Determination of voltaren by High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

تقدير الفولتارين بأستخدام كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي

د.عماد طارق حنون[1] سيماء حميد احمد [2] عمر صالح حسن[3]
كلية التربية – جامعة سامراء كلية الاثار – جامعة سامراء كلية الصيدلة – جامعة تكريت

الخلاصة

يتضمن البحث تقديرالفولتارين باستعمال كروماتوغرافيا السائل ذات الأداء العالي وبأستعمال العمودC_8 وعند دراسة الظروف المثلى من حيث دراسة المحور العضوي في الطور المتحرك والمكون من محلول منظم الفوسفات بتركيز (0.1 مولاري) عند pH=4 ، ودراسة معدل سرعة جريان الطور المتحرك (2مل /دقيقة) وكانت خطية التراكيز(0.001-0.1) مولاري ومعامل ارتباط 0.997 والنتائج الإحصائية التحليلية بينت ان معدل الانحراف القياسي والنتائج الإحصائية التحليلية بينت ان معدل الانحراف القياسي النسبي RSD% (0.30-0.70-0.80) والخطأ النسبي (0.4-0.7-0.9) وحد الكشف (5×10^{-4}) مولاري وبمعدل استرجاع (96) %.

Summary

This research in includes determination of Voltaren by using high Liquid Chromategraphitic technique .That contains high quality bu using acolum C-4 during quantitive estimate studies , by using study of moving stage that is created from buffer solution (0.1M Phosphat) in pH =4 , study of the speed flow rate 92 ml/min).

The linearity of concentration (0.1-0.001)m and correlation coefficient (0.997).The relative stander deviaton RSD% (0.80-0.70-0.30)and detection limits were (5×10^{-4}) M and percent relative errors were(0.9-0.7-0.4) respectively with percent recovery ranged (96-98)%

High performance Liquid chromatog-raphy(HPLC)-1

الكروماتوغرافيا السائل ذات الاداء العالي :

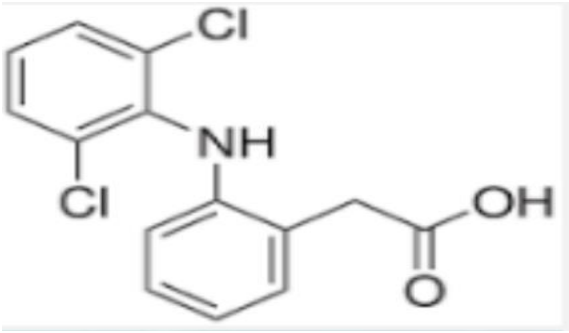
1-المستحضر الدوائي Voltarin

1-1-1-التعريف بالدواء [1]

الأسم العلمي الكيميائي لهذا الدواء هو :

Diclofenac (2,6 Dichloro phenyl amino acetic acid)

أما الأسم التجاري فهو :الفولتارين voltaren الصيغة التركيبية للعقار



أما الاسماء التجارية وفق عدد من الشركات المصنعة[2]:

(voltaren, olfen , voltadin, refen, diclofenac sodium,Voldic ,Diclofenac- Potassium)

2-1-1 خواص الدواء[3] :

الدواء عبارة عن بودرة بيضاء اللون وليس له رائحة مميزة يدخل في تركيب العديد من الادوية وله درجة انصهار 120 c^o ويتفكك عند هذه الدرجة ان هذا الدواء يعتبر مادة شحيحة الذوبان في الماء ولهذا السبب يحضر كملح لمحاولة زيادة ذوبانه في الماء ويحول الى داي اثيل امين دايكلوفيناك لزيادة ذوبانه في الدهن عند محاولة تصنيعه كهلام خارجي (Gel).

