

## Determination Asprien by High Performance Liquid chromatography (HPLC)

Semaa Hamed Ahmad<sup>(1)</sup>.

Department of Maintenance and Restoration – College of Archaeology – University of Samarra – Samarra – Iraq

Received (January) , Accepted (June).

### Abstract :

This research includes determination of Asprien by using high performance liquid chromatography technique by using Licrosorb C-18 column, that studies to quantitatively estimate the study is organic rate in dynamic and component from regular solution (0.02 sodium acetate) at pH=7. The study rate is dynamic flow (1 ML/Min).

The linearity of concentration (0.1-0.001)M and correlation coefficient (0.9926). The relative standard deviation RSD % (0.49-0.72) and detection limits were (0.1) M and percent relative errors were (1.20-1-0.60) respectively with percent recovery ranged (93-96)%.

### تقدير الأسبرين باستخدام كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي

سيماة حميد أحمد

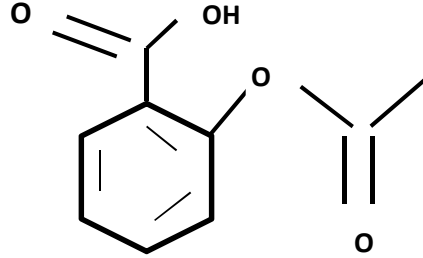
### الخلاصة

يتضمن البحث تقدير الأسبرين باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي وباستخدام العمود C-18. دراسة الظروف المثلى للتقدير الكمي من حيث دراسة نسبة المحور العضوي في طور المتحرك والمكون من محلول منتظم (0.02 مولاري من خلات الصوديوم) عند pH=7، ودراسة معدل سرعة جريان طور المتحرك (1 مل / دقيقة) وكانت خطية التراكيز (0.1-0.001) مولاري، وبمعامل ارتباط 0.9926، والنتائج الاحصائية التحليلية بينت ان معدل الانحراف القياسي النسبي RSD % (0.49-0.72)، والخطأ النسبي (1.20-1-0.60) وحد كشف (0.1) مولاري، وبمعدل استرجاع (93-96)%.

### 1- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) الكروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي :

- 1-1-1 المستحضر الدوائي Asprien
- 1-1-1 التعريف بالدواء (1) :
- 2- أسيتوكسي حامض البنزويك
- أما الاسم التجاري فهو :
- الأسبرين (Asprien)

## الصيغة التركيبية للعقار



أما الأسماء التجارية<sup>(2)</sup> فهي عديدة وفق الشركات المصنعة : Aspirin , Jusprin , Adiprin .  
والصيغة الجزيئية للعقار هي (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>)

**2-1-1 خواص الدواء (3) :**

الدواء عبارة عن بودرة بيضاء اللون وليس لها رائحة مميزة ويسمى عادة (ASA) ويدخل الاسبرين ما يقارب 50 نوع من الادوية ، وله درجة انصهار 138سْ تتفكك عند هذه الدرجة ويذوب في الماء ، وقليل الذوبان في الاسيتون والايثر وله درجة غليان 140 سْ .

**3-1-1 إستخدامات الدواء (3) :**

- 1- يستخدم كمسكن للألم وخاصة في ألم المفاصل .
- 2- مسكن للصداع وخافضاً للحرارة وخاصةً تلك المصاحبة للإلتهابات
- 3- يقلل من الأورام وخاصة عند الإصابة بجروح مختلفة .
- 4- يمنع تكرار الإصابة بالذبحة الصدرية والجلطة الدماغية .

**4-1-1 التقنيات المستخدمة في تقدير العقار Aspirin**

قام Hassan<sup>(4)</sup> بتقدير الدواء باستخدام الكترود إنتقائي مصنع من المركب الدوائي وبعض المواد المربوطة مع الكترود إنتقائي Ag/AgCl في عدة تركيبات دوائية وكان حد الكشف 0.023 مولاري وحدود الخطية بين 0.05-1 ملي مولاري .

أما الباحث Damian<sup>(5)</sup> وجماعته فأستخدموا تقنية الفلورة والطرق الطيفية Spectro Florometric في تقدير الدواء في الأقراص وبحدود خطية (0.2-5) ملغم/لتر، وبعد كشف وصل الى 0.02 ملغم/لتر.

