مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ یازدهم، شمارهٔ ۳، ص ۱۶۲-۱۵۵، ۱۳۸۳

مقاله پژوهشی

معرفی و تأیید روش تیتراسیون در محیط غیر مائی برای آنالیز اسیدآزلائیک

دکتر پیام خزائلی[۱] و دکتر ملیحه کرامتی[۲]

خلاصه

امروزه آلفا هیدروکسی اسیدها به طور گسترده‌ای در کنترل و درمان ناراحتی‌های پوست به‌کار می‌روند. اسیدآزلائیک یا Heptane-1,7-Dicarboxylic Acid، ماده‌ای طبیعی است که می‌تواند به‌صورت آندوژن از دی‌کربوکسیلیک اسیدهای زنجیره بلند، متابولیسم اسید اولئیک و امگا اکسیداسیون مونوکربوکسیلیک اسیدها بوجود آید. این ماده اثرات باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال بر علیه انواع گونه‌های هوازی و بی‌هوازی میکروارگانیسم‌های عامل آکنه نشان داده است. خواص مفید اسیدآزلائیک باعث شده این ترکیب به صورت فرمولاسیون‌های مختلف دارویی عرضه شود. روش‌های آنالیز معرفی شده برای اندازه‌گیری اسیدآزلائیک شامل روش‌هایی از قبیل HPLC و GC بوده که در مواردی چون اندازه‌گیری میزان این ترکیب در پلاسما کاربرد دارند. البته با توجه به عدم وجود گروه کروموفور در ساختمان این ترکیب، دراین روش‌های آنالیز نیز مراحل آماده‌سازی قبل از ستون بایستی صورت گیرد. اما در انجام فرمولاسیون‌های دارویی شاید استفاده از چنین روش‌های پر هزینه و وقت‌گیر مورد لزوم نبوده و روش‌هایی ساده‌تر و البته دقیق بتوانند مفید واقع شوند. در این تحقیق، تیتراسیون در محیط غیر مائی به عنوان روشی مناسب جهت آنالیز اسیدآزلائیک معرفی و پارامترهای تأیید متد آن بررسی شده است. در این روش پس از حل کردن آزلائیک اسید در دی‌متیل‌فرمامید، تیتراسیون توسط متوکسیدسدیم در حضور تیمول‌بلو انجام می‌شود. در تیتراسیون‌های مکرر انجام شده در تمامی غلظت‌ها، ضرایب انحراف معیار و درصد خطا کمتر از ۵٪ و مقادیر LOD و LOQ این روش برای تعیین مقدار آزلائیک اسید به ترتیب ۰/۱۱۱ و ۰/۳۷۲ محاسبه شد. نتایج تأیید متد روش تیتراسیون پیشنهادی نشان داد که این روش در تعیین مقدار اسیدآزلائیک در فرآورده‌های دارویی می‌تواند با اطمینان به‌کار رود.

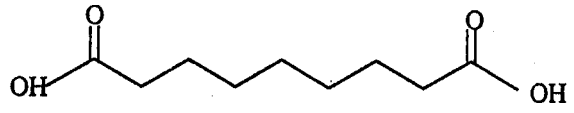
واژه های کلیدی: اسیدآزلائیک، تیتراسیون در محیط غیر مائی، تأیید روش

۱- استادیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان۲- دکتر داروساز

دریافت مقاله : ۱۳۸۲/۷/۶ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۳/۲/۲ **پذیرش مقاله :** ۱۳۸۳/۲/۸

مقدمه

اسیدآزلائیک یا Nonandioic acid و یا Heptane-1,7-Dicarboxylic Acid ترکیبی با فرمول بسته $C_9H_{16}O_4$ و ساختمان شیمیایی زیر می‌باشد (۱۰):



این ترکیب فرآورده‌ای طبیعی است که می‌تواند به صورت آندوژن از دی‌کربوکسیلیک اسیدهای بلند زنجیره، متابولیسم اسیداولئیک و امگاااکسیداسیون مونوکربوکسیلیک اسیدها تولید شود. ثابت‌های اسیدی این ترکیب عبارتند از (۱۴):

$Ka_1=2/951\times10^{-5}$

$Ka_2=4/677\times10^{-6}$

از نظر ظاهری، این ترکیب به صورت کریستال‌های صفحه مانند یا سوزنی می‌باشد. اسیدآزلائیک امروزه به عنوان یکی از عوامل مؤثر در درمان آکنه ولگاریس شناخته شده، به‌طوری‌که در اروپا از سال ۱۹۸۹ به صورت کرم ۲۰٪ وارد بازار دارویی شده است. اسیدآزلائیک همچنین در درمان ملانومای بدخیم و حالات هایپرپیگمانتاسیون از قبیل لنتیگوی بدخیم و ملاسما موفق گزارش شده است. این ترکیب به صورت خوراکی و وریدی نیز تجویز شده است. ولی، فرمولاسیون موضعی آن در آمریکا مورد توجه قرار گرفته و به عنوان عاملی جهت درمان آکنه ولگاریس در سال ۱۹۹۵ تأیید شده است (۹).

