استخدام الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء HPLC في تحليل بعض الفيتامينات

جمال محفوض

قسم الكيمياء ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية

تاريــخ الإيداع 2006/05/16
قبل للنشــر في 2007/02/04

الملخص

يهدف هذا البحــث إلــى اســتخدام طريقــة الكروماتوغرافيــا الــسائلة العاليــة الأداء (HPLC) high performance liquid chromatography للتوصل إلى الــشروط المثلــى فــي تحليــل بعــض الفيتامينات الموجودة سوية في بعض المستحضرات الدوائية السورية وهــي نياســينااميد، بيريدوكــسين هيدروكلوريد، ريبوفلافين والتيامين هيدروكلوريد، كما دُرس تأثير pH الوسط في فعالية الفصل. إختبرت الطريقة المقترحة على عينات دوائية منتجة محلياً. وتبين إمكانية استخدامها لأغراض المراقبة الدوائية.

الكلمات المفتاحية: الكروماتوغرافيــا الــسائلة العاليــة الأداء HPLC، الفيتامينــات: نياسيناميد، بيريدوكــسين هيدروكلوريــد، ريبــوفلافين وتيــامين هيدروكلوريد.

Using the high performance liquid chromatography (HPLC) for analysis of some vitamins

Jamal Mahfoud
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

Received 16/05/2006
Accepted 04/02/2007

ABSTRACT

The purpose of this article is how to use HPLC technique for analysis of some vitamins. The studied vitamins are niacinamide (vit.PP), pyridoxine hydrochloride (vit.B_6), riboflavin (vit.B_2) and thiamine hydrochloride (vit. B_1), which can be found in some Syrian pharmaceutical preparations.

Key words: High performance liquid chromatography (HPLC), Vitamin, Niacinamide, Pyridoxine hydrochloride, Riboflavin, Thiamine hydrochloride.

المقـــدمـــة

تعدُّ الفيتامينات من المركبات الضرورية لنمو جسم الإنسان بشكل سليم وطبيعي لـــذلك لا بد من تحليلها لمعرفة تراكيزها في المركبات التي توجد فيها (كالأغذية والمستحضرات الدوائية) [1]. وخاصة في مجال الصناعات الدوائية التي تهم الإنسان بشكل رئيس لذلك لا بد من تحديدها كمياً بدقة عالية، كما أن اختيار طريقة التحليل المناسبة هـــي فـــي غايـــة الأهمية وخاصة عندما تكون المواد المدروسة عبارة عن مزيج من الفيتامينات.

إن طريقة تحليل فيتامين وحيد تتم بسهولة وذلك باستخدام بعض الطرائـــق التحليليـــة العادية، مثل المعايرات الحجمية [2] وطرائق التحليل الطيفي [3] وغيرها، لكن ليس مـــن السهولة تحليل عدة فيتامينات موجودة مع بعضها بعضاً بالطرائق السالفة الـــذكر، والتـــي تعتمد على استخلاص فيتامين ما من مجموعة فيتامينات، ومن ثم القيام بمعايرته، وذلـــك بسبب أن هذا الفيتامين يمكن أن يتخرب أو استخلاصه لا يتم أحياناً بشكل كامـــل، كمـــا يمكن أن يستخلص بعض الفيتامينات الموجودة معه جزئياً، أو قد تحدث بعض التداخلات في أثناء عملية التحليل [4]. ولتلافي هذه الأسباب اســـتُخدمت طريقـــة الكروماتوغرافيـــا السائلة العالية الأداء لتحليل الفيتامينات المدروسة المَوجودة مع بعضها بعضاً.

مـــواد البحث وطرائقـــه

1 ــ المواد المستخدمة:

استُخدمت مواد قياسية أولية بنقاوة تتراوح ما بين 99.7% -99.9% مـــن شـــركة (BASF) الألمانية لتحضير جميع محاليل الفيتامينات العيارية المدروسة.

وكانت جميع المحلات المستخدمة ذات نقاوة عاليـــة تتـــراوح مـــا بـــين 99.8% - 99.98% من الصنف (HPLC - grade) وهي من شركة Scharlau الاسبانية.

أما العينات المدروسة فكانت من إنتاج شركات دوائية سورية، حيث حُللت الفيتامينات المدروسة الموجودة في مستحضر دوائي سائل (شراب) وفي مستحضر دوائـــي صـــلب (مضغوطات) ويبين الجدول (1) أسماء الفيتامينات المدروسة وصيغها [5-6].