وتمكن الباحث Garcia<sup>(6)</sup> وجماعته من إستخدام تقنية الحقن الجرياني مع جهاز المطياف الضوئي Spectro Photometric – Flow in jection لتقدير الدواء تغطية (0.2-20) ملغم/لتر ، وبعد كشف وصل الى 0.05 ملغم/لتر .

أما الباحث Starek<sup>(7)</sup> فتمكننا من تقدير الدواء بإستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC المغطاة بالأليهايد وكانت نسبة الخطأ أقل من 1 % .

**5-1-1 الأجهزة والمواد الكهربائية :****الأجهزة والمواد الكيميائية المستخدمة :**

- 1- جهاز الكروماتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي (HPLC) نوع (CECIL) الذي يتألف من الأجزاء الآتية :

- 1- الكاشف (Dedctor) نوع (CECIL) موديل (1100) ويعمل على مبدأ إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية والمرئية وبمدى طول موجي (200-600) نانوميتر يحوي خلية جريان سعة (15) مايكروميتر .
- 2- المضخة : Pump
- نوع (CECIL) موديل (1100) ذات تعريف ثابت (1-0-6) مللتر/ دقيقة .
- 3- صمام الحقن (Injection Veve)
- يحقن النموذج الى عمود الفصل بإستخدام محقن خاص (Rheody Model-7125) مثبت فيه ذراع صغير ذو حجم 20 مايكروليتر ، وتحقن به محقنة (Hamilton) سعة 50 مايكروليتر .
- 4- أنابيب التوصيل (Connectiong Tubes)
- مصنوعة من سبيكة من نوع خاص من الفولاذ عديمة الصدأ وتكون هذه الأنابيب على أقصر ما يمكن لتلافي أنتشار الحزمة .
- 5- العمود :
- إستخدام العمود ODS . Zorbax الذي يحوي الطور السائد Octabecyl Silica (5nm) وذو الأبعاد (25 سم × 4.6 ملم) والذي يدعى C18 .
- 6- فرن العمود :
- نوع (Anglicon) مدى درجة حرارته تتراوح بين 10-99 درجة مئوية .
- 7- مقياس الدالة الحامضية :
- نوع (JENWAY PHMETER 3310) .
- 8- مطياف الأشعة فوق البنفسجية – المرئية .
- نوع (Philips) موديل (Pu 8720) مزود تحليلية كوارتر ذو مسار ضوئي (1سم) وكذلك شاشة عرض مع طباعة لرسم وتسجيل الطيف .
- 9- جهاز صمام الأمواج فوق الصوتية Ultra Sonic Bath :
- نوع (PTY-SYNDEY) مزود بصمام مائي مع هيتز للتسخين .

### المواد الكيميائية المستخدمة :

جدول رقم (1) يوضح المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة :

الشركة المصنعة	الصبغة الكيميائية	النقاوة %	أسم المادة
SDI	CH <sub>3</sub> COONa	98	Sodium acetate
FLUKA	CH <sub>3</sub> OH	99	Methanol
FLUKA	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	85	Phosphoric acid

BDH	CH <sub>3</sub> CN	99	Acetonitril
-----	--------------------	----	-------------

**(2-1) ظروف العمل :****(2-1-1) دراسة تعيين الامتصاص الامثل للعقار :**

حضر تركيز ثابت من عقار الأسبرين المستخدم في هذه الدراسة ، حيث أخذ وزن (2gm) من الأسبرين وأذيب في مذيب الطور المتحرك المكون من محلول من منظم من (0.02M) من خلات الصوديوم في قنينة حجمية سعة (25mL) وأكمل الحجم الى حد العلامة ثم اسحب من المحلول (1 مل) وخفف بنفس المذيب في قنينة حجمية سعة (25mL) واكمل الحجم الى حد العلامة ، وكان أعظم امتصاص عند 220 نانومتر ، واجري مسح طيفي من 200-600 نانومتر .

**(2-1-2) دراسة الظروف المثلى لفصل العقار الطبي بتقنية HPLC :**

ثم دراسة الظروف المؤثرة على زمن احتجاز العقار على العمود الكروماتوغرافي للحصول على افضل فصل ويزمن معقول ، وقد حضر الطور المتحرك وتم طرد الغاز منه باستخدام جهاز فوق الامواج الصوتية .