روش‌های شناسایی و تعیین مقدار اسید آزلائیک

HPLC -

HPLC یکی از روش‌های تجزیه اسیدآزلائیک و اندازه‌گیری غلظت پلاسمایی آن می‌باشد. مرحله مشتق‌سازی قبل از انجام آنالیز کروماتوگرافی لازم است زیرا آنالیت (اسیدآزلائیک) فاقد گروه کروموفور می‌باشد. مشتق‌سازی فلورسانس با استفاده از لوسین–کومارینیل‌آمید که برای مونو و دی‌کربوکسیلیک اسیدها به‌کار می‌رود، صورت می‌پذیرد (۱۲).

GC -

برای شناسایی دی‌کربوکسیلیک اسیدهای آلیفاتیک یا آروماتیک از روش GC نیز استفاده می‌شود (۱۵).

- تیتراسیون پتانسیومتریک در محیط غیر آبی

تیتراسیون پتانسیومتریک دی‌کربوکسیلیک اسیدهای آلیفاتیک متقارن در محیط غیرمائی نیز روش دیگری جهت آنالیز و اندازه‌گیری آنها محسوب می‌شود (۲).

- تیتراسیون های حجمی

تیتراسیون‌های خنثی‌شدن به طور گسترده در تعیین غلظت آنالیت‌هایی کاربرد دارند که یا اسید و یا بازند (۱). آب حلال معمول برای تیتراسیون خنثی‌شدن است ولی بعضی از آنالیت‌ها در محیط آبی قابل تیتر کردن نیستند زیرا انحلال‌پذیری آنها پایین است. از سوی دیگر چون قدرت اسیدی یا بازی برخی آنالیت‌ها در محیط مائی چندان زیاد نیست که نقاط پایان رضایت‌بخشی را فراهم کنند لذا غلظت چنین موادی را اغلب می‌توان با تیترکردن در حلال دیگری به غیر از آب تعیین کرد (۱). دو نوع ترکیبات را که در محیط آبی قابل تیترکردن نیستند، می‌توان با تیتراسیون خنثی‌شدن در حلال‌های غیرآبی مناسب اندازه‌گیری کرد. دسته اول این ترکیبات، اسیدها و بازها با وزن ملکولی زیادند که انحلال‌پذیری محدودی در آب دارند(۱). بنابراین با توجه به امکان استفاده از روش تیتراسیون (به علت خواص اسیدی اسیدآزلائیک) متأسفانه به علت حلالیت ناچیز اسیدآزلائیک در آب (۲/۴گرم در یک لیتر آب) نمی‌توان از محیط مائی برای تیتراسیون آن استفاده نمود. لذا تیتراسیون در محیط غیر مائی به دلایل بالا توصیه می‌شود. البته در ابتدا شاید به نظر برسد به منظور افزایش حلالیت بتوان تیتراسیون را در محیط اتانول انجام داد. ولی با توجه به آنکه رفتار مواد حل شده به صورت اسید یا باز به شدت متأثر از قدرت حلال به عنوان یک باز یا اسید است (۱) و ما در تیتراسیون های غیرمائی به دنبال ایجاد یک نقطه پایانی مشخص از طریق افزایش خواص اسیدی یا بازی ماده می‌باشیم، متأسفانه اتانول در این میان به عنوان یک حلال خنثی طبقه‌بندی می‌شود (۱). زیرا خواص پروتون‌دهندگی و گیرندگی آن تفاوت چندانی ندارد. ثابت خود پروتون کافتی‌اتانول بسیار برتر از آب است اما ثابت دی‌الکتریک پایین آن در قیاس با آب ویژگی برشمرده آن را خنثی می‌کند و از این رو ارتقای کیفیت نقطه پایانی حاصل از به کارگیری این حلال نسبتاً کم است (۱). در تجربه عملی نگارندگان نیز عدم کارایی اتانول در این خصوص تأیید گردیده و لذا از حلال غیرمائی دی‌متیل‌فرمامید که اسیدآزلائیک به خوبی در آن حل می‌شود و همچنین به عنوان یک حلال نسبتاً بازی،

خواص اسیدی اسیدآزلائیک را بهتر نمایان می‌سازد استفاده گردید.