3-1-1 أستخدامات الدواء :

1-التهاب المفاصل
2-التهاب الفقرات
3-خافض للحرارة

حيث تمكن الباحث من تقدير الفولتارين في الأغذية بتقنية الألكتروفورسيس الشعري ذات الأداء العالي باستخدام عمود شعري من Fused silica مع ألكتروليت يحتوي phosphoric-acid (1.9mM,3mM)عند pH=3 وجهد فصل 20Kv وحد كشف 40 g/ml [4] وتمكن الباحث Rang تقدير الفولتارين وحامض البنزويك والكافئين في شراب الكاربوتيت بتقنية الكتروفورسيس الشعري بـأستخدام عمود غير مطلي Fused dilica في 35 $م^5$ مع 20 ملي مول كلاكسين كمحلول منظم عند pH=9 و جهد فصل 30kv وبحد كشف 15g/ml [5] وتمكن العالم Frank تقدير الفولتارين بأستخدام قطب nafion المحور بالطريقة المجهادية حضر قطب Nafion المحور من (1gm) ثنائي بيوتايل نثاليت مع(2mg) electro-active material وبحد كشف 3 M [6] وكذلك الباحث GOU من تقدير الفولتارين باستخدام الطريقة اللونية البسيطة وبحد كشف 0.3 M [7] وقدمت دراسة من قبل العالم Song باستخدام طريقة النبض التفاضلي بأستخدام قطب (vitreous-carbon) مع قطب البلاتين وقطب الكالوميل المشبع (SCE) بدرجة 25$م^o$ وبحد كشف 0.3M [8] واقترح الباحث Mecek من تقدير الفولتارين بأستخدام طريقة الكتروفورسيس الشعري و باستخدام Fused-silica capiltary عند درجة 25$م^o$ مع محلول منظم 0.06 g/ml trisodum وبحد كشف 3 mg/mL [9] وتمكن العالم DI fos التقدير بالطريقة المجهادية اخذ وزن 300mg من العقارمع 25ml من الماء المقطر وأخذ الراشح وسحق مقابل 0.1M من NaOH وبحد كشف 0.25مايكرومول [10]

5-1-1 الاجهزة والمواد الكيميائية المستخدمة

1- العمود :- استخدم العمود (4) (Nova-Pak الذي يحوي الطور الساند Octabecy silica (7nm) وذو الابعاد (20سم/6 ملم) والذي يدعى C4
2- مزن العمود :-نوع (Anglicon)مدى درجة حرارته (10-99)درجة مئوية)
3- مقياس الدالة الحامضية :نوع JENWAY.PHMETER 3310
4- مطياف الاشعة فوق البنفسجية –المرئية :- نوع (Philips) موديل (pu 8720) مزود بخلية كوارتز ذو مسار ضوئي (1cm) وكذلك شاشة عرض مع طابعة لرسم وتسجيل الطيف .
5- جهاز صمام الامواج فوق الصوتية Ultrasonic Bath:- نوع (pty-Syndey)مزود بحمام مائي مع هيتر للتسخين .

جدول (2) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة .

اسم المادة	%النقاوة	الصيغة الكيميائية	الشركة
Methanol	99	CH3OH	Fluka
voltaren	99%	$C_{14}H_{11}C_{l2}NO_2$	Fluka
Acetonitril	85%	H_3PO_4	Fluka
Aceticacid	98	CH3COOH	Fluka

(2-1) الظروف المثلى

1- دراسة تعين الامتصاص الامثل للعقار:-

حضر تركيز ثابت من عقار الفولتارين المستخدم في هذه الدراسة حيث اخذ وزن (4gm) من العقار واذيب في مذيب الطور المتحرك المكون من محلول منظم الفوسفات (0.1m) في قنينة حجمية سعة 100مل واكمل الحجم الى حد العلامة ثم سحب (2ml) من المحلول وخفف بنفس المذيب في قنينة حجمية سعة 100ml وأكمل الحجم الى حد العلامة وكان أعظم أمتصاص عند 400nm وأجري مسح طيفي من 220-800 nm

2- دراسة الظروف المثلى لفصل العقار الطبي بتقنية Hplc:-

تم دراسة الضروف المؤثرة على زمن احتجاز العقار على العمود الكروماتغرافي للحصول على أفظل زمن أحتجاز للعقار على العمود الكروماتغرافي للحصول على أفضل فصل وبزمن معقول وقد حضر الطور المتحرك وتم طرد الغاز منه بأستخدام جهاز الأمواج الفوق الصوتية .