**(2-1-3) دراسة نسبة المحور العضوي في الطور المتحرك :**

تم دراسة استرداد العقار الإسبرين على العمود (C-18) وبطور متحرك مكون من 10 % acetonitrile ومحلول منظم من خلات الصوديوم ذو تركيز (0.02M) والذي حضر بأذابة (3,28g) من خلات الصوديوم في الماء المقطر في قنينة حجمية سعة (500 مل) حيث تم تعديل حامضية المحلول المنظم بإضافة قطرات من حامض الفوسفوريك ذو تركيز (1 مولاري) عند طول موجي (220) بمعدل جريان (1 مل/دقيقة) .

**(2-1-4) دراسة اختيار الاسس الهيدروجين الامثل للطور المتحرك :**

يتبين عند دراسة تأثير (pH) على العقار الأسبرين بأن هناك يعتبر في الزمن الاحتجاز عند دوال حامضية مختلفة يتراوح بين (5-7 pH) وباستخدام محلول منظم (0.02M من خلات الصوديوم) ومعدل جريان (1 مل/دقيقة) وعند طول موجي (220 نانومتر) .

**(2-1-5) دراسة اختيار درجة الحرارة المثلى للعمود الكروماتوغرافي :**

تم دراسة تأثير درجة حرارة العمود الكروماتوغرافي على معدل استرداد العقار بسرعة جريان 1 مل/دقيقة وبمدى درجة حرارة (20-35) درجة مئوية للعمود الكروماتوغرافي وعند طول موجي 220 نانومتر ، وعند رسم العلاقة بين لوغارتيم K مقابل معكوس درجة الحرارة حسب معادلة فان ت هوف نحصل على الشكل البياني رقم (8) .

**(2-1-6) قياس الدقة والضبط وحد الكشف للعقار :**

تم حساب الدقة والضبط للعقار الطبي بعد تثبيت الظروف المثلى للتقدير الكمي وحساب معدل الاسترجاعية للعقار الطبي فضلاً عن قياس الدقة والضبط ثم قياس حد الكشف للعقار الطبي .

**Application : (2-1-6) التطبيقات :**

طبقت الظروف المثلى التي تم الحصول عليها لتقدير الأسبرين ، إذ تم سحق عشرة أقراص وأخذ معدل وزن قرص واحد وأذيب في 100 مل من الطور المتحرك بالإستعانة بجهاز حمام الأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic Bath) المزود بحمام مائي في دورق حجمي سعة 250 مل ولمدة 15 دقيقة ، وتم ترسيخ النموذج بعدها على ورق الترشيح ووضع الراشح بعدها في قنينة حجمية ذي حجم مناسب وأكمل الحجم بنفس الطور المتحرك المستخدم في

الإذابة للحصول على محلول تركيزه (0.1-0.001) مولاري ، وسحب بعدها الحجم المطلوب ووضع في قنينة سعة (100MI) ، وأكمل الحجم وتم حقن كل تركيز بشكل متزامن وأخذ معدل خمس قراءات والنتائج موضحة في الجدول .

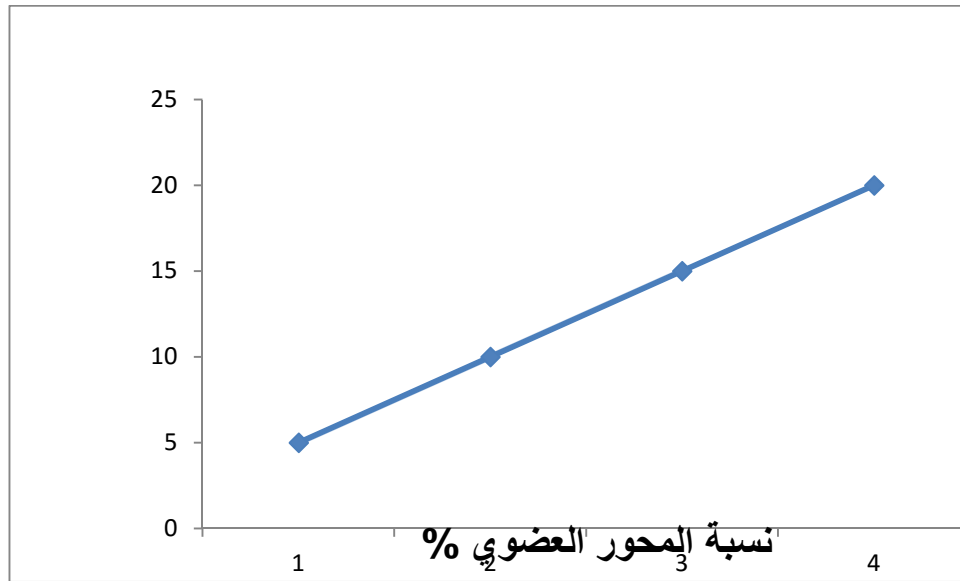
### (3-1) النتائج والمناقشة :

