمي له

3-ethyl-4-methyl-N-(4-(N-((4- methylcyclohexyl)carbamoyl)sulfamoyl)phenethyl)-2-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxamide⁽¹⁾

ويمتلك الصيغة التركيبية الآتية :



والصيغة الجزيئية لهذا الدواء $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ ذي وزن جزيئي (490.62g/mol)⁽²⁾. ويستعمل Glimepiride في الغالب لعلاج احد اشكال داء السكري (داء السكري من النمط 2) ويستخدم لخفض نسبة السكر في الدم .

أن دواء Glimepiride غير متعلق بالانسولين (Insulin Independent) ويعد من الجيل الثاني من مجموعه ادوية السلفونيلوريه (Sulphonylureas) ومن ميزاته انه يؤدي إلى خفض كمية السكر في الدم بفعالية اكثر من الأدوية القديمة والتي تعد من الجيل الاول مثل تولبوتاميد Tolbutamide وكلوربروباميد Chlorpropamide . يساعد هذا الدواء على افراز الانسولين من خلايا البنكرياس ، ويساعد على نقل السكر في الدم إلى داخل انسجه الجسم . اذ يجب دمج استعمال هذا الدواء مع حميه غذائية . يمتاز دواء غليمبيريد بطول مدة فعالية الدوائية ، والتي تمتد إلى 24 ساعة ولذلك يتم تناوله مرة واحدة في اليوم⁽³⁾ . تكون نسبة العناصر فيه هذه المادة غليمبيريد عبارة عن مسحوق لبلورات ذات طعم مر وذات لون ابيض⁽⁴⁾ . تكون نسبة العناصر فيه $C = 58.76\%$ ، $H = 6.99\%$ ، $O = 16.30\%$ ، $N = 11.42\%$ ، $S = 6.53\%$ ⁽⁵⁾ ، تذوب في الكحول بدرجة 25 م° . وقليل الذوبان في الماء ، وذات درجة انصهار 207 م° . والطول الموجي الاعظم للامتصاص (229 – 260)⁽⁶⁾ . نانوميتر ، يوجد هذا الدواء بشكل مستحضرات صيدلانية مختلفة . ولهذا الدواء اعراض جانبية منها الطفح الجلدي الشديد ، حكة ، احمرار ، تهيج ، شحوب البشرة ، حمى ، ضعف عام ، التتميل أو الشعور بوخز ، صعوبة في التنفس ، دوخة ، صداع تعب ، غثيان ، تقيؤ ، ألم في المعدة ، إسهال ، زيادة حساسية الجلد لأشعة الشمس ، حكة خفيفة^(7,8) .

ولهذا الدواء تداخلات قد يحدث تفاعل شبيه بثائي السلفيرام (احمرار الوجه ، صداع ، ضيق تنفس) وكذلك الاندروجين ، مثل دوبا ، أملاح المغنسيوم ، كلورامفينكول ، فلوكونازول ، مضادات الهستامين ، سلفوناميدات ، حامض النيكوتينيك ، منيوثيازين ، ريفاميسين ، استروجين ، آيزونيايد . هذه الادوية تسبب ارتفاع سكر الدم وبالتالي تقلل السيطرة على السكر أما فلوكونازول ، فلوفاستاتين ، فلافوكسامين ، كيتوكونازول قد تزيد من مستويات Glimepiride في الدم ويزيد من خطر نقص سكر الدم⁽⁹⁻¹¹⁾ .

التقنيات المستخدمة في تقدير عقار غليمبيريد:

تم تقدير عقار غليمبيريد بطرق مختلفة منها كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء H.P.L.C ومنها مطيافية الاشعة فوق البنفسجية U.V.

إستطاع الباحث Altinoz وجماعته⁽¹²⁾ ان يحلل عقار الغليمبيريد باستخدام القياس الطيفي للمشتقة الثانية للأشعة فوق البنفسجية حيث تم إجراء القياس الطيفي الكمي في dimethyl في نطاق الطول الموجي من 245 – 290 نانوميتر حيث ظهرت قمم امتصاص عند 263.3 – 268.2 نانوميتر على التوالي . وكان المدى الخطي يتراوح من 1 – 500 مايكروغرام . وحد الكشف 0.4 مايكروغرام حيث أثبتت هذه الطريقة بساطتها وحساسيتها ودقتها

وقد تمكن العالم Sane وجماعته⁽¹³⁾ من تقدير طريقة سريعة ودقيقة لعقار Glimepiride ، Pioglitazone حيث تم تنفيذ الفصل الكروماتوغرافي من العقارين على عمود C_{18} cosmosil (150mm×4.6 mm , 5µm) مع طور متحرك Mobilephase مكون من خليط من سترات الامونيوم الثلاثي triammonium

Citrate بتصحيح درجة حموضتها إلى 6.95 بحامض الفسفوريك ، والاسيتونتريل والميثانول وينسب (45 ، 35 ، 20) على التوالي . وبمعدل تدفق Flow rate 1 مل / دقيقة و 228 نانوميتر . حيث حققت الطريقة فصلاً كاملاً في أقل من 10 دقائق . وتم التحقق من صحة اللاخطية والدقة والتوافق وكان المدى الخطي للعقار قيد الدراسة 0.1 – 10 مايكروغرام . مل⁻¹ .

أما Jain¹⁴ وجماعته فقد قام بتقدير هيدروكلوريد الميتفورمين و هيدروكلوريد ألبايوكلاتازون و غليمبيريد في الحبوب بواسطة تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء . وهي طريقة بسيطة ودقيقة وسريعة وقابل للتكرار في وقت واحد من (MET) و (PIG) و (GLP) حيث تم إجراء القياس عند 25 م° باستخدام عمود (C₁₈(250mm×4.6 mm , 5µm) مع طور متحرك مكون من الميثانول وبفر فوسفات pH = 4.3 وينسب 25:75 على التوالي . وبمعدل تدفق 1 مل / دقيقة وباستخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية في 258 نانوميتر . حيث كان زمن الاحتجاز للعقارات (MET) هو 2.66 و (PIG) هو 7.12 و (GIP) هو 10.17 وكانت المديات الخطية للعقارات (MET) 10 – 5000 و (PIG) 10 – 150 و (GIP) هو 1 – 10 مايكروغرام / مل . وكانت نسبة الاسترجاعية على التوالي 100.4% و 100.06% و 100.2% . وكانت معاملات الارتباط لجميع المكونات قريبة من الواحد . والانحرافات المعيارية النسبية لثلاثة قياسات تكرر في ثلاثة تركيزات في الاقراص هي دائماً أقل من 2 % .