3- دراسة نسبة المحور العضوي في الطور المتحرك :

تم دراسة أسترداد عقار الفولتارين على العمود (Nova-pak c4) وبطور متحرك مكون من 40% أسيتونايتريل ومحلول منظم الفوسفات بتركيز(0.1N) والذي حضر بأذابة (2.5g) من الفوسفات والماء المقطر في قنينة حجمية سعة 250mL حيث تم تعديل حامضية المحلول المنظم بأضافة قطرات من حامض النتريك بتركيز (0.1M) وبطول موجي 220nm وبمعدل جريان ($2mlmin^{-1}$)

4-دراسة اختيار الاس الهيدروجيني الامثل للطور المتحرك :-

عند دراسة تاثير pH على عقار الفولتارين يلاحظ ان هناك تغير في زمن الاحتجاز عند دوال حامضية مختلفة تتراوح (2-4) بأستخدام محلول منظم الفوسفات (0.1M) ومعدل جريان $2mlmin^{-1}$ وعند طول موجي 220 نانوميتر .

5-دراسة اختيار درجة الحرارة المثلى للعمود الكروماتغرافي :

تم دراسة تأثير درجة الحرارة للعمود الكروماتغرافي على معدل استرداد العقار بمعدل جريان ($2mlmin^{-1}$) وبمدى درجة حرارة (10-25درجة مئوية)للعمود الكروماتغرافي وعند طول موجي 220nmنانوميتر وعند رسم العلاقة بين لوغارتم Kمقابل معكوس درجة الحرارة وحسب معادلة فانت هون عمل على شكل بياني.

6-قياس الدقة والضبط وحد الكشف للعقار :

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

7- التطبيقات (Application)

طبقت الظروف المثلى التي تم الحصول عليها لتقدير الفولتارين اذ تم سحق 4 اقراص واخذ معدل وزن قرص واحد وايب في 100مل من الطور المتحرك وتم بعد ذلك ترشيح النموذج على ورق ترشيح ووضع الراشح بعدها في قنينة حجمية سعة 250 مل واكمل الحجم وتم حقن كل تركيز بشكل متزامن واخذ معدل خمس قراءات والنتائج موضحة بالجدول .

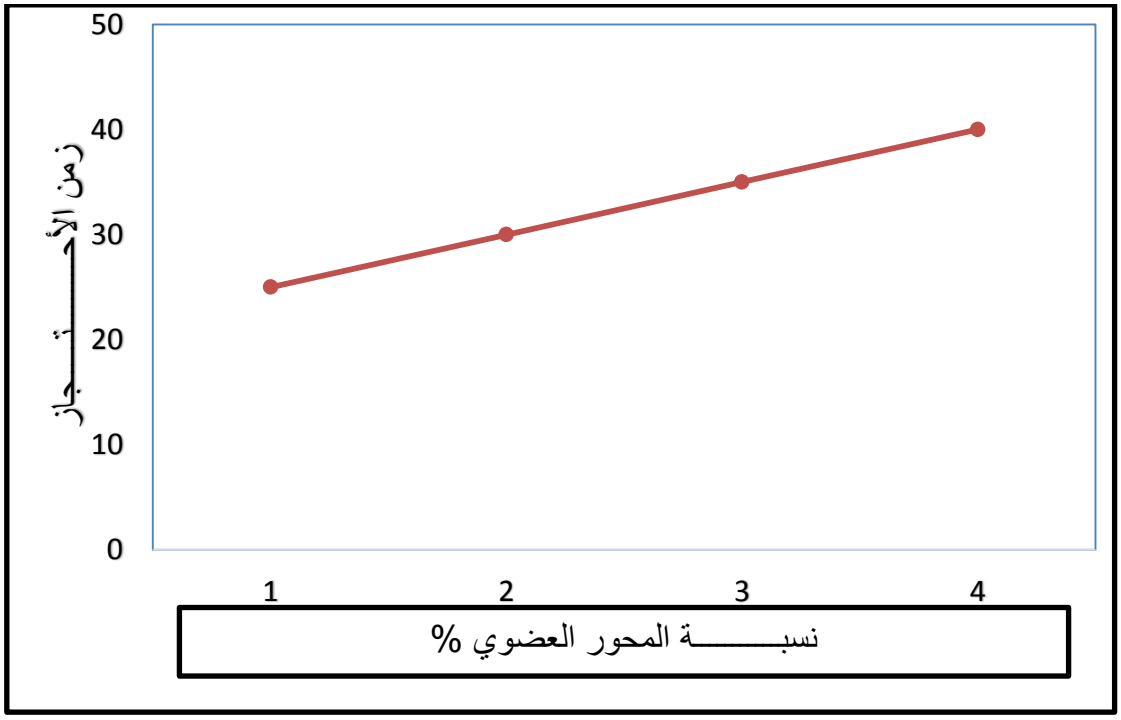
3-1 النتائج والمناقشة

1- دراسة التغير في نسبة المحور العضوئي في الطور المتحرك :