#### (1-3-1) دراسة التغير في نسبة المحور العضوي في الطور المتحرك :

تم دراسة التغير في زمن إحتجاز العقار قيد الدراسة نتيجة التغير في نسب المحور العضوي وتثبيت بقية المتغيرات والنتائج مبينة في جدول رقم (2) وشكل رقم (1) إذ تظهر النتائج أن هناك تناقص في زمن الإحتجاز بزيادة نسبة المحور العضوي ، وهذا متفق مع نتائج الباحثين<sup>(9)</sup> ، لأنه يحدث بين الطور الساكن وبين المركب الدوائي نظراً للتشابه التركيبي بينهما ، ونقل تلك التأثيرات بزيادة نسبة المحور العضوي في الطور المائي حيث أن الزيادة تؤدي الى تغير حالة الأذابة وبالتالي تغير السلوك الإحتجazi ، وقد وجد أن (5%) يعطي افضل نسبة للمحور العضوي .

جدول رقم (2) تغيير زمن الإحتجاز ( $t_R$ ) للعقار (ASPERIN) عند تراكيز مختلفة من المحور العضوي بسرعة جريان (1 مل / دقيقة) عند طول موجي (220 نانومتر) .

النسبة المئوية	%5	%10	%15	%20
زمن إحتجاز على العمود C-18	2-8	2-4	2	1-8



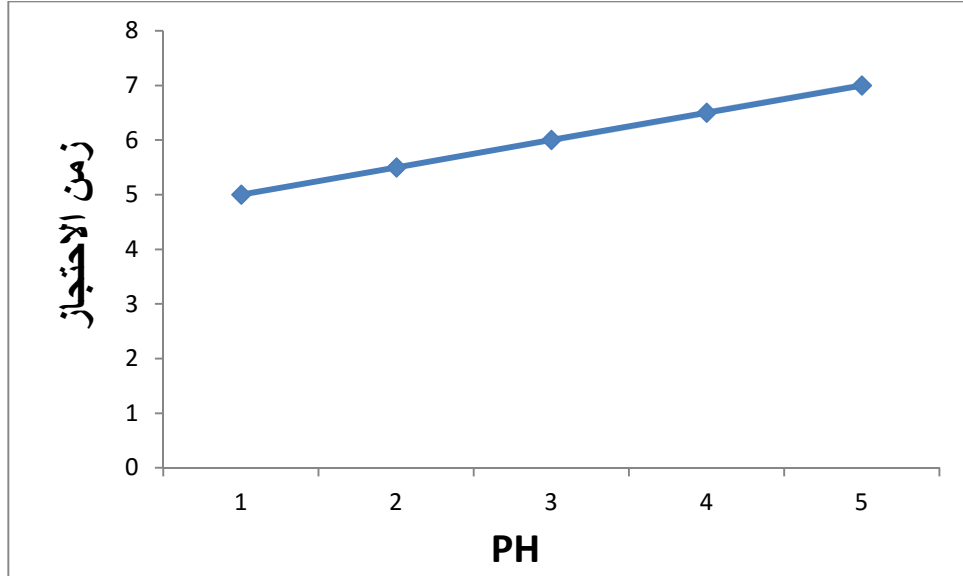
شكل (1) تأثير نسبة المحور العضوي في الطور المتحرك على زمن إحتجاز العقار

#### (2-3-1) دراسة اختيار الأس الهيدروجيني الأمثل للطور المتحرك :

أظهرت دراسة اختيار الأس الهيدروجيني الأمثل للطور المتحرك للعقار قيد الدراسة انه كلما زادت الدالة الحامضية زاد زمن الإحتجاز ، وهذا ما توافقت عليه بعض الدراسات<sup>(10)</sup> ، على ان زيادة الدالة الحامضية للطور المتحرك يزداد زمن الإحتجاز ، حيث نقل الصيغة الأيونية وبالتالي يقل تأين المركب الدوائي ، مما يؤدي الى ارتباطها القوي بالطور الساكن نتيجة لتألفها معه ، وقد وجد أن  $pH=7$  وجدول رقم (3) وشكل رقم (2) يوضح النتائج التي تم الحصول عليها .