أما الباحث Lakshmi وجماعته¹⁵ فقد قاما بتقدير بايوكلاتازون و غليمبيريد في المستحضرات الصيدلانية وفي بلازما الفئران بواسطة HPLC باستخدام عمود C₁₈(150mm×4.6 mm , 5µm) بوجود طور متحرك مكون من ميثانول ومحلول بفر لأسيئات الامونيوم عند داله حامضيه 3.5 وينسب 45:55 على التوالي وبمعدل جريان 0.5 مل/دقيقه وعند 252 نانوميتر . حيث كانت أزمدة الاحتجاز لل (PIO) هو 5.63 دقيقة و (GLM) هو 7.18 دقيقة وكان المدى الخطي لمنحني المعايرة 25_25000 نانوغرام. مل⁻¹ لل (PIO) و 10_10000 نانوغرام. مل⁻¹ لل (GLM) . وقد أثبتت دقتها وحساسيتها وسرعتها .

وعين المباحث Khan وجماعته¹⁶ العقار غليمبيريد في المستحضرات الصيدلانية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء وطريقة المشتقة الاولى للمطيافية . حيث تم تحليل المخدرات عن طريق ضخ خليط من الاسيتونتريل و 2% من محلول حامض الفورميك عند دالة حامضية 3.5 وينسب 80:20 على التوالي . ومن خلال استخدام عمود (C₁₈(150mm×4.6 mm , 5µm) وعند 228 نانوميتر . حيث تم الحصول على حد كشف من 20 _ 140 مايكروغرام . مل⁻¹ وكانت النسبة المئوية للاستردادية للدواء % 0.33 ± 100.52 . والطريقة الثانية وظفت لتكوين معقد من Triphenyl – H – tetrazolium Chloride – 2,3,5 في وسط قاعدي عند 413.5 نانوميتر حيث تم الحصول على مدى خطي يتراوح من 40 _ 160 مايكروغرام . مل⁻¹ مع الحصول على نسبة مئوية % 0.47 ± 100.33 . حيث يمكن ان تعتمد هذه الطريقة لكل الاساليب المقترحة لتقدير العقار في المواد الخام أو المستحضرات الصيدلانية .

قام Dhaneshwar وجماعته (17) من التحقق لصحة طريقة HPTLC لتقدير هيدروكلوريد الميتفورمين والأتورفاستاتين Atorvastatin و غليمبيريد Glimepiride في أدوية المخدرات ومستحضراتها وهي طريقة جديدة

وبسيطة ودقيقة لتقدير العقاقير في آن واحد لكل من (MET) و (ATV) و (GLM) بشكل أقرص حيث تم تنفيذ الفصل الكروماتوغرافي من الأدوية على لوحات من الالمنيوم (Precoated) مع هلام السليكا كطور ثابت . وطور متحرك مكون من الماء والميثانول وكبريتات الامونيوم وبنسب (1 : 1 : 4) على التوالي ، حيث تم اجراء تقييم الكثافة من المناطق المفضله في 237 نانوميتر . حيث كان عامل الفصل RF لـ MET هو 0.37 ± 0.02 و لـ ATV هو 0.59 ± 0.02 والعقار المدروس GLM هو 0.75 ± 0.02 وبمستوى خطية $200 - 700 \text{ ng}$ و لـ MET $600 - 2100 \text{ ng / spot}$ و لـ ATV $600 - 2100 \text{ ng / spot}$ ومن لـ GLM $600 - 2100 \text{ ng / spot}$ وكانت الدقة للقياس لـ MET 99.66 ± 0.14 . و لـ ATV هو 98.46 ± 0.40 و لـ GLM هو 98.62 ± 0.39 .

Experimental

الجزء العملي:

Reagents and Chemicals Used

الكواشف والمواد الكيميائية المستعملة :

استعملت مواد كيميائية وكواشف تحليلية على درجة عالية من النقاوة مثل حامض الهيدروكلوريك وحامض الفسفوريك وحامض الفورميك والميثانول والايثانول وسلفات الامونيوم والكلوروفورم والاسيتونتريل وثلاثي اثيل امين.

تحضير المحاليل:

1- محلول المادة الدوائية GLM بتركيز 50 ppm

حضر بإذابة 0.0500 غم من مسحوق الغليمبيريد النقي في محلول الطور المتحرك المكون من الاسيتونتريل والماء والميثانول وفسفات الصوديوم أحادي القاعدة وبنسب 10:10:20:60 على التوالي في بيكر صغير وأضيف إلى قنينة حجمه سعة 100 مل وأكمل الحجم بالطور المتحرك إلى العلامة. ثم خفف 10 مل من هذا المحلول إلى قنينة حجمه سعة 100 مل وأكمل الحجم بالطور المتحرك إلى العلامة.

2- محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1.0 مولاري.

تم اخذ 10 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز 10 مولاري وخفف بقنينة حجمه سعة 100 مل بالماء المقطر إلى العلامة.

3- محلول كبريتات الامونيوم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ بتركيز 0.1 مولاري .

حضر بإذابة 1.32 غرام من $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ في بيكر صغير وأضيف إلى قنينة حجمية سعة 100 مل وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى العلامة بعدها تم ترشيحه على ورق ترشيح بنفاذية 0.45 مايكرومتر .

4- فوسفات الصوديوم أحادي القاعدة NaH_2PO_4 .

حضر بأذابة 0.5000 غرام من فوسفات الصوديوم أحادي القاعدة في دورق حجمي سعة 500 مليلتر ماء مقطر حتى تصبح الدالة الحامضية $\text{pH} = 2.1 - 2.5$ ويكمل الحجم بالماء المقطر إلى العلامة.

5- هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1.0 مولاري .

حضر بإذابة 10.0000 غرام من المادة في الماء في بيكر صغير وأضيف إلى قنينة حجمه سعة 250 مللتر وأكمل الحجم بالماء إلى العلامة .

النتائج والمناقشة :

دراسة الظروف الفضلى:

تم حقن 20 مايكروليتر من الأنموذج إلى العمود وبتركيز 10ppm خلال كل تجربة .