الجدول (1) أسماء الفيتامينات المدروسة وصيغها

اسم الفيتامين	اسمه المختصر	صيغته الكيميائية
نياسيناميد	vit. PP	$C_6H_6N_2O$
بيريدوكسين هيدروكلوريد	vit. B_6	$C_8H_{11}NO_3$. HCl
ريبوفلافين	vit. B_2	$C_{17}\ H_{2O}\ N_4O_6$
تيامين هيدروكلوريد	vit. B_1	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$. HCl

2 ــ الأجهزة المستخدمة:

استُخدم جهاز الـ HPLC الأمريكي الصنع من ماركة Waters، والذي يتألف من مضخة ذات قدرة ثابتة للضخ Waters 1515, isocratic HPLC pump، وكاشف يعمل في مجال الأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV–VIS) نموذج Waters 2487 Dual λ Absorbance Detectorمربوط مع حاسوب يحوي البرامج الخاصة بهذا التحليل، وكان العمود المستخدم هو C_{18} أو ما يعرف وفق دستور الأدوية الأمريكي USP بالعمود L1 وهو يحوي الحشوة octa decyl silane (ODS)، المطعمة كيميائياً على سيليكا مسامية.

3 – اختيار المحل المناسب للعينات المدروسة:

اختير المزيج المؤلف من (ماء - أسيتونتريل - حمض الخل الثلجي) كمحل للعينات المدروسة وبنسب قدرها [1:5:94] على الترتيب. إن سبب اختيار هذا المحل عائد لعدة عوامل أهمها أن جميع الفيتامينات تنحل في هذا المحل، هذا المزيج لا يمتص الضوء عند طول الموجه المختارة لهذه الفيتامينات وهي 280 نانومتراً.

4 – اختيار الطور المتحرك:

استُخدم الطور المتحرك المؤلف من المزيج الآتي (ماء – ميتانول – حمض الخل الثلجي) وبنسب قدرها [1:27:72] على الترتيب والذي يحتوي في كل 100 مل منه على 140 مغ من 1 – هبتان سلفونات الصوديوم. يرشح المحلول على مرشحات قطر مساماتها 0.45µm، ومن ثم تنزع جزيئات الغاز من المحلول باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية ultrasonic نموذج Elma الألماني الصنع. وقد اختير هذا المزيج كطور متحرك لملاءمته لتحليل هذه الفيتامينات .

5 – تحضير محاليل العينات:

أ ــ تحضير محاليل عينات مستحضر المضغوطات:

- تحضير المحلول العياري لمستحضر المضغوطات:

وُزن 200 مغ من فيتامين نياسيناميد العياري، و40 مغ من فيتامين بيريدوكسين هيدروكلوريد العياري، و20 مغ من فيتامين الريبوفلافين العياري و20 مغ من فيتامين تيامين هيدروكلوريد العياري باستخدام ميزان الكتروني حساس دقة قياسه±0.1mg، أذيبت جميع الأوزان السابقة بكمية مناسبة من المحل ثم نقلت كمياً إلى دورق حجمي سعة 25 مل. غمس الدورق الحجمي في حمام مائي بدرجة حرارة مابين ^{o}C 75– 65 مدة 10 دقائق مع الخض المنتظم حتى تمام الانحلال، تبرد محتويات الدورق ويكمل بالمحل حتى العلامة.

يؤخذ (5 مل) من محلول الفيتامينات السابق ويوضع في دورق حجمي سعة 50 مل ويكمل بالمحل حتى العلامة، ثم يرشح المزيج. ومن ثم تصبح تراكيز الفيتامينات في المحلول العياري النهائي كما هو موضح في الجدول (2).

● تحضير محلول الاختبار لمستحضر المضغوطات (نيستافيت NESTAVIT):

إن هذا المستحضر هو على شكل مضغوطات ملبسة بالفيلم وهو من إنتاج شركة سورية. ولتحضير محلول الاختبار لهذه الفيتامينات لابد من معرفة الكمية المصرح عنها من الفيتامينات في المضغوطة الواحدة وذلك من قبل الشركة المصنعة. لاحظ الجدول (2) الذي يبين ذلك.

الجدول (2) كميات الفيتامينات المصرح عنها في المضغوطة الواحدة لمستحضر لمضغوطات وفي 1 مل من مستحضر بولي فيت شراب وتراكيز محاليلهما العيارية

اسم الفيتامين	تراكيز الفيتامينات			
	شراب		مضغوطة	
	المصرح عنها mg/ml	المحلول العياري mg/ml	المصرح عنها mg/tab.	المحلول العياري mg/ml
vit. PP	10	1.0	20	0.80
vit. B_6	2	0.2	4	0.16
vit. B_2	2	0.2	5	0.20
vit. B_1	1	0.1	2	0.08

لتحضير محلول العينة المدروسة وُزنت 30 مضغوطة وحُسب الوزن الوسطي للمضغوطة الواحدة. ثم سحقت المضغوطات بشكل ناعم وأخذت كمية من هذا المسحوق بما يعادل وزن حبة واحدةg 1.2 وأذيبت بكمية مناسبة من المحل ثم نقلت كمياً إلى دورق حجمي سعة 25 مل. وغمس الدورق الحجمي ضمن حمام مائي بدرجة حرارة ما بين 65 – 75 ^{o}C مدة 10 دقائق مع الخض المنتظم حتى تمام الانحلال، بعد ذلك برد الدورق وأكمل الحجم بالمحل حتى العلامة ثم رشح وطرد الغاز منه. وبهذا تكون تراكيز الفيتامينات المدروسة المصرح عنها في محلول الاختبار مساوية لتراكيز الفيتامينات في المحلول العياري المحضر للمضغوطات والموجودة في الجدول (2) .

