تطوير طريقة ضوئية وأخرى بالاستشراب السائل عالي الأداء لمعايرة الأزيلاستين بوصفه مادةً أوليةً وفي أشكاله الصيدلانية

جمعه الزهوري*

الملخص

طُوِّرَتْ في هذا البحث طريقتا تحليل لمادة الأزيلاستين بوصفه مادةً أوليةً وفي شكلها الصيدلاني (بخاخ أنفي Nasal Spray) الأولى باستخدام تقنية الطيف الضوئي والثانية باستخدام تقنية ال HPLC .

تعتمد الطريقة الأولى على قياس الامتصاص عند طول موجة الامتصاص الأعظمي 284 نم إذْ قيس الأمتصاص عند طول الموجة المذكورة، وكانت العلاقة طردية بين الامتصاص والتركيز ضمن المجال 0.001 – 0.008 غ% .

وقد طُبِّقَتِ الطريقة على معايرة المادة في مستحضرها الصيدلاني /بخاخ أنفي/ وكانت النسبة المئوية للمردود (10 قراءات مكررة) هي 99.378 ± 1.1.

وقد وجد أن السواغات الداخلية في المستحضرات لا تؤثر في امتصاص المادة عند طول موجتها الأعظمية، كما قورنت الطريقة بالطريقة الدستورية لمعايرة المادة الأولية.

فضلاً عن ذلك فقد طُوِّرَتْ طريقة للمادة نفسها تعتمد على استخدام تقنية ال HPLC باستخدام عمود فصل ODS (C18) 25 سم X 4.6 ملم، وطور متحرك مؤلف من الأسيتونتريل مع وقاء فوسفاتي بنسبة 1 : 1 باستخدام نظام الضخ الأحادي.

المادة أعطت فصلاً جيداً، وكان زمن الاحتباس 1.467 دقيقة.

الكلمات المفتاح : أزيلاستين هيدروكلوريد – بخاخ أنفي – مقياس الطيف الضوئي – الاستشراب السائل عالي الأداء

* أستاذ- قسم الكيمياء التحليلية والغذائية – كلية الصيدلة – جامعة دمشق

Development of Spectrophotometric and HPLC Methods for the determination of Azelastine as Raw material and in Dosage form

Joumaa Al-Zehouri*

Abstract

In this research two analytical methods were developed for the determination of Azelastin as raw material and in Nasal Spray formulation.

The first method was spectrophotometric while the other used the technic of HPLC

The first method based on measuring the absorbance at λmax 284 nm .

The relationship between the absorbance and the concentration is rectilinear over the range 0.001 – 0.008 g %.

The proposed spectrophotometric method was successfully applied to the determination of Azelastin in nasal spray.

The percentage recoveries were 99.378±1 (10 duplicate readings)[1]

No interference was noticed from co-formulated drugs.

For the absorbance at λmax the obtained results were in good agreement with which obtained by the Pharmacopeia method.

In addition, a method was developed for was developed to determine the same substance relying on the use of HPLC techniqce, achieved on HPLC separation column ODS C_{18} (25cm × 4.6 nm).

While the mobile phase was acetonitrile, phosphate buffer 1:1 with isocratic mode.

The substance gave a good separation while the retention time was 1.467 min.

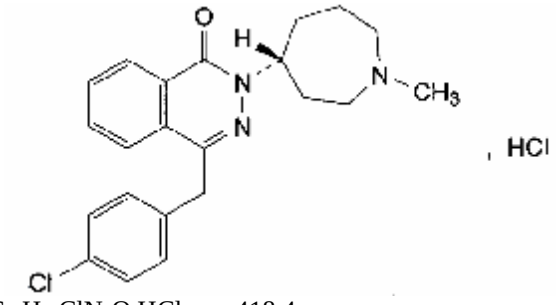
Key words : Azelastin-HCl , Nasal Spray , Spectrophotometer , HPLC

* Prof. Department of Analytical and Food Chemistry – Faculty of Pharmacy – Damascus University.

