Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 29, No: 2, 2020 (45-62)

# Indirect Spectrofluorometric Determination of Enoxaparin Sodium in Pharmaceutical Formulation (Injection) by Ion Association Complex Formation with Acriflavine Dye

**Elham S. Salih[1*]; Mohamed Th. Aghwan[2]**

Department of Chemistry, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Iraq.

Email:[1*]altalibee_59@yahoo.com, [2] Mohamed.aghwan@gmail.com

(Received July 01, 2018; Accepted October 24, 2019; Available online June 01, 2020)

DOI: 10.33899/edusj.2019.125843.1001, © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul. This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## Abstract

A simple, sensitive and selective spectrofluorometric method has been developed for the determination of enoxaparin sodium in bulk and dosage forms (injection). The method was based on the quantitative quenching effect of enoxaparin on the native fluorescence of acriflavine due to the formation of nonfluorescent supramolecular ion association complex between the studied drug and acriflavine dye in aqueous solution. The decrease of acriflavine fluorescence was observed at 506 nm after excitation at 402 nm. The relationship between quenching fluorescence intensity and concentration of enoxaparin sodium was linear in the range 0.05-20 µg/ml and with correlation coefficient 0.9990 and with LOD and LOQ 0.011 and 0.035 µg/ml respectively. The average recovery was 100.51% and RSD is less than 3.23%. The stoichiometry of enoxaparin to acriflavine was calculated a 1:4. The method was applied successfully to the determination of enoxaparin as injection formulation and the results were in a good agreement with certified value and standard addition procedure.

**Keywords**: Spectrofluorometry, Acriflavine dye, Enoxaparin sodium, Ion association complex.

# التقدير الفلورومتري غير المباشر للاينوكساپارين صوديوم في الحقن الدوائية بتكوين معقد التجمع الأيوني مع صبغة الاكريفلافين

**إلهام سعد الله صالح [1*] و محمد ثامر اغوان [2]**

قسم الكيمياء, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل, الموصل, العراق

## الخلاصة

تم تطوير طريقة فلورومترية يسيرة وحساسة وانتقائية لتقدير الاينوكساپارين صوديوم بشكله النقي وفي المستحضرات الدوائية بشكل حقن اعتمدت الطريقة على اخماد تفلور صبغة الاكريفلافين نتيجة تكوين معقد التجمع الايوني فائق الجزيئية غير المتفلور بين الاينوكساپارين صوديوم وصبغة الاكريفلافين في المحلول المائي, اذ وجد ان النقصان في شدة تفلور صبغة الاكريفلافين عند الطول الموجي 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402 نانوميتر يعطي دالة خطية ضمن مدى التراكيز يتراوح بين 0.05−20.0 مايكروغرام/مللتر من الاينوكساپارين صوديوم بحدي كشف وتقدير كمي 0.011 و 0.037 مايكروغرام/مللتر على التوالي وبمربع معامل ارتباط 0.9990.

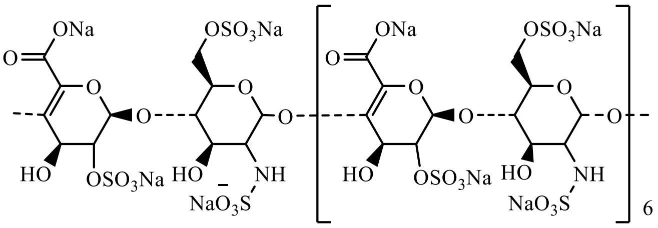
كانت الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين, اذ تراوح معدل نسبة الاسترجاع 100.51% وانحراف قياسي نسبي اقل من 3.23% بلغت النسبة التركيبية المولية لطريقة نسبة الميل 4:1 (الاينوكسابارين صوديوم : صبغة الاكريفلافين). طبقت الطريقة بنجاح في تقدير الاينوكسابارين صوديوم في الحقن الدوائية ووجد ان نتائج الطريقة متوافقة مع المحتوى الاصيل للحقن الدوائية ومع نتائج طريقة الاضافة القياسية لتقدير الاينوكسابارين صوديوم. ممايجعل امكانية تطبيق الطريقة في التحليلات الروتينية لتقدير الاينوكسابارين في السوائل الحيوية

**الكلمات المفتاحية:** الفلورمتري وصبغة الاكريفلافين والاينوكسابارين صوديوم ومعقد التجمع الأيوني.

---

**المقدمة**

يُعد الاينوكسابارين صوديوم بوصفه هيبارين منخفض الوزن الجزيئي (Low-molecular weight heparin) لذا فهو عبارة عن ملح الصوديوم للهيبارين مزال البلمرة القلوية لاستر بنزيل الهيبارين[1], ويتم الحصول على المادة البادئة (الهيبارين) من الطبقة المخاطية لامعاء الخنزير. ويتالف الاينوكسابارين صوديوم من سلاسل Oligosaccharides التي لم يتم تحديدها بشكل كامل, وان أغلبية المكونات لها تركيب4–اينوبيرانوزيورونات (4-enopyranose- urinate) عند النهاية غير المختزلة ومشتق1,6–انهيدو(1,6 anhydo derivative) عند النهاية المختزلة للسلسلة, ويتراوح معدل الوزن الجزيئي للاينوكسابارين صوديوم 4500 دالتون للمدى بين 3800 و 5000 دالتون[2]. يمتلك الاينوكسابارين التركيب الكيميائي الاتي[1].