- کلیاتی در رابطه باتیتراسیون‌های غیرمائی

همه حلال‌هایی که جهت تیتراسیون اسیدهادر این روش به کار می‌روند الزاماً موادی با خصوصیات غیراسیدی هستند. بسیاری از حلال‌های بازی، خواص اسیدی یک اسید بسیار ضعیف را افزایش می‌دهند. اتیلن‌دی‌آمین، n- بوتیل‌آمین و پیریدین به عنوان حلال‌های بازی مناسبند. اما از آنجایی که CO_2 اتمسفر را به سهولت جذب می‌نمایند، تیتراسیون شاهد از اهمیت بالایی برخوردار است. N و N- دی‌متیل‌فرمامید (DMF) از دیگر حلال‌های بازی است که بدین منظور به‌کار می‌رود. از سوی دیگر متوکسیدسدیم، پتاسیم یا لیتیم در محلول متانول ــ بنزن به عنوان تیترانت اسیدهای ضعیف کاربرد دارند. از عیوب آنها این است که متوکسیدسدیم و پتاسیم در برخی از موارد سبب تشکیل رسوب ژله مانندی در طی تیتراسیون می‌شوند که این رسوب سبب نامعلوم شدن (تیره شدن) نقطه پایانی می‌گردد (۳). اخیراً به علت سمیت بنزن و محدودیت‌های کار با آن، تولوئن که سمیت کمتری نسبت به بنزن دارد جایگزین آن شده است. مهم‌ترین شناساگری که جهت سنجش اسیدها به‌کار برده می‌شود، تیمول‌بلو است که دارای تغییر رنگی از زرد در محیط اسیدی به آبی در محیط قلیایی است. این شناساگر در تیتراسیون کربوکسیلیک اسیدها، ایمیدها و سولفانامیدها قابل استفاده است. آزوویوله شناساگر اسیدی ضعیف‌تری است و بنابر این جهت تیتراسیون اسیدهای نسبتاً ضعیف از قبیل فنل‌ها به کار می‌رود. برای اسیدهای خیلی ضعیف‌تر، O- نیتروآنیلین می‌تواند مفید باشد. گرچه روش پتانسیومتری برای آنها ترجیح داده می‌شود (۶).

- تأیید روش‌های تجزیه

اعتماد به یک روش تجزیه‌ای و اطمینان از نتایج به‌دست آمده درگرو بررسی این نتایج توسط یک‌سری پارامترهای تأیید متد می‌باشد (۱۳). تأیید متد فرایندی است که طی آن مقبولیت و تکرارپذیری روش تجزیه‌ای در شرایط مختلف و انجام آن توسط افراد متفاوت تأیید می‌گردد (۴). پارامترهای کارآیی که در فرآیند تأیید متد مورد ارزیابی قرار می‌گیرند، عبارتند از: صحت (Accuracy)، دقت (Precision)، تکرارپذیری (Repeatability) تکثیرپذیری (Reproducibility)، حد تشخیص (Limit of Detection:LOD)، حد تعیین کمی (Limit of Quantitation: L.O.Q)، خطی‌بودن (Linearity)، انتخابی‌بودن (Selectivity)، اختصاصی‌بودن(Specifcity)، سخت‌بودن (Ruggedness) ، قوت (Robustness)، پایداری محلول‌های تجزیه‌ای (Stability)، میزان بازیابی (Recovery)، تعیین محدوده‌کاری غلظت (Working Concentration Range) و آزمایشات تناسب سیستم (System Suitiability Tests). باید توجه داشت که از مجموعه پارامترهای فوق، عمدتاً برخی پارامترها نیاز به تأیید دارند و روش انجام کار در هر مورد بستگی به هدف روش و ماتریکس نمونه دارد (۵).

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش عبارتند از: اسیدآزلائیک، دی‌متیل‌فرمامید، متانول، تولوئن، تیمول‌بلو، سدیم و اسیدبنزوئیک که همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند، ترازوی الکترونیکی Sartorious مدل AS120 با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم ساخت آمریکا، هیتراستیرر Heidolph ساخت آلمان، بورت شیشه‌ای PLANAX با دقت ۰/۰۲ میلی‌لیتر و لوازم شیشه‌ای نظیر هم‌زن، استوانه مدرج، بشر و پیپت.

با توجه به آنکه اسیدآزلائیک، یک دی‌کربوکسیلیک اسید می‌باشد و با توجه به مطالعات انجام گرفته روش پیشنهادی برای آنالیز آزلائیک اسید، تیتراسیون در حلال نسبتاً بازی DMF توسط متوکسیدسدیم می‌باشد.

طرز تهیه محلول‌های مورد استفاده

محلول متوکسیدسدیم

۲/۵ گرم سدیم در مقداری متانول خالص حل شده و به مخلوط حدود ۴۰ میلی‌لیتر متانول و ۵۰ میلی‌لیتر تولوئن اضافه می‌شود. واکنش با سردکردن کنترل شده، با افزودن متناوب متانول و تولوئن حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و محلول تهیه‌شده در ظروف پیرکس یا پلی‌اتیلن نگهداری می‌شود (۶).