تم دراسة التغير في زمن الاحتجاز للعقار نتيجة التغير في نسب المحور العضوي وتثبيت بقية المتغيرات والنتائج مبينة في جدول (3) وشكل (1) اذ يظهر النتائج ان هناك تناقص في زمن الاحتجاز بزيادة نسبة المحور العضوي وهذا متفق عليه مع نتائج الباحثين [11]. حيث ان زيادة نسبة المحور العضوي من المحتمل ان يغير من حالة التمذوب (solvate state) للمذيبات وبالتالي تغير السلوك الاحتجازي لها [12].

جدول (3) تغير زمن الاحتجاز (t_R) للعقار عند تراكيز مختلفة من المحور العضوي بسرعة جريان (2مل/دقيقة) عند طول (400 نانومتر)

percentage	25%	30%	35%	40%
Reteation Time	3.5	3	2.6	2.4



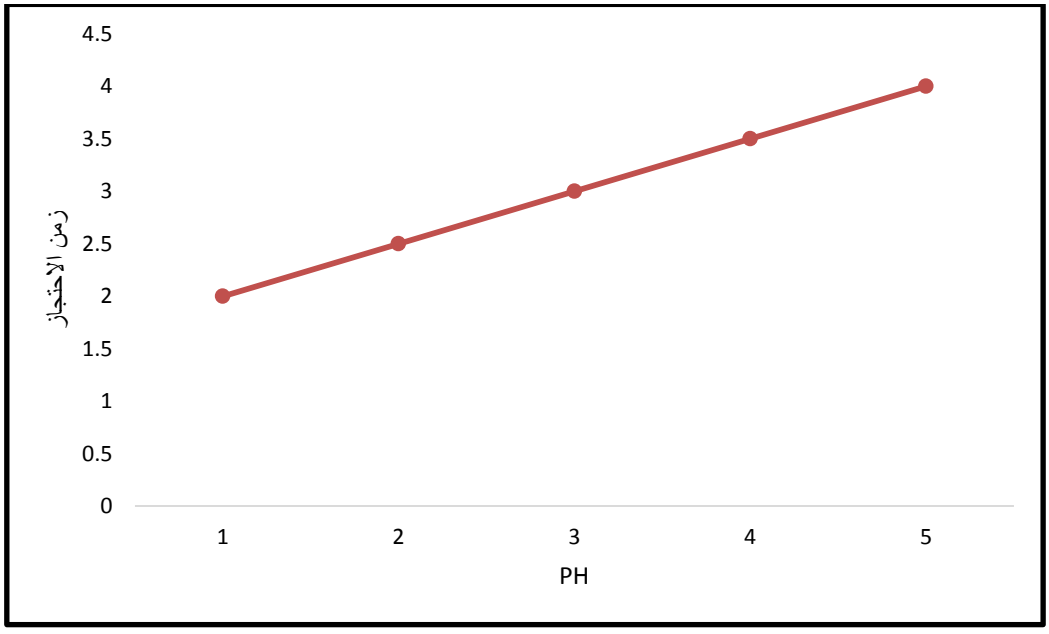
شكل(1) العلاقة بين نسبة المحور العضوي وزمن الاحتجاز

2-دراسة اختيار الاس الهيدروجيني الامثل للطور المتحرك :

أظهرت دراسة اختيار الاس الهيدروجيني الامثل للطور المتحرك للعقار انه كلما زادت الدالة الحامضية زاد زمن الاحتجاز وهذا ما توافقت عليه بعض الدراسات[13] حيث تقل الصفة الايونية وبالتالي يقل تأين المركب الدوائي وقد اختير pH =4 لانه تم الحصول على زمن احتجاز معقول.