ب ــ تحضير محاليل عينات مستحضر الشراب

● تحضير المحلول العياري لمستحضر الشراب:

وُزن 100 ملغ من نياسيناميد العياري، و20 ملغ من فيتامين بيريدوكسين هيدوكلوريد العياري، و20 ملغ من فيتامين الريبوفلافين العياري و10 ملغ من فيتامين التيامين هيدروكلوريد العياري ووُضعت الأوزان السابقة في دورق حجمي سعة 100 مل، ثم أذيبت بكمية من المزيج المحل حتى تمام الانحلال، بعد ذلك أكمل الحجم إلى 100 مل بالمزيج المحل. وقد كانت تراكيز الفيتامينات في المحلول العياري كما هي موضحة في الجدول (2).

● تحضير محلول الاختبار لمستحضر الشراب (نقط فموية بولي فيت Polyvit):

إن مستحضر البولي فيت هو على شكل نقط فموية ومن إنتاج شركة سورية ويحوي على مزيج من الفيتامينات. ويبين الجدول (2) كمية الفيتامينات المصرح عنها في 1 مل من الشراب من قبل الشركة المصنعة.

ولتحضير محلول عينة الاختبار من مستحضر الشراب المدروس أخذ 10 مل من عينة المستحضر السائل ووضعت في دورق حجمي سعة 100 مل وأكمل الحجم بالمحلل حتى العلامة. وبهذا تكون تراكيز الفيتامينات المدروسة المصرح عنها في عينة الاختبار تساوي تراكيز الفيتامينات في المحلول العياري المحضرللشراب كما هي في الجدول (2).

ج- تحضير محاليل المنحنى العياري :

حُضرت محاليل السلسلة العيارية بطريقة تحضير المحاليل العيارية الخاصة بالمستحضرات نفسها لكن بالتراكيز الموضحة في الجدول (3) .

الجدول (3) تراكيز محاليل السلسلة العيارية

اسم الفيتامين	المحلول (1) mg/ml	المحلول (2) mg/ml	المحلول (3) mg/ml	المحلول (4) mg/ml	المحلول (5) mg/ml
vit. PP	0.40	0.6	0.80	1.0	1.20
vit. B_6	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
vit. B_2	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
vit. B_1	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25

طُبقت الشروط الآتية في طريقة التحليل هذه:

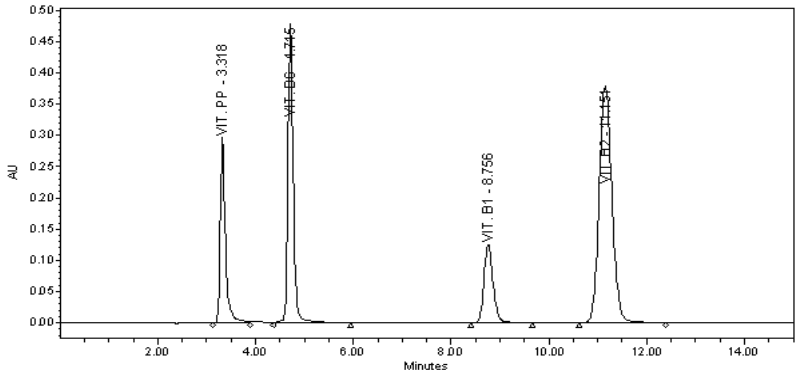
- العمود المستخدم هو C18 او ما يعرف بـــ L1 أبعاده (250 mm× 4.6 mm).
- كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV ويعمل عند طول الموجه λ= 280nm .
- حجم خلية الحقن 20 µl.
- تدفق الطور المتحرك المستخدم هي 1ml/min .
- زمن التحليل الكلي بحدود 15 دقيقة.
- درجة الحرارة المستخدمة هي درجة حرارة الغرفة.
- المحل المستخدم هو مزيج من (ماء – اسيتونتريل – حمض الخل الثلجي) بنسبة (1:5:94)على الترتيب.
- الطور المتحرك المستخدم هو (ماء – ميتانول – حمض الخل الثلجي) بنسبة (1:27:72) على الترتيب والذي يحتوي في كل 100 مل منه على 140 مغ من 1 ــ هتبان سلفونات الصوديوم وتم تعديل قيمة pH المحلول للطور المتحرك بإضافة محلول من هيدروكسيد الصوديوم تركيزه (2N) حتى pH= 5 ± 0.2 حيث عند قيمة للحموضة أقل من 5 كان الفصل سيئاً نتيجة التداخل الحاصل ما بين قمة $vit.B_1$ وقمة $vit.B_2$. أما عند قيمة pH أكبر من الـ 5.5 فيتناقص زمن الاحتفاظ(retention time) لفيتامين vit.PP ويصبح قليلاً جداً. لهذا السبب ضُبطت قيمة درجة حموضة الطور المتحرك عند قيمة للـ pH=5 ± 0.2 .