Selection of Column

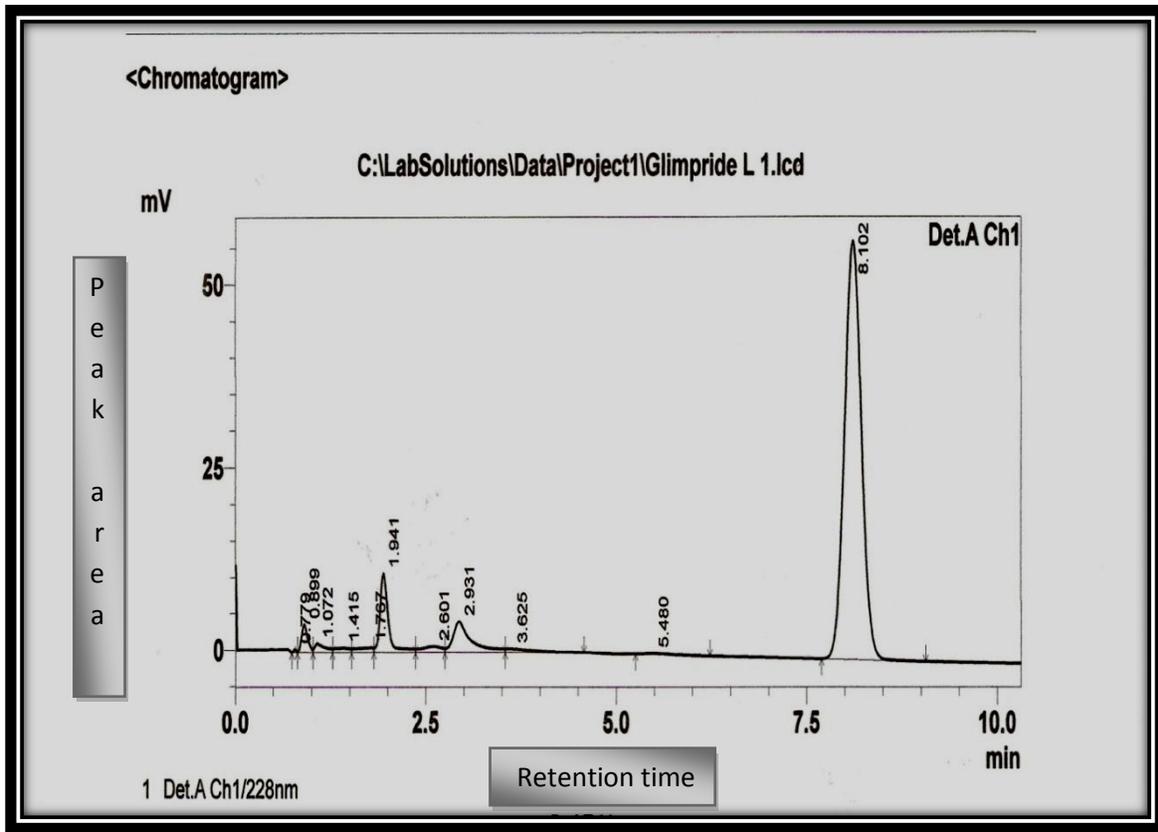
1- اختيار العمود

حيث تم حقن 20 مايكروليتر من محلول (10 ppm) في جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء وتم تسجيل الاستجابة (مساحة القمة) عند الطول ألموجي 230 نانوميتر وبعد سلسلة من التجارب العملية على نوعية الاعمدة تم اختيار العمود (Porous silica particales 5 to 10 micron indiameter) (C₁₈) L₁

بناءً على أفضلية هذا العمود , تم استخدام العمود L₁ (C₁₈) بطول 25 سم وقطر 4.6 ملم مع تثبيت كل الظروف المثلى, وأثبتت النتائج التي تم الحصول عليها صحة الاختيار , كما موضح في الجدول رقم (1) والأشكال التالية

الجدول رقم (1) آلية اختيار العمود

No	Type of column	Peak height	Peak area(mv)	Mobile phase	Retention time(min)	HETP	Comments
1	L ₁	57312	883794	ACN : H ₂ O: CH ₃ OH: NaH ₂ PO ₄ 60:20:10:10	8.102	0.1653	حزمة جيدة وارتفاع المكافئ للصفحة عالي واستردادية مقبولة
2	L ₃	33354	468632	ACN : H ₂ O: CH ₃ OH: NaH ₂ PO ₄ 60:20:10:10	0.876	0.5656	حزمة قليلة وارتفاع المكافئ للصفحة قليل واستردادية واطنة
3	L ₁₀	83	51762	ACN : H ₂ O: CH ₃ OH: NaH ₂ PO ₄ 60:20:10:10	14.242	0.1733	حزمة ضئيلة وارتفاع المكافئ للصفحة قليل واستردادية واطنة



الشكل (1) كروماتوغرام حقن 20 مايكروليتر من الغليمبيريد (10 ppm) باستخدام عمود نوع L₁

Selection Of Mobile Phase

2- اختيار الطور المتحرك

تم حقن 20 مايكروليتر من محلول تركيزه (10 ppm) من عقار غليمبيريد Glimepiride في عمود من نوع L₁ وتم تسجيل الاستجابة (مساحة القمة) عند طول موجي 230 نانوميتر ، حيث تم دراسة عدد من الأطوار المتحركة ونسبها مثل الاسيتونتريل والماء والايثانول والميثانول والكلوروفورم ومركبات الفوسفات أحادية وثنائية القاعدة والمحاليل المنظمة وحامض الفورميك والهيدروكلوريك وثلاثي اثيل امين ومركبات الكبريتات وغيرها . حيث كان الفصل جيد وقمة حادة وزمن احتجاز قليل لفصل وتقدير عقار الغليمبيريد على العمود L₁ عند الطور المتحرك الاسيتونتريل والماء والميثانول وفوسفات الصوديوم احادية القاعدة حيث تكون زمن ظهور قمة الدواء 8.169 دقيقة وكما موضح في الجدول رقم (2) والاشكال التالية.

الجدول رقم (2) اختيار نوعية ونسب الطور المتحرك

NO	Mobile phase	Peak height(mv)	Peak area(mv)	HETP	Comment
1	CH ₃ CN :H ₂ O: CH ₃ OH: NaH ₂ PO ₄ 60:20:10:10	58079	907489	0.1043	قمة حادة ويزمن احتجاز قريب واستردادية مقبولة
2	CH ₃ OH: Buffer Phosphate pH 4.3 3:1	4260	67894	0.8312	اكثر من قمة مشوهة واستردادية واطنة جدا
3	CH ₃ CN : H ₂ O:Formic acid 2% 70:20:10	155355	14177981	0.9079	قمة مشوهة جدا وعريضة واستردادية عالية
4	CHCl ₃ : CH ₃ OH:TEA 6:3:1	39330	1665148	0.9149	قمة قوية ويزمن بعيد جدا واستردادية عالية
5	CH ₃ OH:H ₂ O:(NH ₄) ₂ SO ₄ 2.5:2.5:5.0:0.1	88415	1136822	0.9291	قمة مشوهة كثيرة واستردادية عالية