جدول (4)يوضح العلاقة بين الاس الهيدروجيني وزمن الاحتجاز

pH	2	2.5	3	3.5	4
tR	3	3.5	3.6	3.8	4



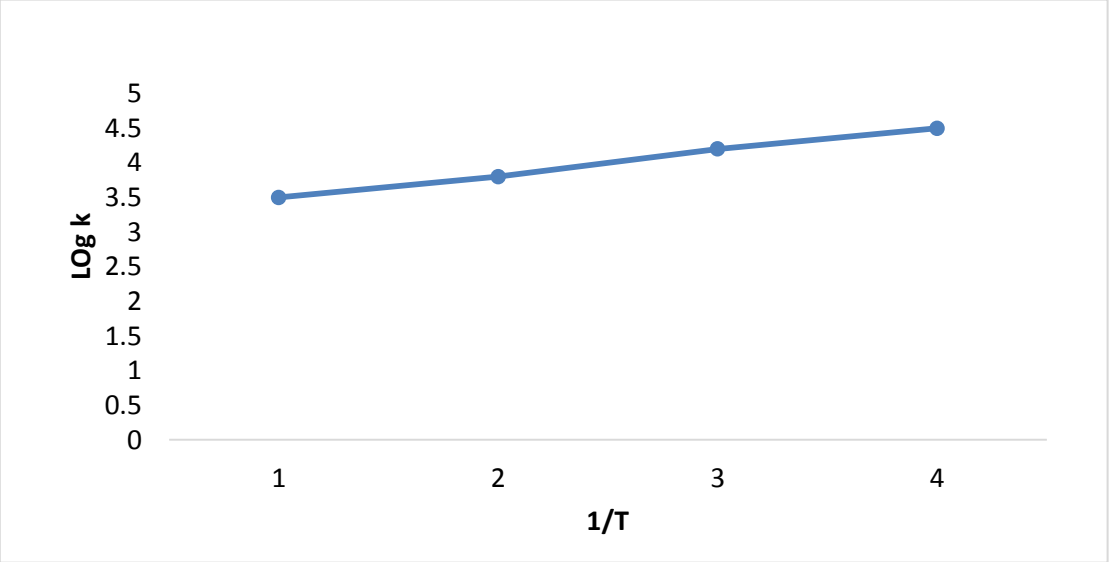
شكل(2) العلاقة بين زمن الاحتجاز والاس الهيدروجيني

3-دراسة اختيار درجة الحرارة المثلى للعمود الكروماتغافي:

يبين جدول (5)التغير في زمن احتجاز المركب الدوائي عند درجة حرارة (10-25)م^5 اذ يلاحظ تناقص زمن الاحتجاز للمركب الدوائي بزيادة درجة الحرارة ومن رسم العلاقة البيانية ل فانت هوف بين لوغارتم عامل السعة (Log k)مع معكوس درجة الحرارة والمبينة في شكل (3) بأن زيادة درجة الحرارة يقلل من عامل السعة لذا فأن نقصان قيم السعة مع درجة الحرارة يعزى الى نقصان في اللزوجة للطور المتحرك مؤديا الى زيادة كفاءة العمود بسبب زيادة معدل الانتقال الكتلي وهذا مايشر اليه ..... بأن زيادة درجة الحرارة يغير انثالبي الامدصاص والتجرئة وبالتالي يختزل زمن الاحتجاز .

جدول (5)التغير في زمن الاحتجاز (tR) للعقار مقابل التغير في درجة الحرارة

درجة الحرارة	10c	15c	20c	25c
Voltaren	Log k 0.40	Log k 0.35	Log k 0.30	Log k 0.25
	tR 4.5	tR 4.2	tR 3.8	tR 3.5