استاندارد کردن متوکسیدسدیم

۶۰ میلی‌گرم اسید بنزوئیک در ۱۰ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرمامید (DMF) حل شده سپس با محلول متوکسیدسدیم در حضور تیمول‌بلو تا ظاهر شدن رنگ آبی تیتر می‌شود (۶). رابطه تعیین مقدار عبارت است از:

۱۲/۲۱ mg $C_7H_8O_2$ = ۱ml۰/۱M متوکسیدسدیم

محلول تیمول‌بلو

تیمول‌بلو یکی از شناساگرهای سولفون فتالئین می‌باشد. دامنه تغییر رنگ آن در pH: ۶-۶/۷ بوده و تغییر رنگ آن از زرد در محیط اسیدی به آبی‌درمحیط قلیایی است (۳).

تیمول‌بلو به عنوان شناساگر با غلظت ۰/۳w/v٪ در متانول ساخته می‌شود.

روش‌های عملی

۱- رسم منحنی استاندارد

پنج نمونه مختلف از اسیدآزلائیک به مقدار ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم توزین و در حجم ۱۰ میلی‌لیتر DMF حل شده، سپس کل حجم این محلول‌ها، توسط متوکسیدسدیم با نرمالیته معین در حضور شناساگر تیمول‌بلو، هم زمان با تیتراسیون شاهد توسط بورت شیشه‌ای تیتر شدند. لازم به ذکر است تیتراسیون برای هر یک از غلظت‌ها، شش‌بار و در روزهای مختلف انجام شده است. تمامی مراحل فوق برای پنج مقدار کمتر از اسید آزلائیک شامل ۰/۴، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۷ میلی‌گرم نیز انجام شد با این تفاوت که برای افزایش اطمینان و کاهش خطای تیتراسیون در مقادیر کم، غلظت متوکسیدسدیم حدود ده برابر کاهش داده شد.

۲- بررسی دقت روش

دقت روش عبارت از نزدیکی اندازه‌گیری‌های تکراری یک ماده تجزیه شونده می‌باشد. از آنجا که در مرحله رسم منحنی استاندارد، تیتراسیون‌هایی در روزهای مختلف انجام شد، در این مرحله چند تیتراسیون در یک روز در مورد، سه مقدار پایین، وسط و بالای منحنی استاندارد اسیدآزلائیک در دو محدوده که در بخش رسم منحنی استاندارد به‌کار رفته‌اند، هر کدام پنج مرتبه بامتوکسیدسدیم انجام شد.

۳- بررسی صحت روش

صحت عبارت از نزدیکی نتایج صورت گرفته با مقادیر واقعی است (۵). بدین منظور با توجه به تیتراسیون‌های انجام شده و محاسبه با استفاده از منحنی استاندارد، صحت متد به صورت تعیین درصد خطا برای هر دامنه محاسبه گردید. میزان صحت در مورد هر دو سری غلظت‌ها بررسی شد.

٤- بررسی پایداری اسیدآزلائیک در دی‌متیل‌فرمامید

وقتی در یک روش آنالیز می‌توان به سیستم برگزیده شده اطمینان نمود که ماده مورد سنجش در سیستم پایدار باشد. بدین منظور یک نمونه باغلظت مشخص از اسیدآزلائیک در DMF تهیه شده و در یک ارلن پیرکس با درپوش آلومینیومی و در دمای آزمایشگاه نگهداری گردید. در فواصل زمانی متعدد تا شش ماه از ظرف ۱۰ml نمونه برداشته و تیتراسیون روی آن انجام می‌شد.

۵- ارزیابی میزان بازیابی

مطالعات بازیابی به روش‌های مختلف انجام می‌شود در این تحقیق مقایسه استانداردهای استخراج شده و استخراج نشده مورد توجه قرار گرفت (۷). اختلاف مقادیر به‌دست آمده جهت رسم منحنی استاندارد نسبت به مقدار واقعی به صورت درصد بازیابی محاسبه گردید.

٦- تعیین حد تشخیص و حد تعیین مقدار

حد تشخیص (LOD) یک روش، پایین‌ترین مقدار از تجزیه‌شونده است که پاسخ قابل تشخیص در بالاتر از سطح نویز سیستم و به طور مشخص سه برابر آن ایجاد کند (۱۱) و حد تعیین مقدار (LOQ) به صورت کمترین مقدار ماده تجزیه‌شونده می‌باشد که می‌توان با دقت و صحت قابل قبول آن‌را اندازه‌گیری نمود (۱۳). چون در مراحل بعدی این مطالعه فرمولاسیون اسیدآزلائیک در یک پایه معمول موضعی یعنی کرم مد نظر بوده است لذا جهت تعیین حد تشخیص (LOD) روش، از پایه کرم مطلوب، نمونه‌ای با غلظت ۱g/۱۰ml در DMF تهیه شده و با استفاده از تیترانت با نرمالیته معلوم ۲۴ بار تیتر شد.