النتائـــج والمناقشـــة

يوضح الشكل (1) كروماتوغرام المحلول العياري الخاص بمستحضر المـــضغوطات نيستافيت مع جدول يبين اسم الفيتامين، وزمن الاحتفاظ، ومساحة القمة ونسبتها المئويـــة، وارتفاعها ونسبتها المئوية، وكمية (تركيز) الفيتامين ونوع الواحدة المستخدمة.

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	NESTAVIT. Standard	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard		
Vial:	1	Acq. Method:	4 VITAMINES
Injection #:	4		
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	
Column Type:	C18, L=250 mm		

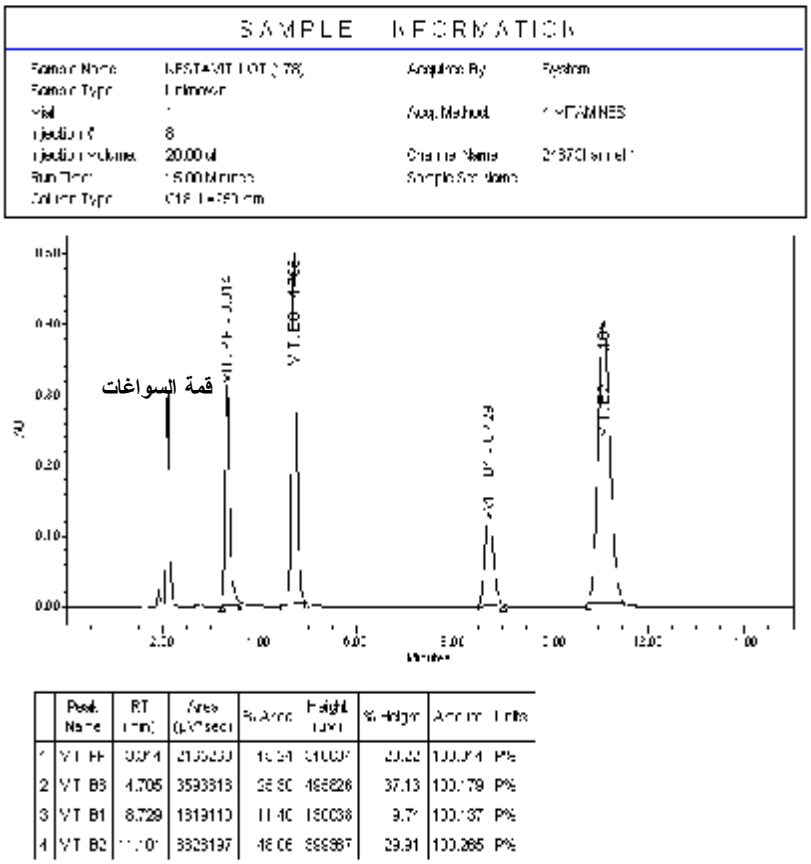


	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	VIT. PP	3.318	2164957	15.27	295029	23.08	100.000	P%
2	VIT. B6	4.715	3587391	25.30	477473	37.36	100.000	P%
3	VIT. B1	8.756	1616889	11.40	125406	9.81	100.000	P%
4	VIT. B2	11.151	6810166	48.03	380217	29.75	100.000	P%

الشكل (1) كروماتوغرام المحلول العياري للفيتامينات المدروسة المـــستخدم فـــي مستحـــضر المضغوطات نيستافيت.

في أثناء إدخال كميات الفيتامينات المدروسة الخاصة بالمحلول العيـــاري للكمبيـــوتر اعتُبرت جميع قيمها 100 وواحداتها كنسبة مئوية (P%) لأن قيمة تراكيزهما في المحلول العياري وفي محلول الاختبار حُضّرت كقيمة نهائية متساوية كما هو مشار إليه في أثنـــاء تحضير المحاليل. وهذا ما يساعد على حساب النسبة المئوية المحققة من الكمية المصرح عنها في المستحضر مباشرة وذلك من مقارنة مساحة قمم المحلول العياري مع مـــساحة قمم محلول الاختبار. وهو ما يعمل به غالباً في أثناء تحليل الأدوية[7-10].

كما أن الشكل (2) يوضح كروماتوغرام عينة المضغوطات نيستافيت رقم الوجبة (178) مع جدول يبين بعض المقادير المحسوبة من هذا الكروماتوغرام وذلك بالمقارنة مع المحلول العياري وعند الشروط المطبقة عليه نفسها. ويبين الجدول (4) ملخصاً عن القمم (peaks) وبعض القيم الإحصائية لمستحضر المضغوطات نيستافيت، مثل: اسم العينة، ورقم أنبوب الحقن (vial)، والرقم التسلسلي للعينة المحقونة (.inj)، واسم القمة، وزمن الاحتفاظ، ومساحة القمة، وارتفاعها، وكمية (تركيز) الفيتامين، والقيمة الوسطية للمقادير المحسوبة، والانحراف المعياري (.Std. Dev) والنسبة المئوية للانحراف المعياري (%RSD) لمحلول عينة المضغوطات نيستافيت بالمقارنة مع محلولها العياري.