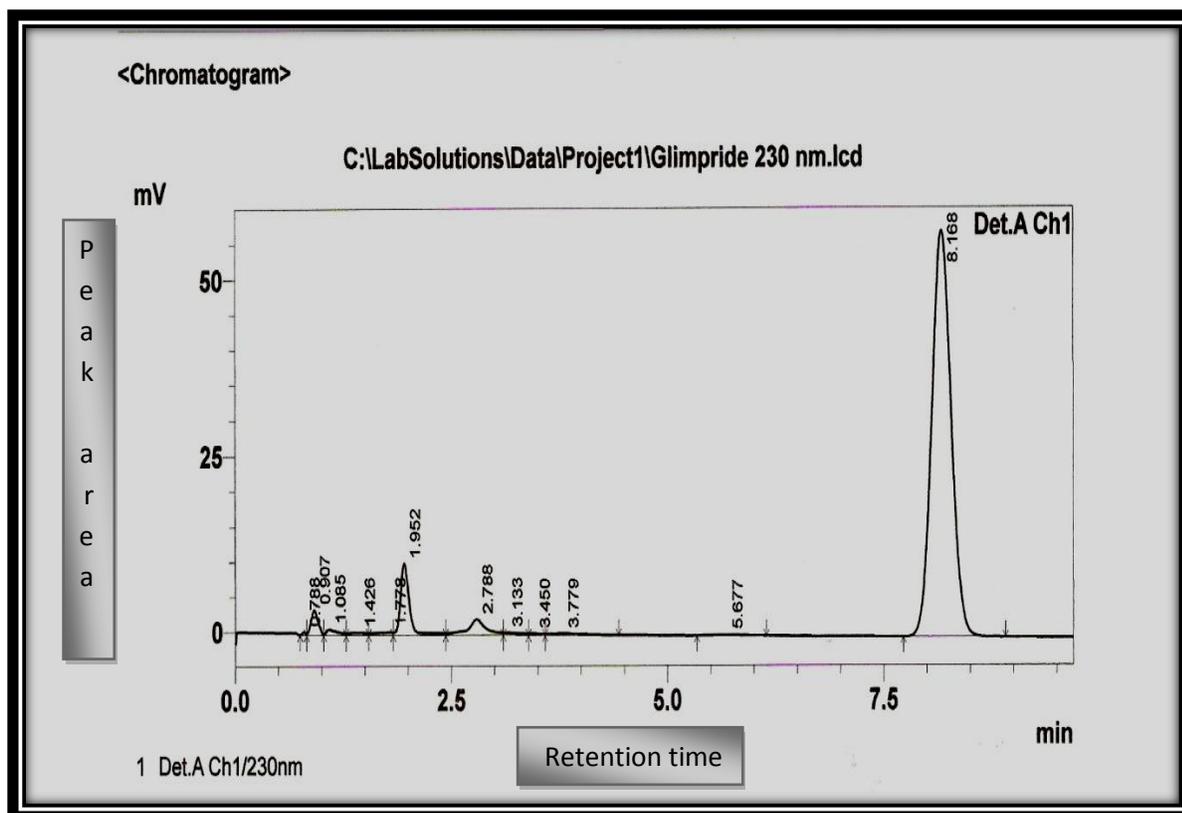
Selection λ max

3- اختيار الطول الموجي

تم حقن 20 مايكروليتر من محلول العقار مذابة في الطور المتحرك وقيس الامتصاص للمتدفق من العمود عند الاطوال الموجية (225 , 230 , 235 , 240 , 245 , 250 , 255) نانوميتر ووجد ان افضل قمة هي عند الطول الموجي 230 نانوميتر لذلك اعتمد هذا الطول الموجي في التجارب والنتائج موضحة في الجدول رقم (3) والأشكال التالية

الجدول رقم (3) آلية اختيار الطول الموجي

No	λ max(nm)	Peak height(mv)	Peak area(mv)	Retention time(min)	HETP	Comments
1	225	36425	1017978	8.457	0.2185	قمة عريضة ويزمن احتجاز بعيد واستردادية عالية
2	230	57650	897425	8.168	0.0797	قمة قوية وحادة ويزمن قريب واستردادية مقبولة
3	235	35097	959682	8.487	0.2169	قمة قوية وحادة ويزمن بعيد واستردادية عالية
4	240	26897	720736	8.511	0.2157	قمة عريضة ويزمن بعيد واستردادية واطنة
5	245	18624	492548	8.535	0.2145	قمة قوية وحادة ويزمن بعيد واستردادية واطنة
6	250	11424	295426	8.567	0.2129	قمة قوية وحادة ويزمن بعيد واستردادية واطنة
7	255	6628	169957	8.577	0.2124	قمة قوية وحادة ويزمن بعيد واستردادية واطنة



الشكل (2) كروماتوغرام حقن 20 مايكروليتر من محلول (10 ppm) من الغليمبيريد وقياس الامتصاص عند طول موجي 230

Selection the ratio Of Mobile Phase

4 - اختيار نسبة الطور المتحرك

تمت دراسة تأثير نسبة مكونات الطور المتحرك على شكل الكروماتوغرام وزمن الاحتجاز وذلك بأخذ نسب مختلفة من الأطوار المتحركة من محلول الاسيتونتريل والماء والايثانول وفوسفات الصوديوم أحادية القاعدة حيث تم اختيار النسبة 10:10:20:60 على التوالي لظهور قمة واضحة وحادة وزمن احتجاز قليل

5- اختيار معدل سرعة جريان الطور المتحرك

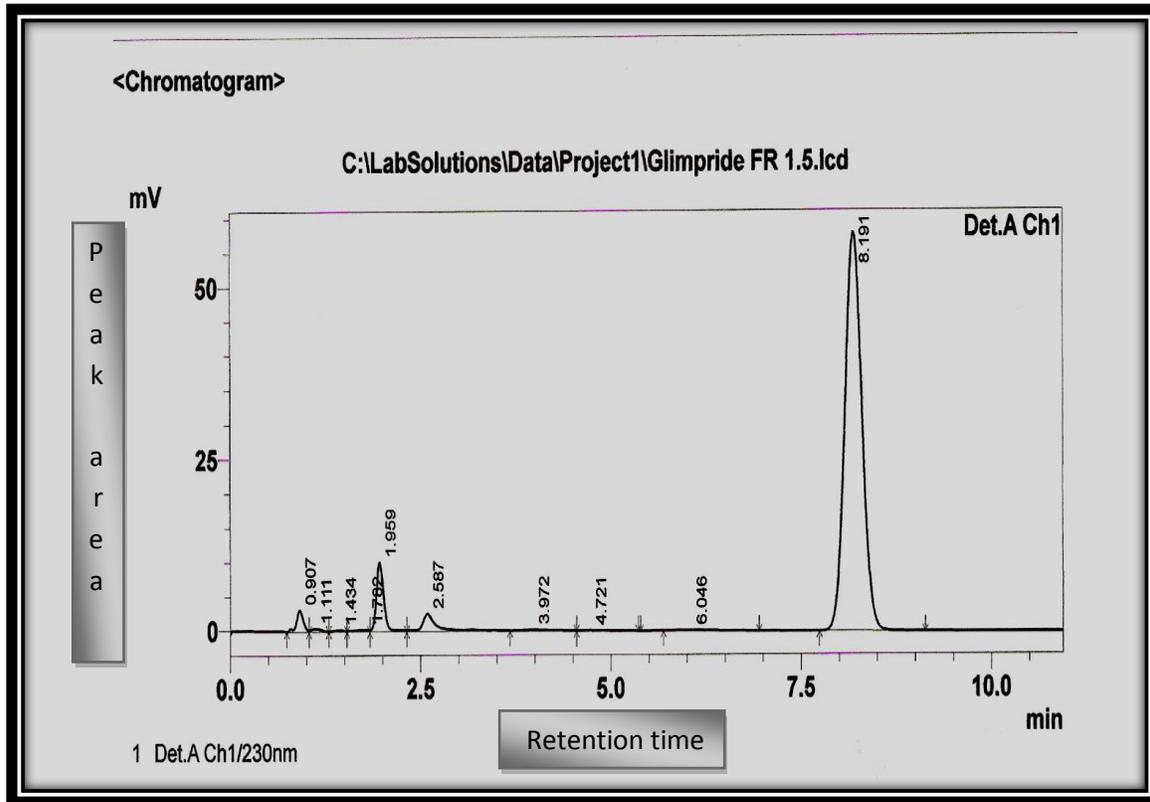
Selection of Average Flow rate For mobile phase