جدول رقم (3) يوضح العلاقة بين الاس الهيدروجيني وزمن الاحتجاز

7	6-5	6	5-5	5	pH
2-8	2-6	2-5	2-3	2	t <sub>R</sub>



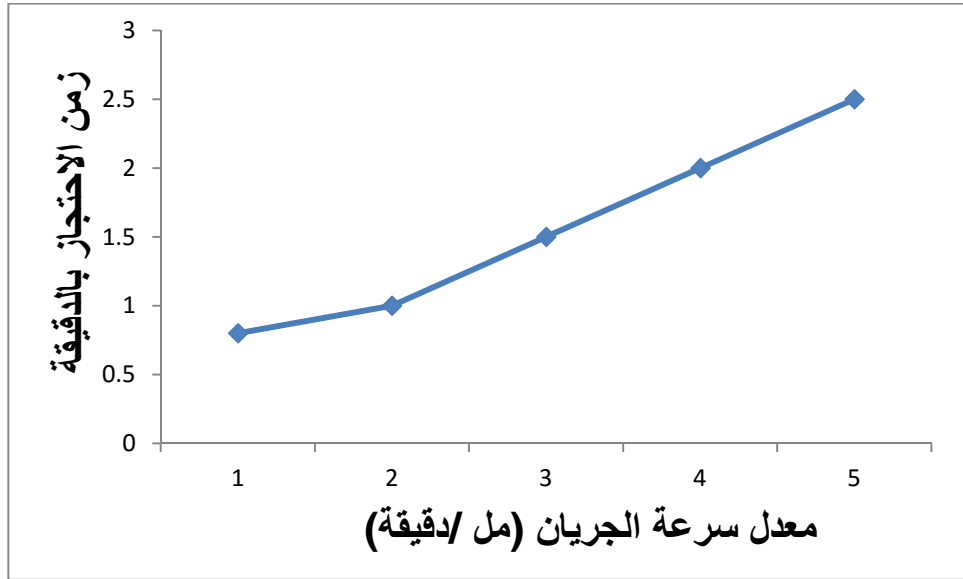
شكل (2) تأثير تغيير الأس الهيدروجيني على زمن احتجاز العقار .

### (3-3-1) دراسة اختيار معدل سرعة جريان الطور المتحرك :

بينت النتائج التي تم الحصول عليها ان كلما زاد معدل سرعة الجريان كلما قل زمن الاحتجاز وبالتالي يقلل من عملية الفصل لأنه زيادة سرعة جريان الطور المتحرك يسبب زيادة من الانتقال الكتلي وهذا يؤدي الى التقليل من عدد الصفائح النظرية الموجودة في عمود الفصل<sup>(11)</sup> ، وجدول رقم (4) وشكل (3) يوضح النتائج التي تم الحصول عليها .

جدول رقم (4) يوضح العلاقة بين سرعة الجريان وزمن الاحتجاز.