مقدمة:

مع أن مادة Azelastine HCl (الشكل 1) مدرجة في بعض دساتير الأدوية كالدستور البريطاني والأوربي [1,3] وغير مدرجة في بعضها الآخر كالأمريكي والياباني [2,4] وأنها استخدمت منذ مدة من الزمن في المجال الصيدلاني وعرفت كمادة مضادة للحساسية antihistamine لمعالجة الرشح التحسسي allergic rhinitis ودخلت في العديد من أشكالها الصيدلانية، إلا أنه حتى الآن لم يدرج أي من دساتير الأدوية طريقة لمعايرة هذه المادة في أشكالها الصيدلانية. وقد اكتفت بعض الدساتير مثل دستور الأدوية البريطاني والأوربي [1,3] بتقديم طريقة لمعايرة هذه المادة بمقياس الحمض والقلوي بالوسط اللامائي ونظراً إلى أنَّ هذه الطريقة تطبق حصراً بالوسط اللامائي ولامجال لتطبيقها بالوسط المائي الذي يشكل وسط حل المادة الدوائية في أشكالها ، لذا قمنا بتطوير طريقة سهلة وذات دقة ومصدوقية لمعايرة الأزيلاستين في شكله الصيدلاني.

وقد سجلت عالمياً بعض الطرائق التحليلية لمعايرة هذه المادة سواء في البلازما البشرية [5,6,9] أو في دم الجرذان [7] وكذلك في دم خنزير غينيا [8] وجميعها باستخدام تقنية ال HPLC.



$C_{22}H_{24}ClN_3O,HCl$ 418.4

الشكل (1) الصيغة الكيميائية للأزيلاستين هيدروكلوريد (1)

وعلى الرغم من اندراج هذه المادة بالدستور البريطاني والأوربي إلا أن الدستورين المذكورين لم يقدما حتى الآن طريقة لمعايرة هذه المادة في أشكالها الصيدلانية.

المواد والطريقة:

أولاً: المواد

1- المواد العيارية: Standards Substances

أُمِّنَتْ مادة أزيلاستين هيدروكلوريد مباشرة من شركة SCHUTZ من ألمانيا – هامبورك، وكان رقم الطبخة 311040331.

2- الأشكال الصيدلانية: أُمِّنَ بخاخ أنفي من السوق المحلية بتركيز 1 % في وسط مائي.

3- الكيماويات:

- أسيتونتريل Lichrosolv® CH_3CN من شركة ميرك الألمانية رقم الطبخة 1142912500

- وقاء فوسفاتي – شركة ميرك الألمانية بدرجة نقاوة محاليل HPLC.

4- عمود HPLC محشو ب Rp18 طوله 25 سم وقطره 4.6 ملم من شركة Thermoguest.

ثانياً: الأجهزة المستخدمة:

1- جهاز طيف ضوئي من نمط Ce 7200 لشركة Cecil البريطانية مع خلية كوارتز 1 سم.

UV-Vis Spectrophotometer , Ce 7200 ,Cecil with 1 cm quartz cell.

2- جهاز HPLC هيتاشي لشركة ميرك Elite Lachrom L-2200 يعمل نظام الضخ الأحادي Iso gradient وبالنظام المدروج Gradient .

ثالثاً : تحضير المحاليل للمعايرة الطيفية:

- تحضير المحلول العياري من الأزيلاستين هيدروكلوريد.

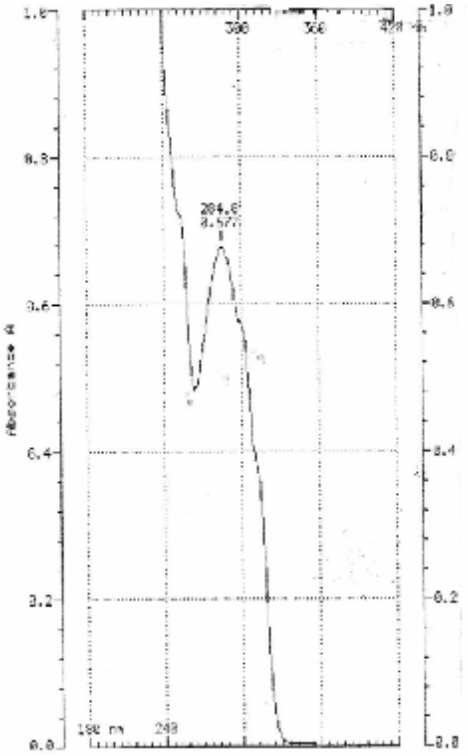
يوزن 100 مغ من المادة بدقة عالية ثم توضع في بالون معاير سعة 100 مل وتحل في 25 مل ماءً مقطراً، ثم توضع مدة 5 دقائق بجهاز Ultra sonic وبعدها تمدد بالماء المقطر إلى خط العيار ونمزج مدة 1 دقيقة.

حتى خط العيار.