تم حقن 20 مايكروليتر من محلول 10 ppm من المادة القياسية واستخدام طور متحرك مكون من الاسيتونتريل والماء والميثانول وفوسفات الصوديوم (10:10:20:60) وبسرعة جريان بين 0.5 - 2 مل . دقيقة⁻¹ وعند طول موجي 230 نانوميتر وتم تسجيل الاستجابات (مساحات القمم وزمن الاحتجاز) وبالسرع المختلفة حيث لخصت النتائج التي تم الحصول عليها والمبينة في الاشكال التالية حيث تم اختيار معدل

سرعة جريان 1.5 مل.دقيقة⁻¹ لظهور قمة حادة وزمن احتجاز قريب ومقاربة للمادة القياسية. كما موضح في الجدول رقم (4) والاشكال التالية

الجدول رقم (4) اختيار معدل سرعة جريان الطور المتحرك

NO	Flow Rate ml/min	Peak hight(min)	Peak area(min)	HETP	Retention time(min)	Comment
1	1.0	46611	1434595	318.88	0.2372	قمة عريضة وبزمن بعيد واستردادية عالية
2	1.5	58095	910526	471.70	0.0582	قمة قوية وحادة وبزمن قريب واستردادية مقبولة
3	2.0	31679	719496	332.27	0.1641	قمة عريضة وبزمن قريب لكن استردادية واطنة



الشكل رقم (3) كروماتوغرام حقن 20 مايكروليتر من الغليمبيريد (10 ppm) عند سرعة جريان 1.5 مل / دقيقة

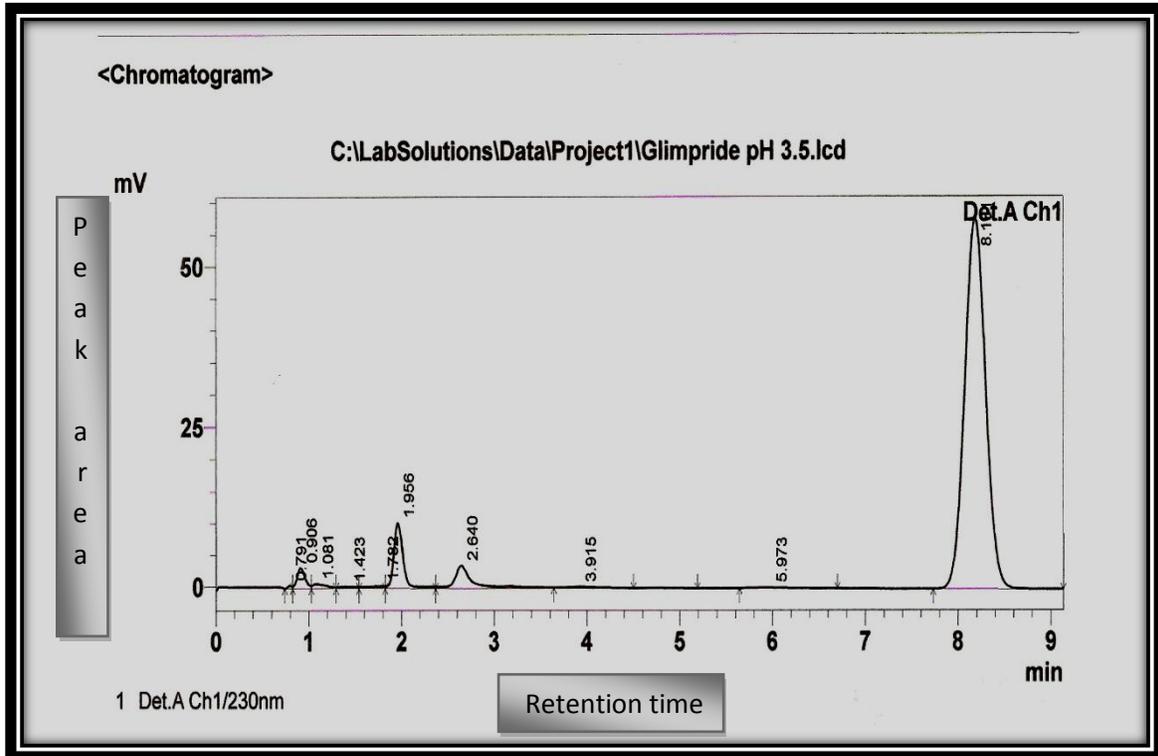
Effect of pH

6 - تأثير الدالة الحامضية

بعد سلسلة من إجراء التجارب ثم اختيار نوعية الطور المتحرك الطور المتحرك عند الحامضية 3.5 لظهور قمة حادة ويزمن احتجاز مبكر . حيث تم تحضير مجموعة من الاطوار المتحركة مختلفة الدالة الحامضية وباستخدام حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم لزيادة وتقليل الدالة الحامضية . حيث تم ترشيحها بواسطة ورق ترشيح وبنفاذية 0.45 مايكروميتر . وبعدها سجلت الاستجابة . والنتائج مبينة في الجدول رقم (5) .

الجدول رقم (5) اختيار الدالة الحامضية

pH	Peak height(min)	Peak area(min)	HETP	Comment
2.5	59169	993946	0.4060	قمة عريضة واستردادية عالية
3.5	58033	907186	0.1962	قمة قوية وحادة ويزمن قريب واستردادية مقبولة
4.5	514428	6610256	0.2399	قمة قوية وحادة ويزمن قريب واستردادية مقبولة
7.0	156918	2263231	0.2153	قمة مشوهة ويزمن بعيد واستردادية واطنة
11.5	391402	5308065	0.2594	قمة عريضة ويزمن بعيد واستردادية واطنة



الشكل رقم (4) كروماتوغرام حقن 20 مايكروليتر من الغليمبيريد (10 ppm) عند دالة حامضية 3.5

Detection limit

7- حد الكشف

تم حساب حد الكشف للمادة الفعالة Glimepiride وذلك بأخذ أدنى تركيز مأخوذ من منحنى المعايرة وقياس جهده ولست قراءات متتالية والنتائج مبينة كما في الجدول رقم (6) ادناه.