Enoxaparin sodium

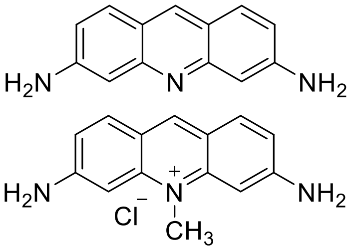
Molar mass= 4645 g/mol

يوصف الاينوكسابارين للعلاج والوقاية من العديد من الاضطرابات السريرية وبضمنها الخثرة الدموية الوردية العميقة والاختلاج العضلي الأذيني وخثرة الصمام الميكانيكي[3].

اقترحت طرائق تحليلية مختلفة لتقدير الاينوكسابارين صوديوم اذ وصفت المطيافية الفوتومترية الحالة الصلبة في تقدير العقار بهيئته النقية وفي الحقن الدوائية وذلك استناداً إلى مبدأ قصره كمياً لصبغة التولويدين الزرقاء (Toluidine-blue)[4]. واستعملت الصبغة التفلورية هيبارين الحمراء في التقدير الحساس للاينوكسابارين صوديوم وذلك بالاعتماد على تأثيره في اخماد شدة تفلور الصبغة[5]. كما تم تطبيق تسحيحات التجمع الايوني (ion association titration) في تقدير الاينوكسابارين صوديوم (ويعرف تجارياً Lovenox) وذلك بالتسحيح مع كبريتات البروتامين (protamine sulphate) في وسط المحلول المنظم HCl-Tris[6]. وقد طبقت تقنية فولتامتري الخطي ذي الاتجاه الواحد (Linear sweep voltammetry) لتقدير الاينوكسابارين صوديوم بقياس الموجة الكاثودية لصبغة لايت الخضراء (Light green) في وسط محلول براتون– روبنسون المنظم (pH2.0)[7]. وامكن تحليل مضاد التخثر اينوكسابارين صوديوم بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الانيوني القوي (SAX HPLC)[8].

**صبغة الاكريفلافين Acriflavine dye وتطبيقاتها التحليلية**

تعد صبغة الاكريفلافين (AF) من مشتقات الاكريدين وغالباً ماتكون هيئتها التجارية عبارة عن خليط من 6,3–ثنائي–امينو–10–مثيل اكريدينيوم كلوريد (التراليبافلافين) و 6,3–ثنائي امينو اكريدينيوم (البروفلافين), وتمتلك الصبغة التركيب الكيميائي الاتي[9].



Acriflavine ($C_{27}H_{25}ClN_6$)

Molar mass = 468.97 g/mol

ان الاكريفلافين عبارة عن مسحوق برتقالي او بني اللون يذوب بالماء والكحول [10] ليعطي محلولاً اصفر او برتقالي متفلوراً[11], لذا استعمل في المجالات الاحيائية لتلوين اجزاء الخلايا وكشفها تحت المجهر. اذ تلون جدار الخلية باللون الاحمر والنواة باللون الاصفر المخضر[12].

حضر الاكريفلافين عام 1912 من قبل الباحث الالماني Ehrlich من قطران الفحم وقد استخدم اثناء الحرب العالمية الاولى ضد مرض النوم ومطهر موضعي اذ عرف عن الاكريفلافين بانه له فعاليات قاتلة لطفيلي المثقبيات (Trypanocidal) ومضاداً للجراثيم والفايروسات[13]. واما تأثيراته على الخلايا السرطانية فقد عرفت منذ اكثر من 50 سنة. اذ يكون للاكريفلافين تأثير تثبيطي فعال على نمو الاورام وتكوين الاوعية الدموية فيها[14]. كما ان الاكريفلافين مع البروفلافين يمكن ان يكون عقاراً فعالاً مضاداً للملاريا[10].

استخدمت صبغة الاكريفلافين في تطوير طرائق يسيرة عالية الحساسية لتقدير مركبات دوائية عديدة اعتماداً على مبدأ إخماد تفلور الصبغة من خلال تكوين معقدات المزدوج الايوني غير المتفلور في وسط منظم بدالة حامضية مناسبة, إذ وجد ان النقصان في شدة تفلور صبغة الاكريفلافين يتناسب طردياً مع تركيز المركب الدوائي قيد الدراسة. فقد امكن تقدير كميات مايكروغرامية من العقار فيوروسيميد (Furosemide) من خلال الاخماد الكمي لصبغة الاكريفلافين في وسط براتون–روبنسون[15]. ونشر Shenghui[16] واخرون طريقة فلورومترية حساسة لتقدير السيفترياكسون (Ceftriaxone) وذلك بتكوين معقد التجمع الايوني غير المتفلور بين المركب الدوائي وصبغة الاكريفلافين. كما استخدمت الصبغة في تقدير حامض الاسكوربيك من خلال اخماد تفلورها[17].

ونظراً لقلة الطرائق التخصصية لتقدير الاينوكساپارين صوديوم ولوفرة الصبغة ورخص ثمنها, لذا يهدف البحث الى تطوير طريقة فلورومترية حساسة لتقدير المركب الدوائي من خلال تكوين معقد التجمع الايوني المستقر والذائب في الماء بدون عمليات استخلاص

**الجزء العملي**

**الأجهزة المستعملة**

تم اجراء القياسات الفلورومترية باستخدام جهاز Shimadzu RF-5301 PC- Spectrofluorometer مجهز بمصباح الزينون (Xenon lamp) باستخدام خلايا الكوارتز شفافة من جميع الجهات ذات السمك 1سم. وقيست الدالة الحامضية باستخدام جهاز الدالة الحامضية نوع Thermo RL 060P Electron Company-Singapore مرتبط بقطب مجهز من الشركة ذاتها. واجريت عملية الوزن باستخدام ميزان حساس نوع KERN ABS-Germany. وتمت عمليات التسخين بواسطة حمام مائي نوع BS-11 من شركة Lab Companion-Korea. واجريت عمليات الاذابة باستخدام جهاز Ultrasonic Cleaner للرج بالموجات فوق الصوتية نوع Power Sonic 405 مجهز من شركة Lab Tech-Korea.