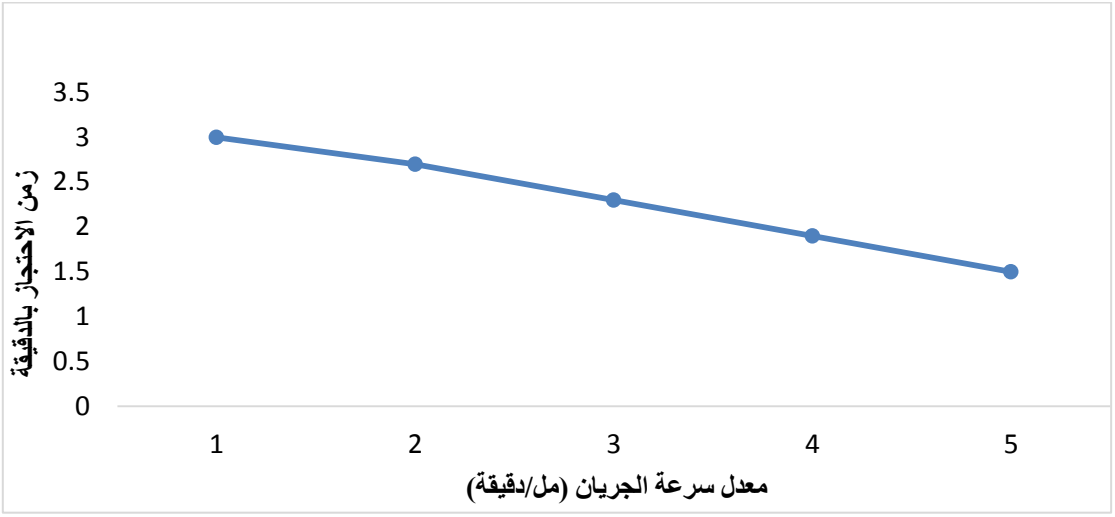
شكل(3) العلاقة البيانية لتأثير درجة الحرارة على عامل السعة للاحتجاز على العمود C_4

(3-3-1) دراسة اختيار معدل سرعة الجريان للطور المتحرك:

بينت النتائج التي تم الحصول عليها كلما ازداد معدل سرعة الجريان كلما قل زمن الاحتجاز وبالتالي يقلل من عملية الفصل لان زيادة معدل سرعة الجريان للطور المتحرك يسبب زيادة الانتقال الكتلي وهذا مايؤدي الى التقليل من عدد الصفائح النظرية الموجودة في العمود وهذا سيساهم في انخفاض عامل الفصل وعامل السعة مما يؤدي الى نقصان كفاءة الفصل.

جدول (6) يوضح العلاقة بين سرعة الجريان وزمن الاحتجاز:

Druge	Flowrate	Rt
voltaren	0.5	3
	0.9	2.7
	1	2.3
	1.5	1.9
	2	1.5



شكل (4) تغير معدل سرعة الجريان على زمن احتجاز العقار

(5-3-1) قياس الدقة والضبط

بعد تثبيت الظروف المثلى للتقدير الكمي للعقار تم قياس الدقة والضبط في جدول (7) ولثلاث مستويات من التراكيز اذ تم الحصول على معدل الانحراف القياسي النسبي %RSD ومعدل الاسترجاعية

جدول (7) الدقو والضبط المستحصلة من تقدير العقار

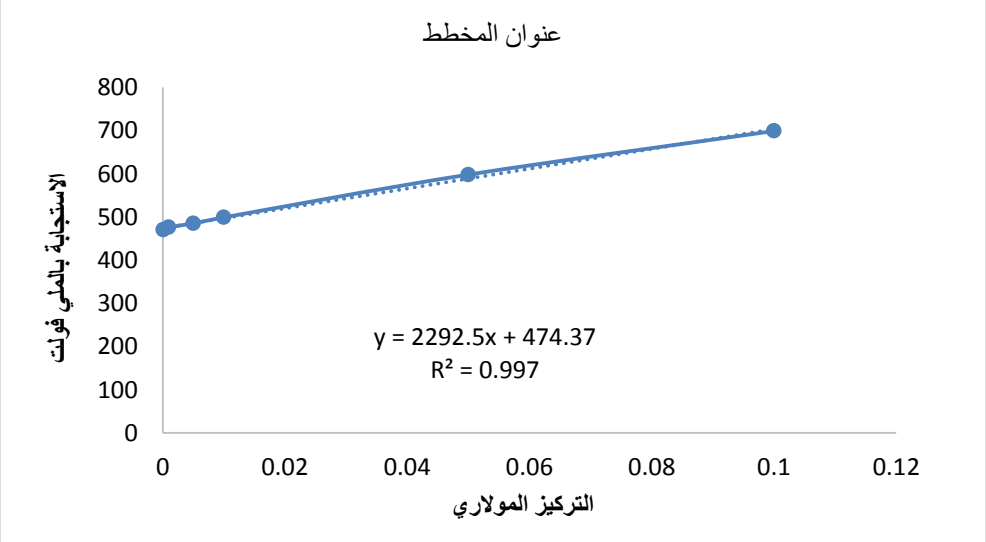
العقار	التركيز(مولاري)	الخطأ النسبي	الانحراف القياسي	الاسترجاعية	معدل الاسترجاعية
voltaren	10^{-2}	0.9	0.80	96	96.6
	5×10^{-2}	0.7	0.70	96	
	10^{-1}	0.4	0.40	98	