جدول رقم (6) حساب حد الكشف

Type of drug	Conc. (ppm)	Standard deviation	R.S.D	Peak height(mv)	Detection limit
Glimepiride	10	0.054	-0.03091	58011	2.7×10^{-5}

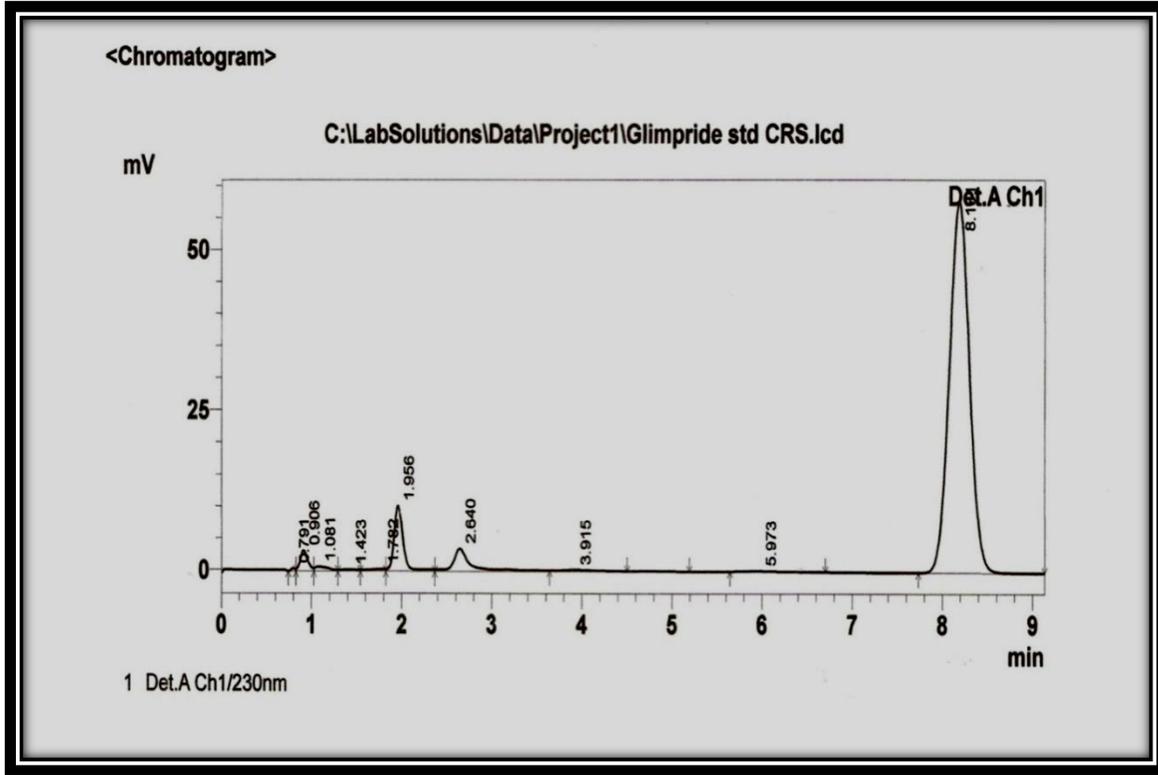
Calibration Curve

منحنى المعايرة

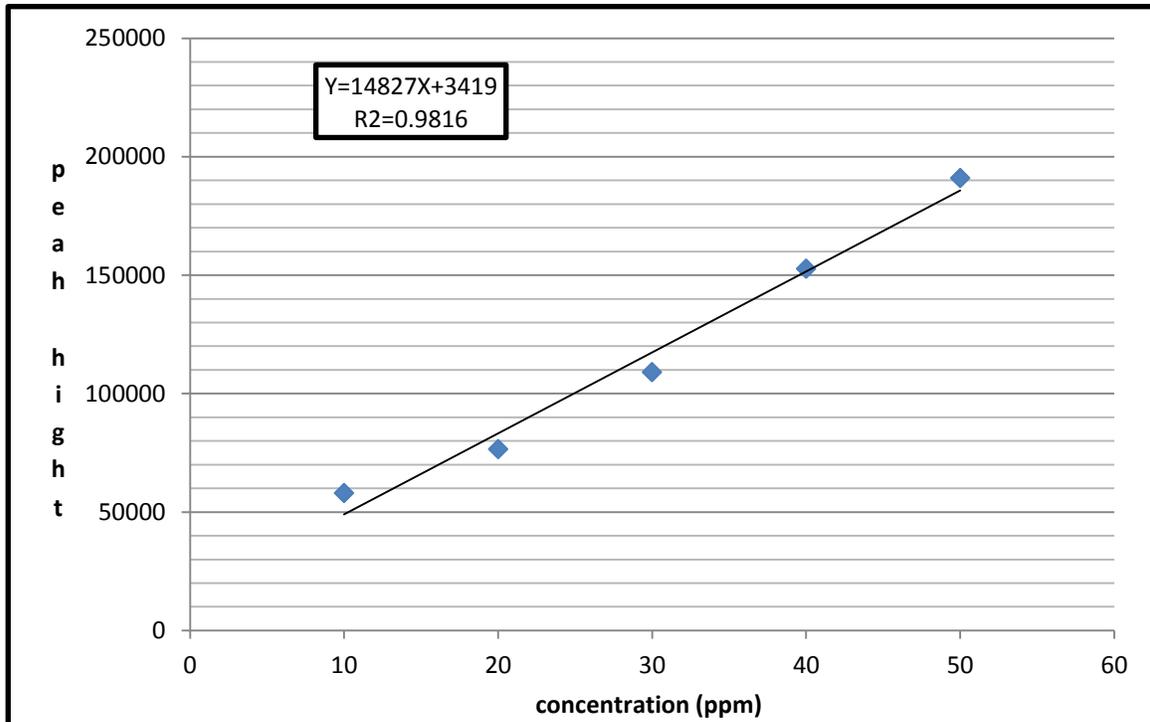
في سلسلة من قناني حجمية حضرت تراكيز (10-50 جزء من المليون) من محلول العقار وذلك باخذ حجوم من محلول العقار بتركيز 50ppm وخففت المحاليل الى العلامة باستخدام محلول الطور المتحرك. تم حقن 20 مايكروليتر من كل محلول وعلى التوالي في عمود من نوع L₁ وباستخدام الطور المتحرك المتكون من الاسيتونتريل والماء والميثانول وفسفات الصوديوم عند الدالة الحامضية 3.5 وبسرعة جريان 1.5 مل . دقيقة⁻¹ حيث سجلت الاستجابة (ارتفاع القمة) عن الطول الموجي 230 نانوميتر والنتائج مبينة في الجدول رقم (7) والأشكال التالية كلاً حسب التركيز.