**محاليل المواد المستعملة**

- محلول الاينوكسابارين صوديوم (مجهز من شركة Sanofi) حضر محلول الاينوكسابارين بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر وذلك باذابة 0.0200 غرام من المركب في 200 مللتر من الماء المقطر ومنه يحضـــر محلول بتركيز 10 مايكروغرام/مللتر ويحفظ في الثلاجة ويبقى مستقراً لمدة اسبوع.

- محلول صبغة الاكريفلافين (شركة BHD) تم تحضير محلول الصبغة بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر وذلك باذابة 0.0100 غرام من الصبغة في الماء المقطر في قنينة حجمية سعة 200 مللتر ومنها تم تخفيف تركيز الصبغة الى 10 مايكروغرام/مللتر.
- محلول الفثالات المنظم (pH4.0) يحضر بمزج هيدروكسيد الصوديوم و فثالات الصوديوم الهيدروجينية كلاهما بتركيز0.1 مولاري وتؤخذ منها أحجام مختلفة [18] والتخفيف الى 100 مللتر بالماء المقطر للحصول على pH4.0 والتي يتم ضبطها بوساطة جهاز قياس الدالة الحامضية.
- محلول الخلات المنظم (pH4.0) يحضر بمزج حامض الخليك و خلات الصوديوم كلاهما بتركيز 0.2 مولاري وتؤخذ منها أحجام مختلفة [18] والتخفيف الى 100 مللتر بالماء المقطر للحصول على pH4.0 والتي يتم ضبطها بوساطة جهاز قياس الدالة الحامضية.
- محلول براتون– روبنسون المنظم (pH4.0) يحضر بمزج حامض البوريك مع حامض الفسفوريك 85% وحامض الخليك توخذ كميات مختلفة [18] يكمل الحجم بالماء المقطر في قنينة حجمية سـعة 1000 مللتر ويتم ضـبط الدالة الحامضـية باسـتخدام هيدروكسيد الصوديوم 0.2 مولاري.
- محلول السترات المنظم (pH4.0) يحضر بمزج حامض الستريك و سترات الصوديوم كلاهما بتركيز 0.1 مولاري وتؤخذ منها أحجام مختلفة [18] والتخفيف الى 100 مللتر بالماء المقطر للحصول على pH4.0 والتي يتم ضبطها بوساطة جهاز قياس الدالة الحامضية.
- محلول الفورمات المنظم (pH4.0) يحضـر بمزج هيدروكسـيد الصـوديوم و حامض الفورميك كلاهما بتركيز 0.1 مولاري وتؤخذ منها احجام مختلفة [18] والتخفيف الى 100 مللتر بالماء المقطر للحصـول على pH4.0 والتي يتم ضـبطها بوسـاطة جهاز قياس الدالة الحامضية.
- محاليل المتداخلات تحضر محاليل المتداخلات بتركيز 1000 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.1000 غرام منها في 100 مللتر من الماء المقطر.

- محاليل المواد الفعالة سطحياً تحضر محاليل المواد الفعالة سطحياً كل من SDS وCTAB وCPC بتركيز 0.1% وذلك بإذابة 0.1 غرام منها في 100 مللتر من الماء المقطر. وتحضر محاليل كل من المواد Triton X-100 وTween 20 بتركيز 1.0% بإذابة غرام واحد منها في 100 مللتر من الماء المقطر.

**طريقة العمل والمنحنى القياسي**

اضيفت الى مجموعة قنانٍ حجمية سعة 10 مللتر حجوم متزايدة (مللترات) من محلول الاينوكسابارين صوديوم بتراكيز 10 و100 مايكروغرام/مللتر لتغطية المدى الخطي 0.05–20 مايكروغرام/مللتر و1.7 مللتر من صبغة الاكريفلافين بتركيز 10 مايكروغرام/مللتر واكملت الحجوم بالماء المقطر الى حد العلامة وقيست شدة تفلورها (F) بعد 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة عند الطول الموجي 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402, فضلاً عن قياس شدة التفلور (F°) لمحلول صبغة الاكريفلافين (1.7 مايكروغرام/مللتر), ثم احتسبت قيم ΔF من العلاقة (F°-F) للمحاليل