۷- بررسی محدوده خطی بودن

محدوده خطی‌بودن در قسمت رسم منحنی استاندارد بررسی و ذکر شده است.

۸- بررسی انتخابی بودن روش

برای بررسی انتخابی بودن روش‌و عدم تداخل احتمالی مواد پایه یا حامل با اسیدآزلائیک تنها روش پیشنهادی، تیتراسیون هم‌زمان پایه یا حامل دارویی می‌باشد.

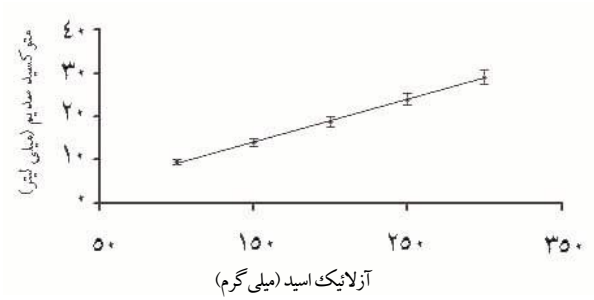
نتایج

۱- رسم منحنی استاندارد

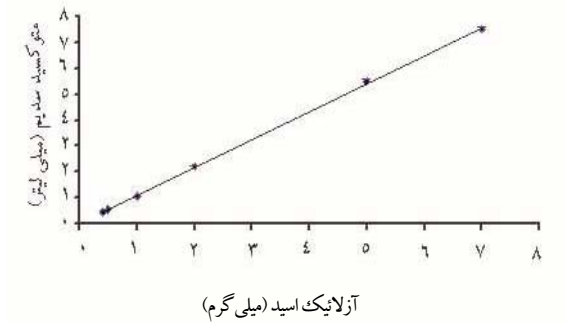
پس از انجام تیتراسیون و تعیین مقدار تیترانت مصرفی برای هر سری از غلظت‌ها با رسم مقدار تیترانت در مقابل مقدار اسیدآزلائیک، شیب خط، عرض از مبدأ و ضریب همبستگی هر

یک از خطوط محاسبه گردید و سپس منحنی استاندارد بر اساس میانگین نتایج حاصله رسم شد. نتایج این مرحله در نمودارهای ۱و ۲ آمده است. مطابق نتایج فوق خواهیم داشت:

۱Ml Me-Na(۰/۱N)≡۱۰/۵۹۱۵mgAZA



نمودار ۱: *منحنی استاندارد برای تیتراسیون مقادیر مختلف اسیدآزلائیک توسط متوکسیدسدیم جهت آنالیز مقادیر بالای اسیدآزلائیک*



نمودار ۲ : *منحنی استاندارد برای تیتراسیون مقادیر مختلف اسیدآزلائیک توسط متوکسیدسدیم جهت آنالیز مقادیر کم اسیدآزلائیک*

۲- بررسی دقت روش

پس از انجام تیتراسیون در یک روز در مورد، سه مقدار پایین، وسط و بالای منحنی استاندارد اسیدآزلائیک در دو محدوده که در بخش رسم منحنی استاندارد به‌کار رفته‌اند - هر کدام پنج مرتبه بامتوکسیدسدیم - مقادیر SD و CV٪ برای حجم تیترانت مصرفی محاسبه گردید. نتایج این بررسی درجداول ۱و۲ آمده است. مطابق این نتایج مشاهده می‌شود در تمامی موارد درصد ضریب تغییرات کمتر از پنج درصد می‌باشد. مقادیر ضرایب همبستگی خط بالا و در هر دو حالت به ترتیب برابر ۰/۹۹۹۳ و ۰/۹۹۹۹ می‌باشد و این نشان‌دهنده دقت روش می‌باشد.

۳- بررسی صحت روش

نتایج محاسبه درصد خطا در جداول ۳ و۴ آمده است.این نتایج نشان می‌دهند که در تمامی موارد درصد خطا کمتر از ۵٪ می‌باشد و این نشاندهنده صحت روش می‌باشد.

٤- بررسی پایداری اسیدآزلائیک در دی‌متیل‌فرمامید

پس از انجام تیتراسیون بر روی نمونه‌های برداشتی، مقدار اسیدآزلائیک با گذشت زمان تعیین و منحنی مربوطه رسم گردید.