الجدول رقم(7) الاحصائيات الخاصة بتراكيز المنحنى القياسي

NO.1	Conc. ppm	Retention time	R.E %	Recovery %	Standard deviation	R.S.D%	HETP
1	10	8.916	0.002	100.23	0.054	0.032	315.56
2	20	8.543	-0.0045	99.53	0.053	0.054	315.00
3	30	8.876	0.019	101.92	0.054	0.070	295.00
4	40	8.994	0.012	101.14	0.022	0.094	333.89
5	50	8.981	-0.019	98.09	0.032	0.013	300.99



الشكل (5) كروماتوغرام حقن 20 مايكروليتر من المادة القياسية (10 ppm) Glimepiride



الشكل (6) منحنى المعايرة للطريقة المقترحة

التطبيقات

Applications

- التحليل الكمي لأقراص مستحضر **Glimepiride**.

A- تحضير المستحضر الدوائي Glimepiride 2mg-Tablets⁽¹⁸⁾

Determination of Glimepiride 2 mg/ Tablet in Tablet Dosage Form

تم اخذ وزن 5 أقراص من المستحضر الدوائي بتركيز 2 ملغم/ قرص . حيث أضيف الوزن في دورق حجمي سعة 100 مليلتر مع الطور المتحرك المكون من الاسيتونتريل وفسفات الصوديوم الى العلامة . ورج المحلول لمدة 10 دقيقة. وبأستخدام جهاز الاذابة بالموجات فوق الصوتية Ultra sonicator . وتم ترشيح المحلول بورق ترشيح $0.45 \mu\text{m}$. وبعدها خفف المحلول بأخذ 10 مل منه في قنينة حجمية سعة 100 مل واكمل الحجم بنفس الطور المتحرك. حيث تم حقن 20 مايكروليتر من محلول المستحضر الدوائي في جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء وبأستخدام عمود C_{18} (L_1) وقورنت النتائج مع المحلول المقاس (القياسي) وبنفس التركيز ، وتم تسجيل الاستجابة (مساحة القمة) عند الطول الموجي 230 نانوميتر⁽¹⁸⁾ . وتم حساب النسبة المئوية للاسترجاعية وكانت 98.79 % ولمعدل ستة قراءات.

الجدول (8) نتائج تقدير المستحضر الدوائي المنتج

substance	Added(ppm)	Found(ppm)	Recovery %
Glimepiride	10	9.88	98.79%

b . التحليل الكمي لأقراص Glimepiride and Metformine 5 ملغم / قرص بطريقة المطيافية الأولى للأشعة فوق البنفسجية⁽¹⁹⁾ Ultra-Violet . ومقارنتها مع الطريقة المقترحة HPLC وكما يأتي :

تم سحن خمسة أقراص من مستحضر الدواء 5 ملغم لكل قرص صنع الشركة الهندية . وكان معدل وزن الحبة الواحدة 0.2453 غم . حيث وضع المسحوق في قنينة حجمية سعة 25 مليلتر وتم إذابته بالميثانول وباستخدام جهاز الإذابة بالموجات فوق الصوتية ultrasonication لمدة 15 دقيقة ويبرد ويرشح المحلول بورق ترشيح $0.45 \mu\text{m}$ وأضيف إليه الميثانول إلى العلامة (1 ملغم.مل⁻¹) . وخفف المحلول بأخذ

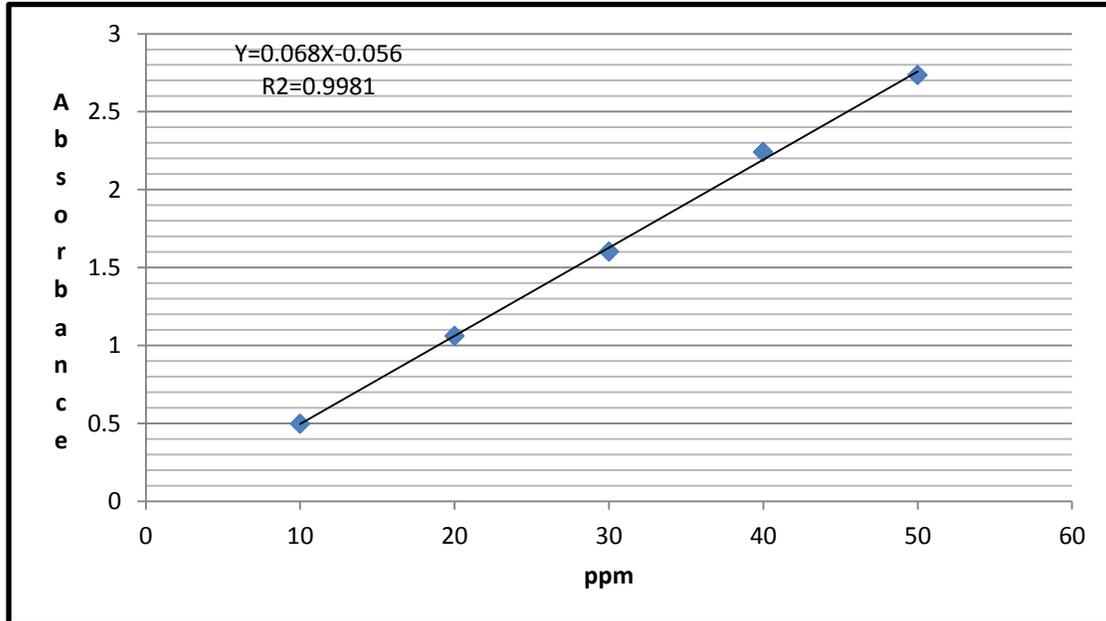
5 مليلتر منه في دورق حجمي سعة 100 مليلتر وأكمل الحجم بالميثانول إلى العلامة. وقيس الامتصاص عند طول موجي 230 نانوميتر .

*معدل ستة قراءات

وتم قياس الامتصاص وحساب معدل النسبة المئوية للاسترداد ولستة قراءات وجد أنها تساوي 101.10 % وهذا يتطابق مع الطريقة المقترحة .وكما مبينة في الجدول رقم (9) والأشكال التالية.