**تحليل حقن الكليكسان والاينوكس**

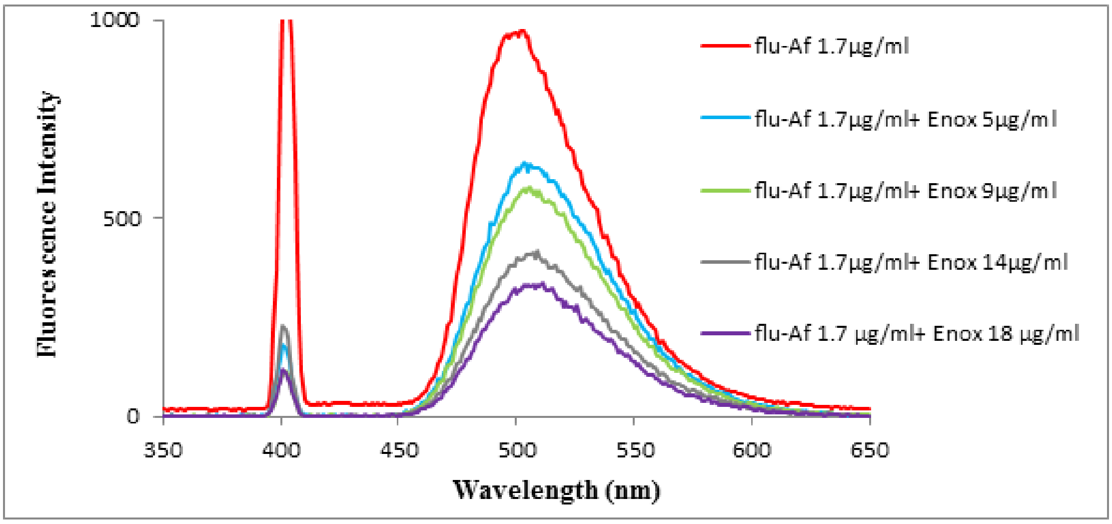
مزجت خمس حقن دوائية من كل مستحضر دوائي Clexane 4000anti-Xa IU/0.4ml من انتاج شركة Sanofi– aventis France وEnox 6000 anti-Xa IU/0.6ml من انتاج شركة Istanbul-Turkey ATABAY اذ تحتوي كل حقنة على 40 ملغم/0.4 مللتر او 60 ملغم/0.6 مللتر من الاينوكسابارين صوديوم وخفف 0.4 او 0.6 مللتر من محلول المزيج في قنينة حجمية سعة 100 مللتر بالماء المقطر لتحضير محلول بتركيز 400 مايكروغرام/مللتر لمستحضر الكليكسان و 600 مايكروغرام/مللتر لمستحضر الاينوكس, وحضر من كل منهما محلولين بتركيز 20 و50 مايكروغرام/مللتر وأخذت من المحاليل كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة للمحاليل القياسية، وتم إيجاد التركيز من المنحني القياسي للاينوكسابارين صوديوم بصيغته النقية.

**النتائج والمناقشة**

**الدراسة التمهيدية وطيف تفلور صبغة الاكريفلافين**

بهدف امكانية تطوير طريقة تفلورية بسيطة وحساسة وانتقائية لتقدير الاينوكسابارين صوديوم تمت دراسة طيف تفلور محلول صبغة الاكريفلافين في الوسط المائي عند اطوال موجية تراوحت بين 350-650 نانوميتر فوجد ان اقصى شدة انبعاث تعطيه الصبغة كان عند الطول الموجي 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402 نانوميتر, الشكل 1.

ووجد تجريبيا عند مفاعلة كميات مايكروغرامية من الاينوكسابارين في الوسط المائي مع صبغة الاكريفلافين حدوث اخماد خطي في شدة تفلور الصبغة عند 506 نانوميتر بزيادة تركيز المركب الدوائي نتيجة تكوين معقد المزدوج الايوني بين المركب الدوائي والصبغة وهذا يؤكد امكانية استخدام الاكريفلافين كصبغة تفلورية في تقدير المركب الدوائي.



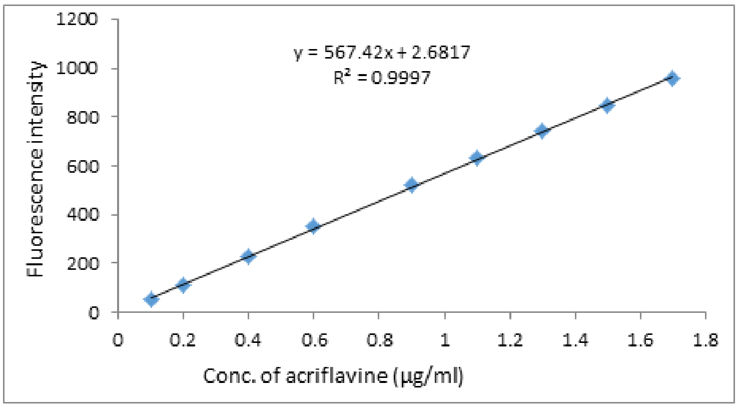

**شكل 1: أطياف الاثارة والانبعاث لصبغة الاكريفلافين (1.7 مايكروغرام/مللتر) في المحلول المائي مقابل الماء المقطر وبوجود كميات مايكروغرامية من الاينوكسابارين صوديوم**

**ضبط الظروف المثلى**

اجريت التجارب اللاحقة باستخدام 1.8 مللتر من محلول الاينوكسابارين بتركيز 100 مايكروغرام/مللتر وإكمال الحجم بالماء المقطر في قنان حجمية سعة 10 مللتر وقيست شدة تفلور الصبغة عند الطول الموجي 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402 نانوميتر .