	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	VIT B6	3.074	2135233	16.24	241037	20.22	100.074	P%
2	VIT B3	4.705	3593813	26.80	466826	37.13	100.179	P%
3	VIT B1	8.729	1319113	11.40	180038	9.72	100.137	P%
4	VIT B2	11.101	3823197	46.06	599387	29.91	100.265	P%

الشكل (2) كروماتوغرام عينة الاختبار للفيتامينات المدروسة في مستحضر المضغوطات نيستافيت وجبة رقم (178).

الجدول (4) يبين ملخصاً عن القمم وبعض القيم الإحصائية الخاصة بمستحـــضر المـــضغوطات نيستافيت رقم الوجبة (178) بالمقارنة مع محلولها العياري.

Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	NESTAVIT. Standard	1	4	VIT. B1	8.756	1616889	11.40	125406	100.000	P%
2	NESTAVIT. LOT (178)	1	8	VIT. B1	8.729	1619110	11.40	130038	100.137	P%
Mean					8.743	1617999.207		127722.146	100.069	
Std. Dev.					0.019	1570.739		3275.09	0.10	
% RSD					0.22	0.10		2.564	0.097	

Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	NESTAVIT. Standard	1	4	VIT. B2	11.151	6810166	48.03	380217	100.000	P%
2	NESTAVIT. LOT (178)	1	8	VIT. B2	11.101	6828197	48.06	399367	100.265	P%
Mean					11.126	6819181.430		389792.243	100.132	
Std. Dev.					0.035	12749.695		13540.74	0.19	
% RSD					0.31	0.19		3.474	0.187	

Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	NESTAVIT. Standard	1	4	VIT. B6	4.715	3587391	25.30	477473	100.000	P%
2	NESTAVIT. LOT (178)	1	8	VIT. B6	4.705	3593818	25.30	495826	100.179	P%
Mean					4.710	3590604.317		486649.866	100.090	
Std. Dev.					0.007	4544.235		12977.37	0.13	
% RSD					0.15	0.13		2.667	0.127	

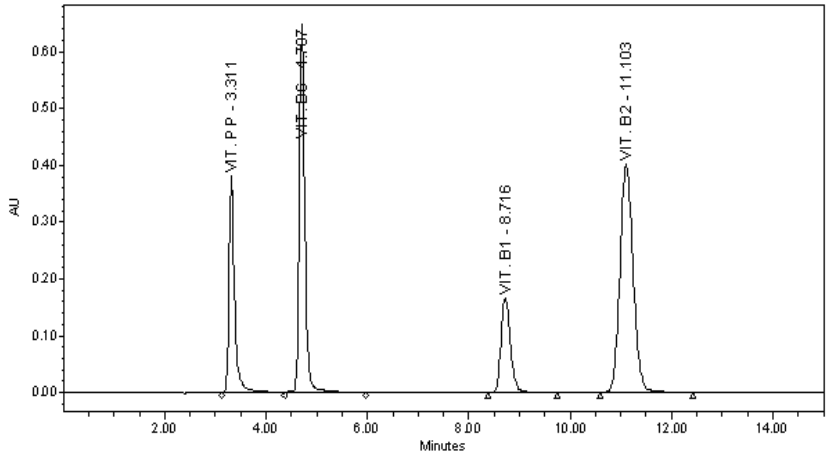
Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	NESTAVIT. Standard	1	4	VIT. PP	3.318	2164957	15.27	295029	100.000	P%
2	NESTAVIT. LOT (178)	1	8	VIT. PP	3.314	2165263	15.24	310034	100.014	P%
Mean					3.316	2165109.937		302531.488	100.007	
Std. Dev.					0.003	216.869		10609.85	0.01	
% RSD					0.08	0.01		3.507	0.010	

والشكل (3) يوضح كروماتوغرام المحلول العياري لمستحضر الشراب بولي فيت.

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	POLYVIT. L Standard	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard		
Vial:	1	Acq. Method:	4 VITAMINES
Injection #:	9		
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	
Column Type:	C18, L=250 mm		



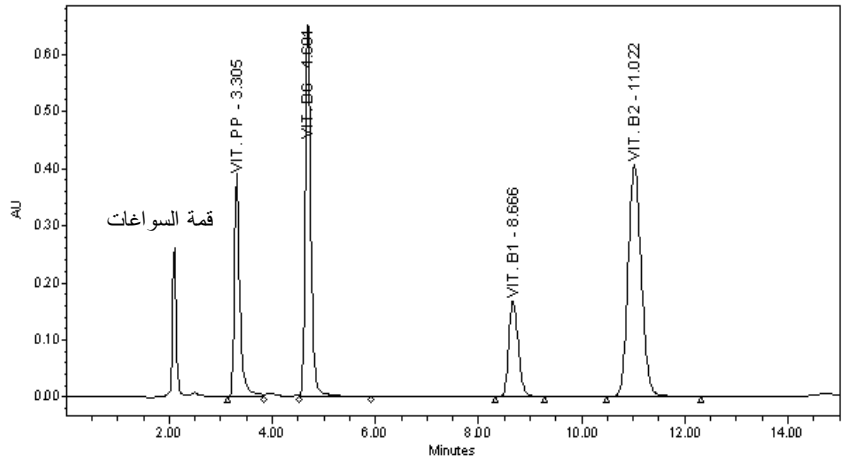
	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	VIT. PP	3.311	2892525	16.79	382006	23.84	100.000	P%
2	VIT. B6	4.707	5004744	29.05	652534	40.72	100.000	P%
3	VIT. B1	8.716	2158780	12.53	166174	10.37	100.000	P%
4	VIT. B2	11.103	7174446	41.64	401668	25.07	100.000	P%