جدول ۱: *حجم تیترانت مصرفی در تیتراسیون‌های متوالی مقادیر بالا از اسید آزلائیک (AZA) جهت تأیید دقت روش (در یک روز)*

V / AZA(mg)	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	$\overline{X}$	SD	CV%
۱۰۰	۹/۳۲	۹/۲۶	۹/۵۸	۹/۴۶	۹/۵۲	۹/۴۲۸	۰/۱۳۴۶	۱/۴۲۷
۲۰۰	۱۸/۷۴	۱۸/۸۸	۱۸/۳۰	۱۸/۳۰	۱۸/۴۴	۱۸/۵۴	۰/۲۳۷۶	۱/۲۸۱
۳۰۰	۲۸/۳۲	۲۸/۵	۲۹/۲۲	۲۹/۱۲	۲۹/۳۴	۲۸/۹	۰/۴۵۸۴	۱/۵۸۶

معادله خط میانگین Y=۰/۹۷۴C-۰/۵۱۶ R=۰/۹۹۹۳

جدول ۲: *حجم تیترانت مصرفی در تیتراسیون‌های متوالی مقادیر پایین از اسید آزلائیک جهت تأیید دقت روش (در یک روز)*

V / AZA(mg)	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	$\overline{X}$	SD	CV%
۰/۴	۰/۴۶	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۳۶	۰/۰۱۶۷	۳/۸۳
۲	۲/۲۲	۲/۱۶	۲/۱۴	۲/۲۴	۲/۲۸	۲/۲۰	۰/۰۵۷۶	۲/۶۱
۷	۷/۴۶	۷/۶۴	۷/۳۲	۷/۳۸	۷/۵	۷/۴۶	۰/۱۲۲	۱/۶۴

معادله خط میانگین Y=۱/۰۶۱۳C+۰/۰۳۹۸ R=۰/۹۹۹۹

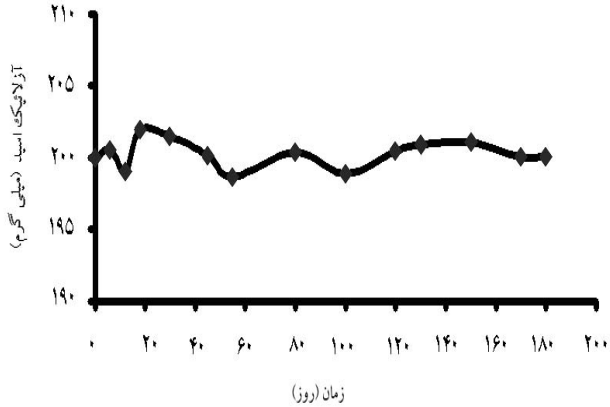
جدول ۳: *نتایج حاصله از تعیین درصد خطا به منظور تأیید صحت روش (مقادیر بالا)*

AZA(mg)	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰
درصد خطا	-۱/۸۴۸	-۰/۷۶۷	-۰/۶۹۵	-۳/۱۸	-۴/۱۸

جدول ٤: *نتایج حاصله از تعیین درصد خطا به منظور تأیید صحت روش (مقادیر پایین)*

AZA(mg)	۰/٤	۰/۵	۱	۲	۵	۷
درصد خطا	-۲/۰	-۰/۲	۲/۶	-۲/۸	-۲/۰۶	۰/۳۲۸

این نتایج در نمودار ۳ آمده است. همان‌طورکه در این نمودار دیده می‌شود تغییر در میزان اسیدآزلائیک با گذشت زمان بسیار جزئی و حتی کمتر از ۲٪ می‌باشد. نتایج این بررسی مطابق نمودار نشان داد که نمونه در حلال انتخابی بسیار پایدار است.



نمودار ۳: *بررسی پایداری محلول اسیدآزلائیک در دی‌متیل‌فرمامید جهت بررسی پایداری (Stability) روش*

۵- ارزیابی میزان بازیابی

با محاسبه درصد اختلاف مقادیر به دست آمده جهت رسم منحنی استاندارد نسبت به مقدار واقعی،درصد بازیابی روش محاسبه گردید. نتایج نشان داد که در تمامی موارد میزان بازیابی در محدوده ۵٪±۱۰۰٪ قرار دارد.

٦- تعیین حد تشخیص و حد تعیین مقدار

پس از انجام تیتراسیون نمونه‌ها، با استفاده از منحنی استاندارد مقدار معادل اسیدآزلائیک برای هریک محاسبه و مقدار انحراف استاندارد (SD) تعیین شد(SD=۰/۰۳۷۲). ۳ برابر SD به عنوان LOD (LOD=۰/۱۱۱) و ۱۰ برابر آن به عنوان LOQ (LOQ=۰/۳۷۲) گزارش می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