**دراسة كمية صبغة الاكريفلافين**

اجريت هذه الدراسة لتثبيت الكمية المثلى من صبغة الاكريفلافين التي يمكن استخدامها لتقدير الاينوكسابارين صوديوم والتي تقع ضمن المدى الخطي للمنحنى القياسي بين التركيز وشدة التفلور, إذ تمت اضافة حجوم متزايدة (0.1-2.0 مللتر) من محلول صبغة الاكريفلافين بتركيز 10 مايكروغرام/مللتر واكمل الحجم بالماء المقطر الى حد العلامة وقيست شدة التفلور عند 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402 نانوميتر, إذ يبين المنحنى القياسي في الشكل 2 ان المدى الخطي لتراكيز الصبغة هو 0.1-1.7 مايكروغرام/مللتر وعليه تم تثبيت التركيز 1.7 مايكروغرام/مللتر في الدراسات اللاحقة.




**شكل 2: المنحنى القياسي لصبغة الاكريفلافين**

**تاثير الدالة الحامضية والمحاليل المنظمة**

لدراسة تأثير الدالة الحامضية في قيمة اخماد شدة تفلور صبغة الاكريفلافين عند تفاعلها مع المركب الدوائي فقد تم الاتي:

اولاً تكوين معقد التجمع الايوني بين الصبغة والاينوكسابارين صوديوم في المحلول المائي او بوجود محاليل محضرة بدوال حامضية تراوحت بين 1 و 10 (بمزج حجوم مختلفة من حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري) إذ اضيفت بكميات ثابتة 1 ملليتر الى قنان حجمية تحتوي على 18 مايكروغرام/مللتر من الاينوكسابارين صوديوم و 1.7 مايكروغرام/مللتر من صبغة الاكريفلافين واكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر. قيست شدة تفلور المحاليل مقابل محاليلها الصورية عند 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402 نانوميتر واحتسبت قيم ΔF "الفرق بين شدة تفلور صبغة الاكريفلافين لوحدها (F°) وبعد تفاعله مع المركب الدوائي (F)", فضلاً عن ذلك تم قياس الدالة الحامضية النهائية لكل محلول وادرجت النتائج المستحصلة في الجدول 1.

**جدول1: تاثير الدالة الحامضية في التقدير**

| pH of solution added* | F° | $\lambda_{em}$ | F | $\lambda_{em}$ | ΔF* | pH final |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 916 | 506 | 405 | 505 | 511 | 1.03 |
| 2 | 956 | 508 | 467 | 509 | 489 | 2.06 |
| 3 | 953 | 507 | 474 | 506 | 479 | 3.18 |
| 4 | 964 | 508 | 476 | 508 | 488 | 4.34 |
| 5 | 957 | 506 | 528 | 506 | 429 | 4.83 |
| 6 | 921 | 509 | 550 | 508 | 371 | 5.92 |
| 7 | 895 | 502 | 526 | 506 | 369 | 7.12 |
| 8 | 847 | 506 | 486 | 504 | 361 | 8.61 |
| 9 | 812 | 509 | 492 | 508 | 320 | 9.34 |
| 10 | 776 | 508 | 448 | 508 | 318 | 9.81 |
| **With out** | **965** | **506** | **341** | **506** | **624** | **4.1** |

*1.0 ml buffer added

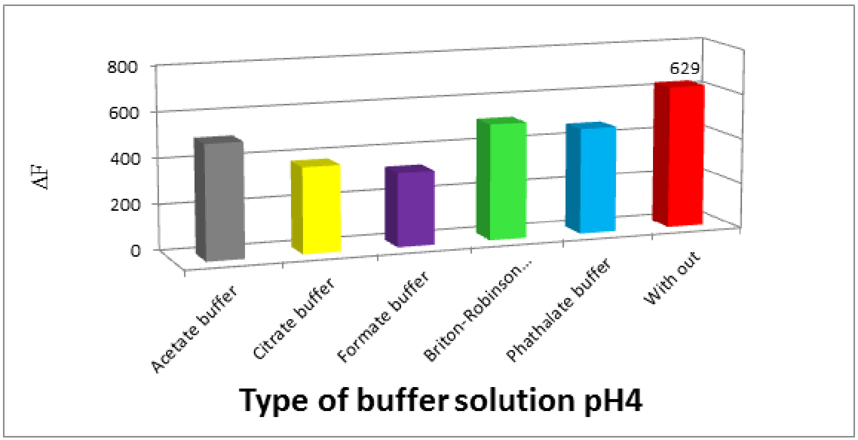
**ΔF = F° - F

F° : Intensity of (1.7 µg/ml) dye

F : Intensity of (1.7 µg/ml) dye + (18 µg/ml) enoxaparin sodium

يلاحظ من النتائج المدرجة اعلاه تأثر قيم ΔF بتغير الدالة الحامضية, إذ وجد ان اعلى قيمة لـــΔF كانت عند إجراء التفاعل لتكوين معقد التجمع الايوني في المحلول المائي دالته الحامضية النهائية 4.1 والخالي من المحلول المنظم.

ثانياً حضـــرت محاليل منظمة مختلفة بدالة حامضـــية مقدارها 4.0 ودرس تأثير اضـــافة 1.0 مللتر كلاً منها على حدى على قيم ΔF بالمقارنة مع قيمتها في المحلول المائي. وقد اثبتت النتائج المستحصـــلة في الشكل 3 التأثير السلبي للمحاليل المنظمة على حساسية الطريقة, لذا استبعدت في التجارب اللاحقة واعتمد المحلول المائي وسطاً مناسباً لتقدير الاينوكسابارين صوديوم وباعلى قيمة لـΔF.