طرائق العمل في المعايرة الطيفية:

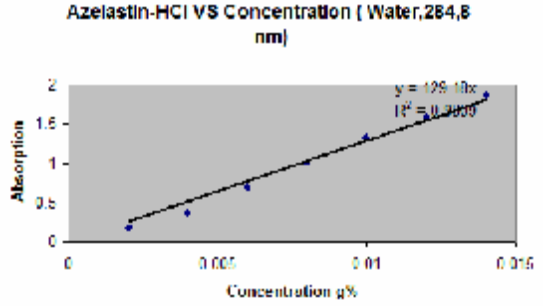
1- تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي:

أُجْرِيَ مسح طيفي لمحلول عياري من الأزيلاستين هيدروكلوريد بتركيز 0.006 %ضمن المجال 200 – 400 نم، فأعطى طول موجة امتصاص أعظمي تعادل 284.8 نم. (الشكل 2) وقد أبدى أيضاً موجة امتصاص أعظمي عند طول الموجة 213 نم لم نستخدمها بسبب التداخل الذي أبدته مع السواغات.



الشكل (2): تحديد طول موجة الامتصاص الأعظمي للأزيلاستين هيدروكلوريد .

2- تُحَضَّرُ سلسلة عيارية بنقل كميات من المحلول العياري إلى 7 بوالين معايرة سعة كل واحد 50 مل، إذْ يضاف إلى البالون الأول 1 مل والثاني 2مل وهكذا ....ثم يمدد المحلول إلى خط العيار بالماء المقطر فنحصل على سلسلة عيارية يراوح تركيزها بين 0.002 غ % وحتى 0.014 غ%. بعد مزج البالونات جيداً ، يُقَرُأ الامتصاص عند الموجة 284.8 مقابل الماء كبلانك، وبعدها رسمنا الخط المعياري الذي يربط قراءات الامتصاص مقابل التركيز، وتحدد معادلة الانحدار Regression equation (الشكل 3) إذْ عدد المكررات = 5



الشكل 3 : العلاقة الخطية بين تركيز الأزيلاستين وامتصاصها

3- تطبيق الطريقة المقترحة على المواد الأولية:

طُبِّقَتِ الطريقة المقترحة على المواد الأولية النقية من خلال حساب التركيز من معادلة الانحدار ويلخص الجدول (1) النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول (1) تطبيق الطريقة المقترحة على المادة الأولية (عدد المكررات = 5)

الكمية المأخوذة غ%	الكمية المكتشفة غ%	المردود
0.001	0.001005	% 100.5
0.002	0.00202	%101
0.004	0.00397	%99.42
0.006	0.00584	% 97.37
0.008	0.00788	% 98.6

متوسط المردود = 99.378 % ± 1.1

4- طريقة العمل على الشكل الصيدلاني ((بخاخات أو قطورات أنفية)

يُنْقَلُ 2مل من الشكل الصيدلاني التجاري (1%) باستخدام ممص معاير سعته 2مل إلى بالون معاير سعة 50 مل، وتمدد بالماء المقطر إلى خط العيار، وتمزج 5 دقائق باستخدام حوض التراسونك Ultrasonic bad، ثم يقاس الامتصاص عند طول الموجة 284 نم مقابل الماء، ويُحَدَّدُ محتوى العبوة من المادة الفعالة إمَّا من الخط البياني أو من معادلة الانحدار (الجدول 2).

الجدول (2) المعطيات الأساسية للطريقة المقترحة :

اسم المادة	أزيلاستسن هيدروكلوريد
طول الموجة λ الأعظمي	284.8 نم
الامتصاصية المولية Molar absorptive	6549,58
مجال التركيز Concentration range	0.014-0.002 غ %
معادلة الانحدار Regression equation	الأمتصاص = 166.88 X التركيز (غ%)
معامل الارتباط R^2	0.9809
مجال التطبيق	مواد أولية ، بخاخات (قطورات) أنفية

تطوير الطريقة الاستشرابية:

تحضير الطور المتحرك: حُضِّرَ الطور المتحرك بمزج الأسيتونتريل مع الوقاء الفوسفاتي (1 غرام من فسفات ثنائية الصوديوم الحامضة في ا ليتر ماءً مقطراً)؛ وذلك بنسبة 50% لكل منهما.

تحضير المحلول المعياري:

يُوزَنُ 100 ملغ من مادة أزيلاستين هيدروكلوريد العيارية وتوضع في بالون معاير سعة 100 مل ثم يضاف 50 مل من الطور المتحرك، ويوضع البالون في حوض التراساونك مدة 5 دقائق ثم يمدد ل100 مل بالطور المتحرك، وبعد ذلك يؤخذ 1 مل من المحلول الناتج بممص معاير سعة 1 مل، ويوضع في بالون معاير سعة 10 مل، ويكمل بمحلول الطور المتحرك.