الشكل (3) كروماتوغرام المحلول العياري للفيتامينات المدروسة المستخدم في مستحضر الشراب بولي فيت

كما أن الشكل (4) يمثل كروماتوغرام عينة الاختبار لمستحضر الشراب بولي فيت رقم الوجبة (069) مع جدول يبين بعض المقادير المحسوبة من هذا الكروماتوغرام وذلك بالمقارنة مع المحلول العياري وعند الشروط المطبقة عليه نفسها.

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	POLYVIT. LOT (069)	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown		
Vial:	1	Acq. Method:	4 VITAMINES
Injection #:	12		
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	15.00 Minutes	Sample Set Name:	
Column Type:	C18 , 250 mm		



	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	Units
1	VIT. PP	3.305	2871311	16.70	389686	24.04	99.267	P%
2	VIT. B6	4.691	4998099	29.08	656347	40.49	99.867	P%
3	VIT. B1	8.666	2152950	12.52	168207	10.38	99.730	P%
4	VIT. B2	11.022	7167020	41.69	406593	25.09	99.896	P%

الشكل (4) كروماتوغرام عينة الاختبار للفيتامينات المدروسة في مستحضر الشراب بولي فيت وجبة رقم (069) .

والجدول (5) يبين ملخصاً عن القمم (peaks) وبعض القيم الإحصائية لمستحضر الشراب بولي فيت بالمقارنة مع محلولها العياري .

الجدول (5) يبين ملخصاً عن القمم وبعض القيم الإحصائية الخاصة بمستحضر الشراب بـــولي فيت رقم الوجبة (069) بالمقارنة مع محلولها العياري .

Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	POLYVIT. standard	1	9	VIT. B1	8.716	2158780	12.53	166174	100.000	P%
2	POLYVIT. LOT (069)	1	12	VIT. B1	8.666	2152950	12.52	168207	99.730	P%
Mean					8.691	2155864.945		167190.497	99.865	
Std. Dev.					0.036	4122.848		1438.04	0.19	
% RSD					0.41	0.19		0.860	0.191	

Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	POLYVIT. standard	1	9	VIT. B2	11.103	7174446	41.64	401668	100.000	P%
2	POLYVIT. LOT (069)	1	12	VIT. B2	11.022	7167020	41.69	406593	99.896	P%
Mean					11.063	7170732.851		404130.655	99.948	
Std. Dev.					0.058	5250.997		3482.17	0.07	
% RSD					0.52	0.07		0.862	0.073	

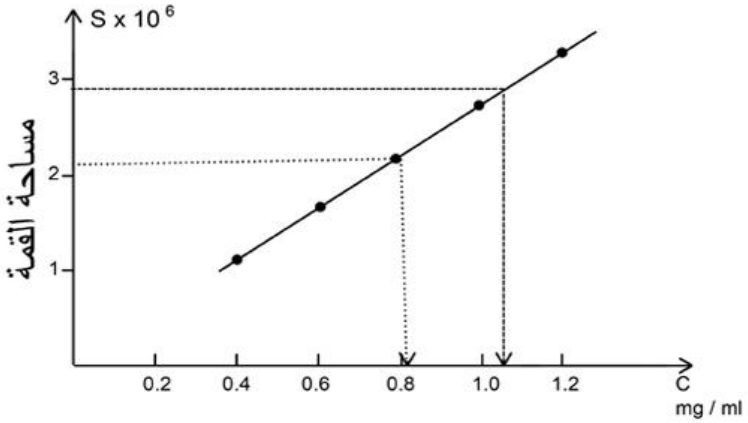
Peak Summary with Statistics

	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	POLYVIT. standard	1	9	VIT. B6	4.707	5004744	29.05	652534	100.000	P%
2	POLYVIT. LOT (069)	1	12	VIT. B6	4.691	4998099	29.08	656347	99.867	P%
Mean					4.699	5001421.688		654440.330	99.934	
Std. Dev.					0.011	4698.721		2696.28	0.09	
% RSD					0.24	0.09		0.412	0.094	