**الشكل 3: تأثير المحاليل المنظمة بدالة حامضية 4 في تقدير الاينوكسابارين صوديوم**

**تأثير درجة الحرارة في زمن التفاعل واستقرارية صبغة الاكريفلافين**

أجريت هذه الدراســـــة لبيان تأثير درجات حرارية مختلفة (5-55° م) في زمن التفاعل وتكوين معقد التجمع الايوني بين الاينوكسـاباربن ومحلول صـــبغة الاكريفلافين وذلك من خلال تحديد زمن اخماد شـدة تفلور الصـــبغة, إذ اظهرت النتائج المدرجة في الجدول 2 إن إخماد شدة تفلورها يحدث مباشرة بعد اضـافة المركب الدوائي اليها وان اعلى قيمة لـــــ ΔF تم الحصـول عليها بعد 5 دقائق من حدوث التفاعل عند درجة حرارة المختبر (23±2°م) وبزمن اســـتقرار لايقل عن 24 ســـاعة وعليه أخذت القياســـات في الدراسات اللاحقة بعد 5 دقائق من التخفيف الى حد العلامة.

**جدول 2: تاثير درجة الحرارة في زمن التفاعل واستقرارية صبغة الاكريفلافين**

| Temp (C°) | ΔF/ min standing time | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 120 | Over night |
| 5 | 318 | 318 | 320 | 320 | 317 | 317 | 318 | 312 | -- |
| R.T* | 625 | 625 | 624 | 624 | 625 | 623 | 623 | 623 | 619 |
| 35 | 598 | 598 | 597 | 596 | 596 | 596 | 593 | 593 | -- |
| 45 | 553 | 558 | 558 | 557 | 558 | 558 | 556 | 556 | -- |
| 55 | 493 | 494 | 493 | 490 | 490 | 489 | 489 | 488 | -- |

*RT=23±2 ºC

**تأثير المواد الفعالة سطحيا**

ان الهدف من هذه الدراسة بيان مدى تأثيرها على شدة تفلور صبغة الاكريفلافين وقيم ΔF وذلك باضافة 1.0 مللتر من المواد الفعالة سطحياً كلاً على انفراد. فقد تبين من نتائج الجدول 3 ان المواد الفعالة سطحياً الموجبة (CPC و CTAB) والسالبة (SDS) لها تأثير سلبي كبير على قيم ΔF ويعود السبب الى تأينها وحدوث تجاذب (Interaction) مع المركب الدوائي ذا الشحنة السالبية العالية او مع الصبغة الكاتيونية مما يؤدي الى عدم تكوين معقد التجمع الايوني بين المركب الدوائي وصبغة الاكريفلافين[20,19] وبالتالي لايحدث انخفاض ملحوظ في شدة تفلور الصبغة عندئذ تكون قيم ΔF منخفضة جداً, في حين يكون تأثير المواد الفعالة سطحياً المتعادلة على الـ ΔF اقل اذ كان الانخفاض في قيمتها بنسب تراوحت بين 14.97 و 29.62% بالمقارنة مع القيمة 628, وعليه استبعدت المواد الفعالة سطحياً في التجارب اللاحقة.

**الجدول3: تاثير المواد الفعالة سطحيا في تقدير الاينوكسابارين صوديوم**

| Surfactant* | Enoxaparin sodium | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | λex(nm) | λem(nm) | F° | F | ΔF |
| SDS 0.1% | 403 | 510 | 980 | 973 | 7 |
| CTAB 0.1% | 403 | 505 | 971 | 960.7 | 10.3 |
| CPC 0.1% | 407 | 514 | 948 | 943.9 | 4.1 |
| Tween 80 0.1% | 402 | 503 | 935 | 401 | 534 |
| Tween 20 0.1% | 402 | 503 | 941 | 499 | 442 |
| Starch | 402 | 507 | 960 | 501 | 459 |
| With out | 402 | 506 | 968 | 340 | 628 |

* 1.0 ml of surfactant

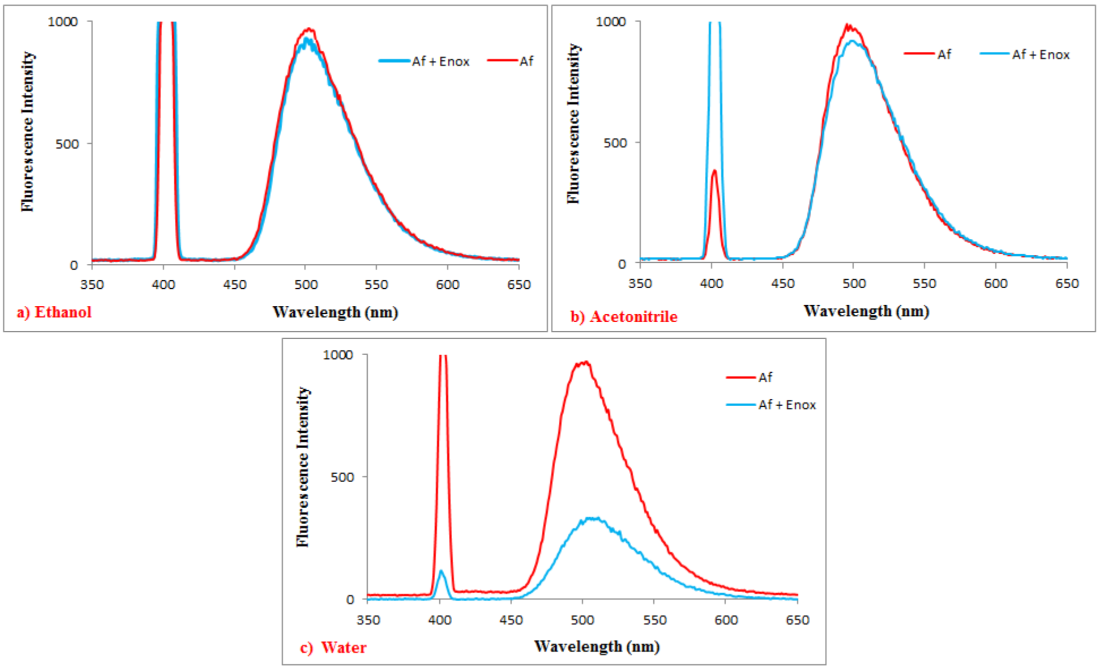
**تاثير المذيبات في شدة تفلور الاكريفلافين**