العقار	معدل الجريان	زمن الاحتجاز
ASPERIN	0.8	2.5
	1	2.1
	1.5	2
	2	1.5
	2.5	1



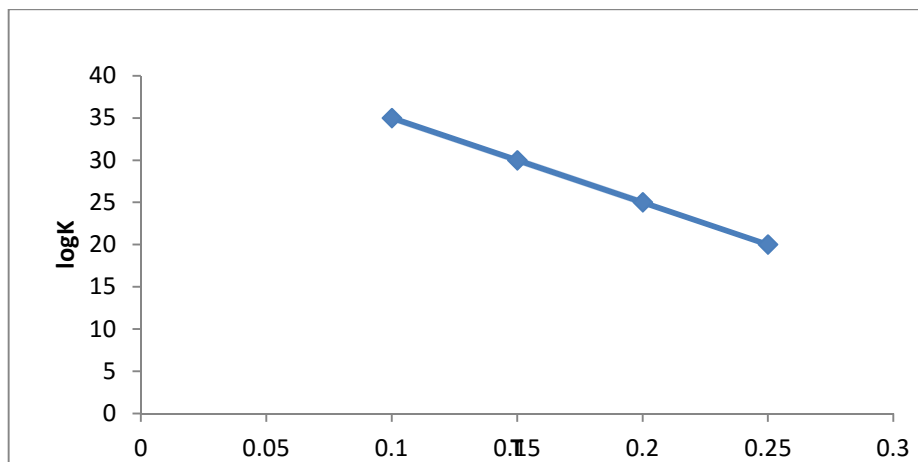
شكل (3) تغيير معدل سرعة الجريان على زمن احتجاز العقار

**(4-3-1) دراسة اختيار درجة الحرارة المثلى للعمود الكروماتوغرافي :**

يبين جدول رقم (5) التغيير في زمن احتجاز المركب الدوائي عند درجة حرارة مختلفة (20-30)م° ، إذ يلاحظ تناقص زمن الاحتجاز للمركب الدوائي زيادة درجة الحرارة ، وهذا تناقص راجع الى نقصان في لزوجة الطور المتحرك مسبباً في زيادة كفاءة العمود بسبب زيادة معدل الانتقال الكتلي ، وقد اشار الباحثون(12) الى ان زيادة درجة الحرارة بمقدار عشر درجات تغير انثالي الامصاص والتجزئة ، وبالتالي يختزل زمن الاحتجاز .

جدول (5) التغيير في زمن الاحتجاز ( $t_R$ ) للعقار مقابل التغيير في درجة الحرارة عند ثبات بقية المتغيرات .

	20	25	30	35
Asprien	Log k	Log k	Log k	Log k
	0.25	0.20	0.15	0.10
	$t_R$	$t_R$	$t_R$	$t_R$
	2.51	2.30	2.25	2.20



شكل (4) العلاقة البيانية لتأثير درجة الحرارة على عامل السعة للإحتجاز على العمود c-18 .

**(5-3-1) قياس الدقة والضبط :**

بعد تثبيت الظروف المثلى للتقدير الكمي للعقار ، تم قياس الدقة والضبط كما مبينة في جدول رقم (6) ولثلاث مستويات من التركيز ، إذ تم الحصول على معدل انحراف القياسي النسبي RSD % ومعدل الاسترجاعية .

جدول رقم (6) جدول الدقة والضبط المستحصلة من تقدير العقار .

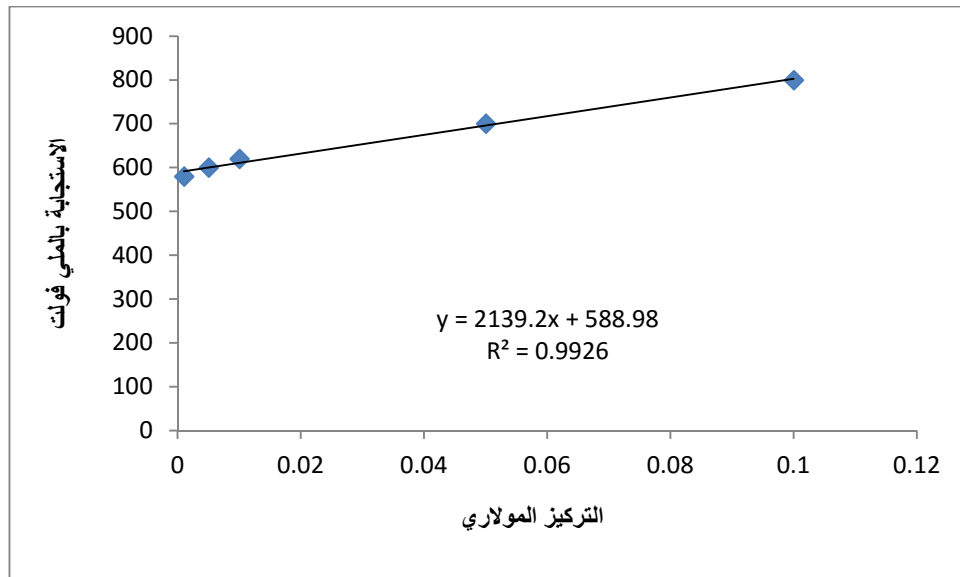
العقار	المحلول	تركيز (مولاري)	الخطأ النسبي	الانحراف القياسي النسبي	الاسترجاعية	معدل الاسترجاعية
ASPERIN		$10^{-4}$	1.20	0.76	93	96
		$10^{-3}$	1	0.72	96.9	
		$10^{-2}$	0.6	0.49	98.1	