Peak Summary with Statistics

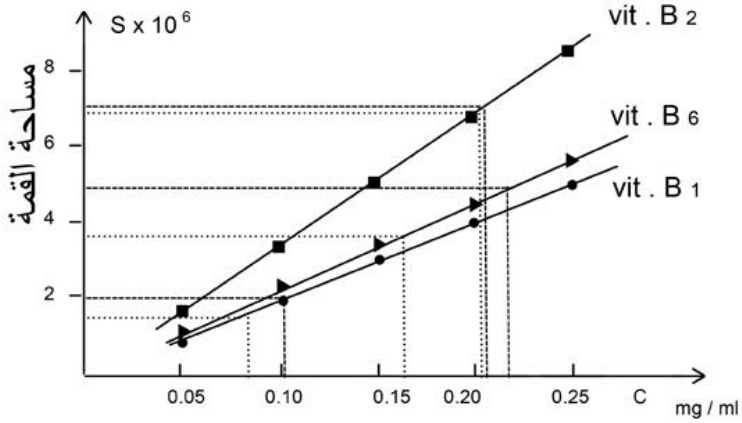
	Sample Name	Vial	Inj.	Peak Name	RT (min)	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	Amount	Units
1	POLYVIT. standard	1	9	VIT. PP	3.311	2892525	16.79	382006	100.000	P%
2	POLYVIT. LOT (069)	1	12	VIT. PP	3.305	2871311	16.70	389686	99.267	P%
Mean					3.308	2881917.798		385846.025	99.633	
Std. Dev.					0.004	15000.597		5430.23	0.52	
% RSD					0.13	0.52		1.407	0.521	

رُسمت المنحنيات العيارية لتراكيز السلسلة العيارية للفيتامينات المدروسة الموجـــودة في الجدول (3) مع مساحة قممها، ويبين الشكل (5) المنحنى العياري لفيتامين نياســـيناميد (vit. PP) القياسي، والشكل (6) المنحنى العيـــاري لكـــل مـــن $vit.B_6$، $vit.B_1$ و$vit.B_2$ القياسية.



الشكل (5) المنحنى العياري لفيتامين نياسيناميد (vit. PP) .

حيث يمثل الإسقاط : --- لمستحضر الشراب ، .... لمستحضر المضغوطات



الشكل (6) المنحنى العياري لكل من $vit.\ B_6$ ، $vit.\ B_1$ و $vit.\ B_2$.

حيث يمثل الإسقاط : --- لمستحضر الشراب ، .... لمستحضر المضغوطات

ومن خلال إسقاط قيمة مساحة القمم الكروماتوغرافية للفيتامينات المدروسة في كل من المستحضرين على المنحنيات العيارية نحصل على تراكيز الفيتامينات المدروسة، ومن ثم يمكن حساب نسبها المئوية المحققة كما هو موضح في الجدول (6) .

الجدول (6) تراكيز الفيتامينات المدروسة الناتجة عن تطبيق طريقة المنحنى العياري

تراكيز الفيتامينات						اسم الفيتامين
مضغوطات			شراب			
النسبة المئوية المحققة	المحضرة من المستحضر mg/ml	المحسوبة بيانياً mg/ml	النسبة المئوية المحققة	المحضرة من المستحضر mg/ml	المحسوبة بيانياً mg/ml	
102.5%	0.800	0.820	106.0%	1.000	1.060	vit. PP
103.1%	0.160	0.165	109.0%	0.200	0.218	vit. B_6
101.0%	0.200	0.202	102.5%	0.200	0.205	vit. B_2
102.5%	0.080	0.082	102.0%	0.100	0.102	vit. B_1

خلال عملية التحليل هذه ضُبطت قيمة درجة حموضة الطور المتحرك بحدود pH=5±0.2 وذلك نتيجة أن أفضل فصل تم عند هذه القيمة، حيث عندما تكون قيمة درجة الحموضة أقل من ذلك نجد أن فيتامين B_2 لن ينفصل بشكل جيد عن فيتامين B_1 أي يصبح تداخل بين القمتين وهذا ما يجعل عملية الحساب غير صحيحة وغير ممكنة. أما إذا كانت قيمة درجة الحموضة أكبر من القيمة المذكورة سابقاً فإن فيتامين PP سوف ينفصل بسرعة أي قيمة زمن الاحتفاظ سوف تنخفض بشكل ملحوظ وهذا غير مرغوب به في أثناء عملية التحليل في الـ HPLC .

اختيرت سرعة تدفق الطور السائل 1مل/دقيقة هو معدل تدفق معروف في الـ HPLC بدقة تحليله وسرعته وذلك من خلال علاقة فانديميتر [11-13] .

إن سبب اختيار كل من الطور المتحرك والمحل المستخدمين في عملية التحليل هذه هي إمكانية الحصول على فعالية فصل جيدة للفيتامينات المدروسة مقارنة مع بعض المحلات الأخرى.

ظهرت قمة في أثناء تحليل عينات الاختبار لكل من المستحضرين وذلك قبل زمن ظهور القمة التابعة لـ vit. PP أي عند زمن احتفاظ ما يقارب RT =2.1 min وهي تمثل قمة السواغات.