روش‌های گزارش شده برای تعیین مقدار اسیدآزلائیک شامل HPLC (۸) با کمک مشتق‌سازی فلورسانس با استفاده از L ــ لوسین ــ کومارینیل آمید، GC (۱۵) و همچنین تیتراسیون پتانسیومتری در محیط غیر آبی است (۲). با توجه به بررسی منابع مختلف و خصوصیات و ساختمان شیمیایی اسیدآزلائیک مشخص می‌شود که به علت وجود گروه کربوکسیل می‌توان جهت آنالیز این ترکیب از روش تیتراسیون استفاده نمود. اما به دو علت تیتراسیون در محیط غیرمائی برای این ترکیب ترجیح داده می‌شود. اولاً آزلائیک‌اسید یک دی‌کربوکسیلیک‌اسید با وزن ملکولی بالاست که حلالیت ناچیزی در آب دارد و همان‌طوری‌که در منابع نیز اشاره شده است،یکی از مهم‌ترین کاربردهای تیتراسیون غیر مائی برای ترکیباتی است که انحلال‌پذیری محدودی در آب دارند (۱). برای حل این مشکل نمی‌توان تیتراسیون را در حضور الکل انجام داد. همان‌طوری‌که در بخش مقدمه نیز ذکر شد اتانول به عنوان یک حلال خنثی طبقه‌بندی می‌شود (۱). چراکه خواص پروتون‌دهندگی و گیرندگی آن تفاوت چندانی ندارد. ثابت خود پروتون کافتی اتانول بسیار برتر از آب است اما ثابت دی‌الکتریک پایین آن در قیاس با آب ویژگی برشمرده آن را خنثی می‌کند و از این رو ارتقای کیفیت نقطه پایانی حاصل از به کارگیری این حلال نسبتاً کم است (۱). مطالعه تجربی انجام شده در این تحقیق نیز نشان داد که نقطه ختم عمل تیتراسیون در حضور الکل چندان واضح نیست ضمن آنکه رابطه خطی مناسبی بین مقدار اسیدآزلائیک و مقدار تیترانت مصرفی در این حالت وجود نداشت. برخی از مواد شامل اسید یا بازهای خیلی ضعیف که در محیط آبی نقطه پایانی مشخصی ندارند و یا فاقد واکنش با رابطه استوکیومتری مناسب هستند در محیط غیر آبی تیتر می‌شوند(۳). لذا ابتدا انتخاب سیستم، شرایط تیترانت، حلال و شناساگر در

محیط غیر آبی مورد توجه قرار گرفت و با توجه به منابع موجود در مورد تیتراسیون اسیدها در محیط‌های غیرآبی، محیط غیرآبی به این صورت طراحی شد: دی‌متیل‌فرمامید (DMF) به عنوان حلال، متوکسیدسدیم به عنوان تیترانت و تیمول‌بلو در متانول به عنوان شناساگر (۶).

مطالعه اولیه انجام یافته به منظور بررسی وجود رابطه خطی بین مقادیر اسیدآزلائیک و مقدار مصرف شده تیترانت نشان داد که به علت ضریب همبستگی بالا (r=۰/۹۹۹۸۹)، روش فوق می‌تواند به عنوان یک روش آنالیز مناسب، ارزشمند باشد. از این‌رو به منظور تأیید متد و ارزش‌گذاری این روش برای تعیین مقدار اسیدآزلائیک، پارامترهای صحت، دقت، پایداری، خطی‌بودن، حد تشخیص، حد تعیین مقدار، میزان بازیابی و انتخابی بودن در مورد آن بر اساس موارد ذکر شده در منابع مختلف انجام شد.

انجام تیتراسیون، در دو دامنه از مقادیر مختلف اسیدآزلائیک نشان داد که با توجه به ضریب همبستگی بالا، رابطه مستقیم خطی در هر دو دامنه وجود دارد.علاوه بر آن میزان ضریب تغییرات در تمامی موارد بسیار کمتر از حد مجاز (۵٪) می‌باشد و این اولین گام در انتخاب یک روش آنالیز خواهد بود. به منظور بررسی دقت، تیتراسیون شش نمونه در سه مقدار در برگیرنده حد بالا، وسط و پایین منحنی استاندارد در دو دامنه مختلف انجام شد. ضریب تغییرات (C.V) در مقادیر کمتر از ۵٪ نشان‌دهنده دقت روش تیتراسیون حجمی در تعیین مقدار اسیدآزلائیک در هر دو دامنه غلظتی است. جهت بررسی صحت که به صورت تعیین درصد خطا در اندازه‌گیری یک نمونه معلوم و با مقایسه جواب حاصله با مقدار واقعی انجام شده است، در تمامی موارد میزان خطا همواره بسیار کمتر از ۵٪ بوده و این نشانه وجود صحت در روش آنالیز است. در بررسی پایداری اسیدآزلائیک، تغییرات در حد ۲٪ مقدار اولیه نشانگر پایداری اسیدآزلائیک در شرایط آزمایش است و در ارزیابی میزان بازیابی نیز نتایج نشان داد که همه مقادیر در محدوده ۵٪ مقدار واقعی می‌باشند. مقدار LOD و LOQ نیز برای این روش به ترتیب ۰/۱۱۱ و ۰/۳۷۲ گزارش می‌شود. کلیه نتایج به‌دست آمده بیانگر آن است که تیتراسیون حجمی اسیدآزلائیک در DMF می‌تواند روشی مطمئن و دقیق جهت تعیین مقدار اسیدآزلائیک در فرمولاسیون‌های موضعی نظیر پایه‌های معمول مورد مصرف نظیر کرم‌ها باشد.گرچه این روش محدودیت خاص خود را نیز دارد. مهم‌ترین محدودیت این روش که با بررسی غلظت‌های بالای اسیدآزلائیک انجام شد، نشان‌دهنده عدم توانایی آن در تعیین مقدار اسیدآزلائیک در غلظت‌های بالاتر از ۷۰۰ mg/ml است.