تحضير محلول العينة:

ينقل 1مل من محلول العينة (1% نظرياً) إلى بالون معاير سعة 100 مل، ويكمل إلى خط العيار بالطور المتحرك.

الشروط الاستشرابية:

نوع المتحري: متحري أشعة فوق البنفسجية

طول الموجة: 213 نم

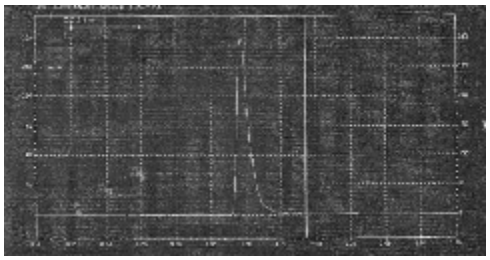
حجم الحقنة: 20 ميكروليتراً

الطور المتحرك: أسيتونتريل / وقاء فوسفاتي (50: 50)

العمود المستخدم: عمود محشو بطور متعاكس ODS C18 Hypersil® رقم الطبخة 5654/120/5 ورقم العمود 3-39839 طول العمود وقطره: 25 سم X 4.6 ملم سرعة الطور المتحرك: 1.5 مل / دقيقة

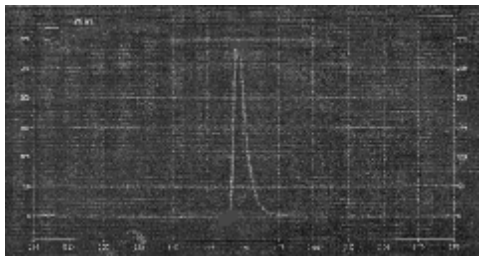
نظام الضخ: أحادي Isocratic

بعد التأكد من أن الطور المتحرك لم يعط أي قمة، حُقِنَ 20 ميكرليتراً من المحلول العياري 6 مرات، وأخذ وسطي مساحة القمة فكان 7328330، وتبيّن أن زمن الاحتباس 1.47 دقيقة (الشكل 4) .



الشكل 4 : المخطط الأستشرابي للأزيلاستين العياري .
(100مكغ/مل)

حُقِّنَ 20 ميكروليتراً من محلول العينة وحددت مساحة القمة الناتجة وحُسِبَ التركيز بالمقارنة بقمة العياري، (الشكل 4) وقد تم التحقق من صلاحية الطريقة وفق دستور الأدوية الأمريكي فكانت محققة للدقة والمصداقية والمتانة، وأظهرت خطية واضحة ضمن المجال 10-500 مكغ/مل، وقورنت الطريقة بالطريقة الدستورية فيما يخص المادة الأولية، وتبيّن أن قيمة T و F متوافقتان مع حدود الثقة عند 95 % .



الشكل (5) المخطط الاستشرابي لمحلول العينة .

الاستنتاج:

طُوِّرَتْ طريقة ضوئية باستخدام جهاز طيف الامتصاص الضوئي وأخرى باستخدام جهاز ال HPLC لمعايرة الأزيلاستسن بوصفه مادةً أوليةً وفي مستحضراتها الصيدلانية على شكل بخاخ أنفي وقد تم التحقق من صلاحية الطريقتين وننصح بتطبيقهما في مجال المراقبة الدوائية الكيميائية لهذه المادة في مستحضراتها المذكورة.

References

1- British Pharmacopeia 2007
2- United State Pharmacopeia (USP 34-NF 29)2013
3- European Pharmacopeia 7th edition 2011
4- Japanese Pharmacopeia (JP ,14th edition)
5- Zha, W. and Shum,L. Simultaneous determination of azelastine and its major metabolite desmethylazelastine in human plasma using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J.Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 906 (2012) 69-74
6- Park,Y.S et al Determination of Azelastine in Human Plasma by Validated Liquid Chromatography Coupled to Tandom Mass Spectrometry (LC-ESI/MS/MS) for the Clinical Studies> Int J Biomed Sci , 2(2010)120-127
7- Heinemann ,U et al Simultaneous enantioselective separation of azelastine and three of its metabolites for the investigation of the enantiomeric metabolism in rats.Liquid chromatography – ionspray tandem mass spectrometry and electrokinetic capillary chromatography. J.Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 793 (2003) 389-404
8- Langevin ,C.N et al High Performance Liquid Chromatographic determination of azelastine and desmethylazelastine in quinea pig plasma and lung tissue. Biomed Chromatogr. 1 (1993) 7-11
9- Pivonka, J et al, Determination of azelastine and desmethylazelastine in human plasma by high-performance liquid chromatography. J.Chromatogr. 420 (1987) 89-98.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2013/12/10.