أجدول (9) نتائج تقدير المستحضر الدوائي المنتج بطريقة الأشعة فوق البنفسجية

NO.1	Conc. ppm added	Conc. ppm found	Absorbance	Recovery %	R.E %
1	10	10.11	0.498	101.1	0.0110
2	20	20.16	1.061	100.8	0.0080
3	30	29.82	1.602	99.4	-0.006
4	40	41.21	2.240	105.5	0.0300
5	50	50.04	2.734	100.1	0.0008



الشكل (9) يوضح منحنى المعايرة بطريقة الأشعة فوق البنفسجية

Conclusion and Result**تقييم النتائج والاستنتاج**

1-تمت في هذه الدراسة ايضا تطبيق تقنية RP-HPLC لفصل ودراسة المواد الفعالة في المستحضرات الصيدلانية من خلال اختيار الظروف المثلى لعملية الفصل, اذ تمت دراسة المتغيرات الكروماتوغرافية , وتم الحصول على كروماتوغرام مثالي لفصل المادة الفعالة للعقار من بين بقية المواد والمضافات الاخرى بأستخدام الظروف المثلى وكماياتي:

اختيار عمود الفصل نوع L1 ونوع الطور المتحرك من الالاسيتونتريل والماء والميثانول وفسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين وبنسب (10:10:20:60) على التوالي والطول الموجي كان 230 نانوميتر والدالة الحامضية 3.5 ومعدل الجريان 1.5 مل. دقيقة⁻¹ وغيرها

2-بينت النتائج المستحصلة لقيم الانحراف القياسي النسبي وعدد الصفائح النظرية والارتفاع المكافي للصفائح النظرية والاستردادية بأن الطريقة انتقائية وذات حساسية عالية فضلا عن كفاءة الفصل.

3- تم تقييم هذه النتائج باستخدام اختبار t للمقارنة بين مصداقية الطريقتين الاولى المقترحة والثانية A. χ_{i1}^2 , χ_{i2}^2 . معدل الاسترجاعية للطريقتين القياسية الأولى 100.23 % والثانية 98.79 % على التوالي وقيمة الانحراف القياسي المشترك للطريقتين = 0.48 , وعند n = 6 عدد القراءات لكلا الطريقتين الاولى والثانية حيث أظهرت قيمة t التجريبية 1.20 أقل من قيمة t الجدولية 2.57 عند مستوى ثقة 95 % فعليه تعد الطريقتين متشابهتين من حيث المصدقية . كما أجري اختبار F لمعرفة فيما اذا كان هنالك أي فرق معنوي بين نتائج الطريقتين ووجد أن قيمة F التجريبية 2.38 أقل كذلك مع القيمة الجدولية 5.19 عند نفس مستوى الثقة 95 % وبذلك فلا يوجد فرق معنوي بين الطريقتين القياسية والمقترحة . حيث تم حساب اختبار t واختبار F وقيم الانحراف القياسي المشترك للطريقتين.

Determination of Glimepiride in Drug Formulations by High Performance Liquid Chromatography

Imad Tarek Hanoon¹ Hussian Hassan Kharnoob²

1-Tikrit Universtiy , Science College , Iraq , Tikrit .

2- Tikrit Universtiy ,Pharmacy College , Iraq , Tikrit .

Key words: Glimepiride, Acetonitrile ,Water, Methanol.

(Received: Nov2013,Accepted: Dec2013)

Abstract

- In the present work the Glimepiride drug is determined in its pharmaceutical preparation using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique with L₁ column length 25cm and 4.6mm diameter. The mobile phase of acetonitrile ,water, methanol and sodium phosphate mono basic and ratio (60:20:10:10) for used.The flow rate was 1.5 ml min⁻¹ , Injection volum was 20 µl . The signal was detected at 230 nm with retention time 8.916 min in the range 10-50 ppm and detection limit 2.7×10⁻⁵.
- This method was succefully applied for the determinarion of Glimepiride its pharmuceutical preparation with recovery of not less than 100.23%

1-"U.S.Pharmacopeia on CD-ROM",30th Ed .NF25,by system simulation ltd. The stationary office , America,3071,(2007).

2-Glimepiride- "Drugs.com. All rights reserved"., (2013)

3- Glimepiride-"DrugBank version 4.0 beta is now online for public preview".

4-"British Pharmacopeia on CD-ROM",vol(1,2) .(2006).

5- Glimepiride-"Digital Media Services".,(2013).

6-Amaryl-"Digital Media Services".,(2013).

7- Glimepiride side effects-"Medical Dictionary All Rights Reserved"

8-Glimepiride-"Medical Dictionary All Rights Reserved"

9-dms@choueirigroup.com.

10-J.T.Backman , P.J.Neuvoenen ., Effect of rifampicin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride., "J.of clinical pharmacology" ., 50,6,591-595, (2000).

- 11- P.J.Neuvonen , M.Niemi and J.T.Backman., perspectives in clinical pharmacology ." **J.of clinical pharmacology and Therapeutics"**., 80 , 565-581, (2006).
- 12- S. Altino 2 and D. Tekeli ., Analysis of Glimepiride by Using derivative spectrop ." **J . of pharmaceutical and Biomedical Analysis"** ., 24 , 3 , 507-515, (2001) .
- 13- R. T . Sane , S. N . Menon , S . Inamdar , M . Mote , and G . Gundi ., Simultaneous Determination of pioglitazone and Glimepiride by High Performance Liquid Chromatography . "**J. Chromatography"** ., 59 ,7-8, 415-453, (2004)
- 14- D.Jain¹ , S . Jain² , and M. Amin¹ ., Simultaneous Estimation of Metformin Hydrochloride , Pioglitazone Hydrochloride , and Glimepiride by RP – HPLC in Tablet formulation . "**J. of Chromatography Science "** ., 46 ., 6, 501-504 , (2007) .
- 15- K. S . Lakshmi , T . Rajesh , and S. Sharma ., Determination of pioglitazone and Glimepiride in pharmaceutical formulations and Rat plasma by RP- Lc ." **International J. of Pharmtech Research "**., 1,3,496-499, (2009) .
- 16- I. U. Khan , F. Aslam , M. Ashfaq , and M .N Asghar Determination of glimepiride in pharmaceutical formulations using HPLC and First – derivative spectrophotometric methods . "**J. of Analytical chemistry"** 64,2,171-175, (2009) .
- 17- S. R. Dhaneshwar , J. V . salunkhe , and V . K . Bhusiri ., Validated HPLC Method for simultaneous Estimation of metformine Hydrochloride , Atorvastatin and Glimepiride in Bulk Drug and formulation . "**J. of Analytical and Bio analytical Techniques "**., 1,109, (2010) .
- 18 -V . V . Karkhanis , and A . D . Captain . , Development and Validation of 1 Aliquid Chromatographic Method for Estimation of Glimepiride in Tablet Dosage Form . "**International J. of Pharmaceutical Science and Research "** . , 4 , 7 , 2742 – 2745 , (2013) .
- 19 - K . S . Lakshmi , T . Rajesh , S . Sharma , and S . Lakshmi . , Development and Validation of Liquid Chromatographic and U . V derivative spectrophotometric methods for the detetermination of metformine , Pioglitazone and Glimepiride in pharmaceutical formulations . "**Der pharma chemical "**, 1 , 1 , 238 – 246 , (2009)