**أيجاد العلاقة الخطية من منحنى المعايرة**

بعد أن تم تثبيت الظروف المثلى للتعبير الكمي للعقار والمبين في جدول رقم (5) استخدمت طريقة القياس كتقدير المستحضر بعد أن تم تحضير عدة محاليل قياسية للعقار الطبي كمادة فعالة ، وأيضاً تم حساب معادلة خط مستقيم بطريقة إحصائية ، وكذلك معامل الارتباط وحد الكشف ، و جدول رقم (7) يوضح المعادلة الخطية ، قياس معامل الارتباط وحد الكشف .

جدول رقم (7) المعادلة الخطية ، قياس معامل الارتباط وقياس حد الكشف للعقار الطبي .

العقار	المعادلة الخطية	معامل الارتباط	حدود الخطية	حد الكشف
Asprien	$Y=2139.2x+588.98$	0.9926	0.1-0.001	0.1



شكل (5) العلاقة الخطية بين تركيز المادة الفعالة والإستجابة .



**التطبيقات :**

طبقت المعادلات التي تم الحصول عليها أو المنحني القياسي للحصول على تركيز النموذج ، وأظهرت النتائج دقة عالية بالمقارنة مع المحتوى الأصلي كما مبينة في الجدول (8) وجدول (9) ، والتي تبين النتائج التي تم الحصول عليها من تقدير المستحضر الصيدلاني من الوحدات الإنتاجية المحلية والمستوردة إذ تراوحت قيم الإسترجاع (97) %

جدول (8) النتائج المستحصلة من تقدير المستحضر الصيدلاني من الوحدات الإنتاجية المحلية والمستوردة .

الاسترجاعية %	الانحراف القياسي النسبي %	الخطأ النسبي %	المستحضر الصيدلاني المأخوذ من
97	1.4	0.20	Ascriptin Jusprin Adiprin

جدول (9) الانحراف القياسي للانحدار والميل واختيار (t) المحسوب الجدولي لتقدير العقار بطريقة HPLC

الانحراف القياسي لانحدار (Sr)	الانحراف القياسي للميل (Sb)	اختيار t الجانبين المحسوب ذو الجانبين	اختيار t ذو الجانبين الجدولي (95) %	العقار
0.000071	0.0007	47.12	1.556	ASPERIN

**المصادر**

- 1-- L.R. Synder, & Kirkland j.j, In Introduction of Modern liquid Chromatography, (2014) 2<sup>nd</sup> ed, John wiles and sons, Inc. New York .
- 2- E. Weisberg , Clinical Reproduction and Fertility , sept. (2012), 2(3) .
- 3- British Pharmacopoeia , Pharmaceutial-press London , (2000) .
- 4- H.A. Hagiwara , Chromatog . A, 30 Jul. (2013) , 850  
(1-2) 277-281 .
- 5- P. Hagiwara , Shokuhin Eiseigakuzasshi, Feb (2013) , 40 (1) , 62-67 .
- 6- D.A. Zhang , spectroflorometric NOV (2011) , 15 (6) , (542 -543) .
- 7- G.H. Deborde , spectro photometric – Flow injection , (2014) , 3, 261 – 263.
- 8- S.D. Abbott, H . Determann ; (2014) Amer. Lab.9 (9)8 and, gel Chromatography, New York : Springer Vertag, (2012) .
- 9- P.J. Ridgeon , Liquid Chromatography, Separation , July (2011) 1<sup>st</sup> ed pye Unicam Ltd .
- 10-- R.P. W,Scott ; J. of liqChromatog., (2013),10 (8&9) , 1547-1567 .
- 11- R. Boscott, nature (2010) , 159 , 342 .