إيجاد العلاقة الخطية من منحني المعايرة

بعد ان تم تثبيت الظروف المثلى لتقدير العقار استخدمت طريقة القياس لتقدير المستحضر بعد ان تم تحضير عدة محاليل قياسية للعقار كمادة فعالة حيث تم حساب معادلة خط المستقيم بطريقة إحصائية وكذلك معامل الارتباط وحد الكشف وجدول (8)يوضح المعادل الخطية وقياس معامل الارتباط وحد الكشف .

جدول (8) المعادل الخطية ،قياس معامل الارتباط وقياس حد الكشف للعقار

العقار	المعادلة الخطية	معامل الارتباط	حدود الخطية	حد الكشف
voltaren	$474.37_x+2292.5y$	0.997	0.1-0.001	0. 1



شكل (5) العلاقة الخطية بين تركيز المادة الفعالة والاستجابة

التطبيقات:-

طبقت الظروف المثلى التي تم الحصول عليها وأظهرت النتائج دقة عالية بالمقارنة مع المحتوى الأصلي كما مبينة في جدول (9) والتي تبين النتائج التي تم الحصول عليها من تقدير المستحضر الصيدلاني من الوحدات الإنتاجية والمحلية والمستوردة اذ تراوحت الاسترجاعية 98% وذلك باستخدام حبوب الفولتارين من صناعة شركة ادوية سامراء .

جدول (9) النتائج المستحصلة من تقدير المستحضر الصيدلاني من الوحدات الإنتاجية والمحلية والمستوردة .

المستحضر الصيدلاني الماخوذ من	الخطأ النسبي %	الانحراف القياسي النسبي %	الاسترجاعية
voltaren, olfen , voltadin, refen, diclofenac-sodium,Voldic	0.10	1.7	98

جدول (10) الانحراف القياسي للانحدار والميل واختيار (t) المحسوب الجدولي لتقدير العقار بطريقة Hplc.

العقار	اختيار (t)ذو الجانبين الجدولي (95%)	اختيار(t) ذو الجانبين المحسوب	الانحراف القياسي للميل sb	الانحراف القياسي للانحدار (sr)
Voltaren tablet	1.20	30.14	0.003	0.0002

المصادر

1-British pharma copoeia ,pharmaceutical-press London (2000).
2-H.Langtry ,S.Grant , K.Goa; Drugs (2013)
3- M.Gilber, Highperformance Liquid chromatography (2014),189
4- S.Hagiwara,Tyasuno , R. Suzuki , T.Saito; Shokuhin Eiseigakuzasshi , Feb (2015) , 40(1),60-63
5- R.C.Zhang,M.Z .Jiang ;sepu,Nov (2012), 15 (6) , 442-443
6- HHagenauer U.Frank , C.H.U.Mosandl , A.Dtsch.
7-J.L.Deborde ,M.N.Lamarque , E.Lefebver;Expert. Jul(2011)
8-J.groes,O.Jonas; J.palanar chronatog. (2015)
9-M.D.F.Santos , H.vermeersch; J.of chromatog.(2012)
10-D.FOS ; CHROMATOGRAPHIA may –jun (2013)
11- P.J. Ridgeon , Liquid Chromatography, Separation , July (2011) 1st ed pye Unicam Ltd .
12-- R.P. W,Scott ; J. of liqChromatog., (2013),10 (8&9) , 1547-1567 .
13- R. Boscott, nature (2010) , 159 , 342 .