ومن خلال عرض الكروماتوغرامات العيارية ومقارنتها مع كروماتوغرامات المواد المدروسة نجد أن هناك تطابقاً كبيراً في أزمنة الاحتفاظ فضلاً عن صغر الانحراف العياري وهذا ما يؤكد أن دقة القياس عالية في هذا النوع من التحليل. ومن خلال مقارنة تراكيز الفيتامينات المدروسة في المحاليل العيارية مع محاليل مستحضرات المضغوطات والشراب نجد أن هناك تطابقاً كبيراً في النتائج لاحظ الجدولين (4) و(5) وهذا يدل على

أن تراكيز الفيتامينات في المستحضرات الدوائية المدروسة هي موافقة لما هو مصرح عنها من قبل الشركة المنتجة وهذا ما يؤكد جودة الأدوية السورية المدروسة.

يلاحظ عند استخدام طريقة المنحنى العياري أن قيم تراكيز الفيتامينات كانت أكبر من القيم الناتجة عن طريقة المقارنة القياسية المنجزة باستخدام محلول عياري واحد. وهذا عائد إلى أن دقة التحليل باستخدام المنحنى العياري هي أكبر من طريقة المقارنة القياسية، وذلك نتيجة استخدام عدة محاليل قياسية ومن ثم الخطأ المحتمل هو أقل عند تطبيق طريقة المنحنى العياري مقارنة مع طريقة المقارنة القياسية.

نستنتج مما سبق أن سبب اختيار طريقة الـ HPLC في تحليل المزيج المدروس من الفيتامينات عن غيرها من الطرائق يعود لأسباب كثيرة منها: لا تحتاج إلى وقت تحليل كبير، كلفتها الاقتصادية القليلة مقارنة مع استخدام طرائق غيرالـ HPLC، إذ خلال 15 دقيقة أي ما يعادل 15 مل من الطور المتحرك يتم تحليل الفيتامينات الأربع المدروسة وبحقنة مقدارها 20 ميكروليتراً من المحلول المدروس، كما أنه بهذه الطريقة يمكن تكرار التحاليل مرات عديدة وبثقة ودقة كبيرتين، بينما عند تطبيق طرائق أخرى في تحليل مثل هذه الفيتامينات وهي مجتمعة مع بعضها بعضاً يحتاج المحلل إلى مئات من الميلليترات أو أكثر فضلاً عن التداخلات التي تحدث عند تحليل فيتامين ما في مزيج من الفيتامينات، كما أن الوقت الطويل الذي تحتاجه هذه الطرائق كي يتم فصل وتحليل كل فيتامين على حده مما يجعلها غير مفضلة. أيضاً يجب على المحلل أن لا ينسى أن التداخلات التي قد تحدث عند استخدام طرائق غير الـ HPLC في التحليل والتي تعيق عملية القياس تؤدي أحياناً إلى فشل طريقة التحليل بالكامل.

الخاتمة

تبين نتائج البحث ما يأتي:

- إن تطبيق طريقة الـ HPLC هذه في تحليل مزيج الفيتامينات المدروسة الموجودة في العينة نفسها تعطي نتائج جيدة.
- إن اختيار شروط التحليل المناسبة مهمة جداً.
- إن تطبيق هذه الطريقة على تحليل أدوية سورية مخصصة للاستطباب البشري بشكل مباشر تعطي نتائج تحليلية موثوق بها.
- إن دقة التحليل وقصر الزمن في أثناء تطبيق هذه الطريقة تؤدي إلى إمكانية استخدامها بشكل كبير وواسع في تحليل المستحضرات الدوائية.

REFERENCES المراجـــع

[1] George, F. M. (2005). Vitamins in food: Analysis, Bioavailability and Stability, P.281, New York.

[2] Ceirwyn, S. (1999). Analytical chemistry of foods , P. 64, New York.

[3] Robert, B., John, W. S., Donald, B. (2001). Handbook of vitamins, P. 82, New York.

[4] Ronald Ray Eilenmiller, W.O. Landen – Medical. (1999). Vitamin analysis for the health and food Sciences, P.60 , USA

[5] The United States Pharmacopeia. (2005). 28, vol.(2) , P. 2166

[6] Physician desk reference (PDR). (2005).

[7] Andre, P., Lambert, W. (2000). Modern chromatographic analysis of vitamins, P.564, New York.

[8] British Pharmacopeia. (1993). vol. (2) , P. 1087.

[9] Clarke, E.G.C. (1986). Isolation and identification of drugs, London.

[10] Klaus Florey. (1989). Analytical profiles of drug substances, vol.(18), USA.

[11] Hessey, G. A., Costanzer, M. L, and Bayne, W. F. (1986). J. chromatogr., 380 , 450

[12] Fullinfaw, R. O., Bury, R. W. and Moulds, R. F. W. (1987). J. chromatogr., 415 , 347

[13] Smith, R. M., Murilla, G. A, Hurdley, T. G. , Gill, R., and Moffat, A. C. (1987). J. chromatogr., 384 , 259