Summary

Non Aqueous Titration for the Determination of Azelaic Acid: Introduction and Method Validation

Khazaeli P, PhD.[1] and Keramati M, Pharm D.[2]

1. Assistant Professor of Phamaceutics, Pharmacy School, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 2. Pharmacist

Alpha-hydroxylic acids are widely used in the treatment and control of skin disorders. Azelaic acid is a naturally occuring Alpha-hydroxy acid that can be formed endogenously from long-chain dicardoxylic acids, metabolism of oleic acid or omega oxidation of mono carboxylic acids. It shows bacteriostatic and bactericidal activities against aerobic and anaerobic micro-organisms present on acne-bearing skins. The beneficial effects of azelaic acid have been lead to different pharmaceutical formulations such as creams, gels, etc. HPLC and GC techniques are mostly used for the determination of Azelaic acid in plasma. These techniques are very accurate but, they are expensive and time consuming due to the lack of chromophore and consequently the necessity of pre-column sample preparation. For the determination of Azelaic acid in pharmaceutical dosage forms, a simple method with suitable accuracy and precision is needed. In this research, non aqueous titration was used for the determination of azelaic acid. For this purpose, azelaic acid was titrated by sodium methoxide in the presence of thymol blue. The results of method validation by considering various parameters showed the accuracy of the suggested method in the determination of azelaic acid in pharmaceutical formulations.

Key words: *Azelaic acid, Non aqueous titration, Method validation*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2004; 11(3): 155-162

منابع

۱. اسکوگ، وست، هالر:مبانی شیمی تجزیه.ترجمه:توسلی، ویدا؛ خلیلی، هوشنگ و معصومی، علی. مرکز نشر دانشگاهی، تهران، ۱۳۷۶، ص‌ص ۲۸۱، ۲۹۵، ۲۹۷، ۲۹۹.

2. Aslan A, Erdogan Y and Demirbas A Potentiometric titration of some dicarboxylic acids in non aqueous media. *Pharmazie* 1997; 52: 309-310.
3. Becket A and Stenlake B. Practical pharmaceutical chemistry. 4th ed., London, The Athlone Press, 1998; part 1: P165.
4. Buick AR, Doig MV, Jeal SC, Land GS and McDowall RD. Method Validation in the bioanalytical laboratory. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8(8-12): 629-637.
5. Carr GP and Wahlich JC. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8(8-12): 613-618.
6. Connors KA: A textbook of pharmaceutical Analysis. 3rd ed., New York, John Wiely & Sons Inc, 1982; PP46-64.
7. Edwardson PA, Bhaskar G and Fairbrother JE. Method Validation in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 1990; 8(8-12): 929-933.
8. Ferioli V, Rustichelli C, Vazzalini F and Gamberini G. Determination of azelaic acid in pharmaceuticals and Cosmetics by Rp-HPLC after pre-column derivatization. *Farmaco* 1994; 49(6): 421-425.
9. Fitton A and Goa KL. Azelaic acid. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and hyperpigmentary skin disorders. *Drugs* 1991; 41(5): 780-798.
10. Kleemann A, Engel J, Kutscher B and Reichert D: Pharmaceutical substances. 4th ed., Stuttgart, Thieme, 2001; P160.
11. Lang JR and Bolton S. A Comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry 1. Experimental Considerations. *J Pharm Biomed Anal* 1991; 9(5): 357-361.
12. Levai F, Liu CM, Tse MM and Lin ET. Pre-column fluorescence derivatization using leucine-coumarnylamide for HPLC determination of mono and dicarboxylic acids in plasma. *Acta Physiol Hung* 1995; 83(1): 39-46.
13. Mehta AC. The validation criteria for analytical methods used in pharmacy practice research. *J Clin Pharm Ther* 1989; 14 (6): 465-473.
14. O'Neil MJ. The Merck Index An Encyclopedia of chemicals, Drugs and biologicals. USA, 13th ed., Merck & Co., INC, 2001; P908.
15. Velasco J, Berdeaux O, Marquez-Ruiz G and Dobarganes MC. Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by Gas liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2002; 982(1): 145-52.