تمت دراسة تأثير مذيبات قطبية مختلفة في شدة تفلور صبغة الاكريفلافين وقيمة ΔF وذلك باضافة 1.0 مللتر من المذيب كلاً على حدة الى 18 مايكروغرام/مللتر من الاينوكسابارين صوديوم بوجود 1.7 مايكروغرام/مللتر من الصبغة والتخفيف بالماء المقطر الى حد العلامة, إذ تشير النتائج المبينة في الجدول 4 ان الماء المقطر يعد وسطاً مناسباً للتفاعل إذ اعطى اعلى قيمة لـ ΔF لان زيادة قطبية المذيب يؤدي الى نقصان شدة تفلور الصبغة (إخماد) بسبب حدوث انتقال الشحنة ضمن الجزيئة (Intramolecular charge transfer) بين مجموعة الامينو وحلقة البنزين[21] وهذا يجعل شدة تفلورها في الماء المقطر ضمن مدى جهاز التفلور فضلاً عن حدوث إخماد خطي عند اضافة كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي. في حين يظهر التأثير السلبي للمذيبات الاقل قطبية من الماء (على سبيل المثال الميثانول) على قيمة ΔF لحصول زيادة عالية في شدة تفلور الصبغة لوحدها او بوجود المركب الدوائي ويكون تفلورها خارج نطاق الجهاز عند التخفيف بالمذيبات الى حد العلامة, أو تكون قيمة ΔF واطئة عند اضافة 1.0 مللتر من المذيبات لاحتمالية عدم تكون المعقد, وعليه استبعدت المذيبات في الدراسات اللاحقة, الشكل4.

**الجدول4: تأثير المذيبات**

| Solvent* | Dielectric constant | λex(nm) | λem(nm) | ΔF |
|---|---|---|---|---|
| Ethanol | 24.55 | 402 | 495 | 26 |
| Methanol | 32.70 | 405 | 500 | 45 |
| DMF | 36.71 | 404 | 502 | 49 |
| Acetonitrile | 37.50 | 406 | 502 | 83 |
| DMSO | 46.70 | 408 | 500 | 86 |
| Water | 80.10 | 402 | 506 | 623 |

* 1.0 ml of solvent added




**الشكل 4: اطياف الاثارة والانبعاث لصبغة الاكريفلافين (1.7 مايكروغرام/مللتر) بوجود 18 مايكروغرام/مللتر من الاينوكسابارين صوديوم و 1.0 مللتر من المذيبات**

## القيم التحليلية الاحصائية للطريقة المقترحة

يبين الجدول 5 القيم التحليلية للمنحنى القياسي للاينوكسابارين صوديوم (الشكل 5)، فضلاً عن قيم حدود الكشف والتقدير الكمي التي تم حسابها بأخذ مكررات لاقل تركيز وقياس الانبعاث لها مقابل الماء المقطر وبتطبيق المعادلتين[22]:

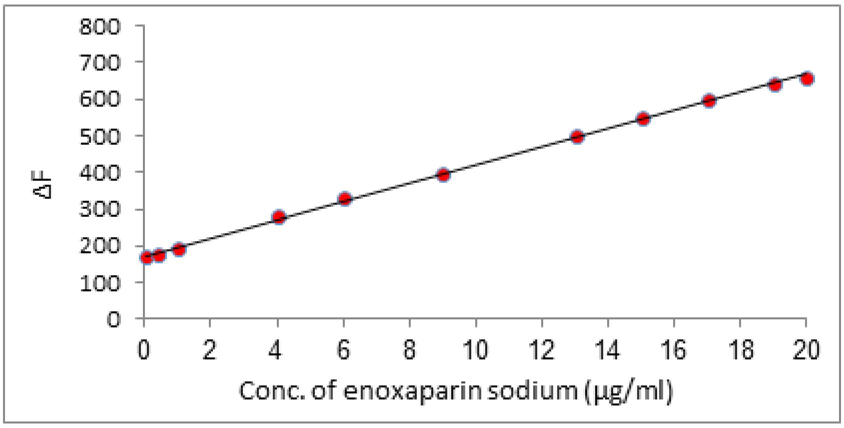
$$LOD = \frac{3\sigma C_{low}}{\bar{X}} \quad ، \quad LOQ = \frac{10\sigma C_{low}}{\bar{X}}$$

إذ ان:

$\sigma$: الانحراف القياسي النسبي لامتصاص اقل تركيز

$C_{low}$: اقل تركيز

X: معدل امتصاص اقل تركيز




**شكل 5: المنحنى القياسي لتقدير الاينوكساباربن صوديوم**

**جدول 5: القيم التحليلية للمعالجات الإحصائية للمنحنيات القياسية لتقدير الاينوكساباربن صوديوم**

| Parameters | Enoxaparin sodium |
|---|---|
| **Linearity (µg/ml)** | 0.05-20 |
| **Intercept** | 172.84 |
| **Slope** | 24.789 |
| **Correlation coefficient** | 0.999 |
| **Standard deviation of the intercept** | 3.094 |
| **Standard deviation of the slope** | 0.258 |
| **LOD* (µg/ml)** | 0.011 |
| **LOQ* (µg/ml)** | 0.037 |

*Average of ten determinations of $C_{low}$ of drug

**دقة الطريقة وتوافقها**

لمعرفة دقة الطريقة وتوافقها تم احتساب نسب الاسترجاع والانحراف القياسي لستة تراكيز مختلفة للاينوكساباربن صوديوم ضمن مدى المنحنى القياسي للتقدير. وقد استدل من نتائج الجدول 6 ان الطريقة ذات دقة جيدة وتوافق جيدين, إذ بلغ معدل نسبة الاسترجاع100.51% والانحراف القياسي النسبي اقل من 3.23%.

**الجدول 6: دقة الطريقة وتوافقها لتقدير الاينوكساپارين صوديوم**

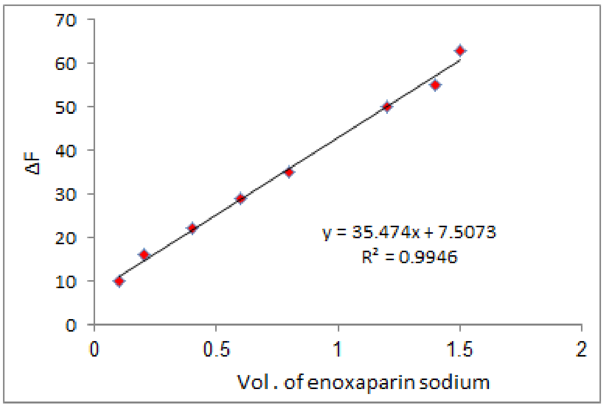
| Drug | Amount taken (µg/ml) | Recovery(%) | Average recovery(%) | RSD* (%) |
|---|---|---|---|---|
| Enoxaparin Sodium | 0.4 | 102.46 | 100.51 | 0.77 |
| | 1 | 97.46 | | 1.46 |
| | 4 | 103.03 | | 3.23 |
| | 8 | 99.42 | | 2.46 |
| | 13 | 101.52 | | 1.09 |
| | 19 | 99.18 | | 2.37 |

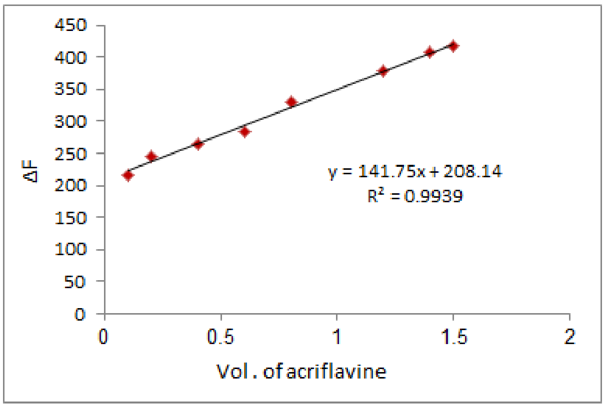
*Average of six determinations

**دراسة طبيعة معقد التجمع الايوني المتكون**

تم دراسة النسبة المولية التركيبية لمعقد التجمع الايوني المتكون بين الاينوكساپارين صوديوم وصبغة الاكريفلافين بتطبيق طريقة نسبة الميل, إذ تم تحضير منحنيين قياسيين من محلول المركب الدوائي والصبغة محضرين بتركيز $1\times10^{-5}$ مولاري لبقاس شدة التفلور عند 506 نانوميتر بطول موجة اثارة 402 نانوميتر حضر الاول باضافة حجم ثابت (4.0 مللتر) من محلول الصبغة الى حجوم متزايدة (0.1-1.5 مللتر) من المركب الدوائي.

والثاني تم اضافة حجوم متزايدة من محلول الصبغة (0.1-1.5 مللتر) الى حجم ثابت (4.0 مللتر) من المركب الدوائي. وتبين من الشكل (6) ونتائج قسمة ميل المنحنى الاول الى الثاني ان النسبة المولية للمعقد 4:1 (الاينوكساپارين: الاكريفلافين)

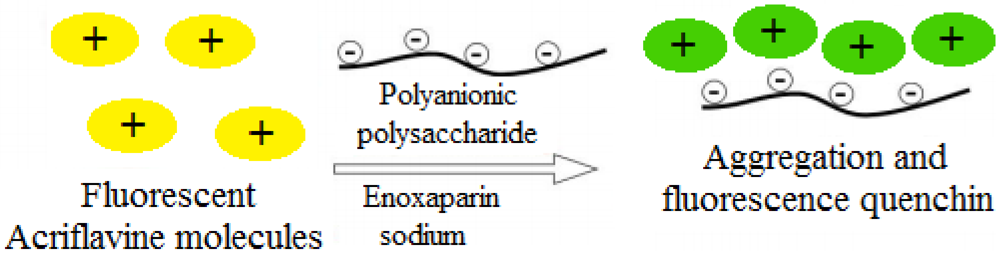



**الشكل 6: نسبة الميل لتكوين المعقد بين الاينوكساپارين صوديوم والاكريفلافين**

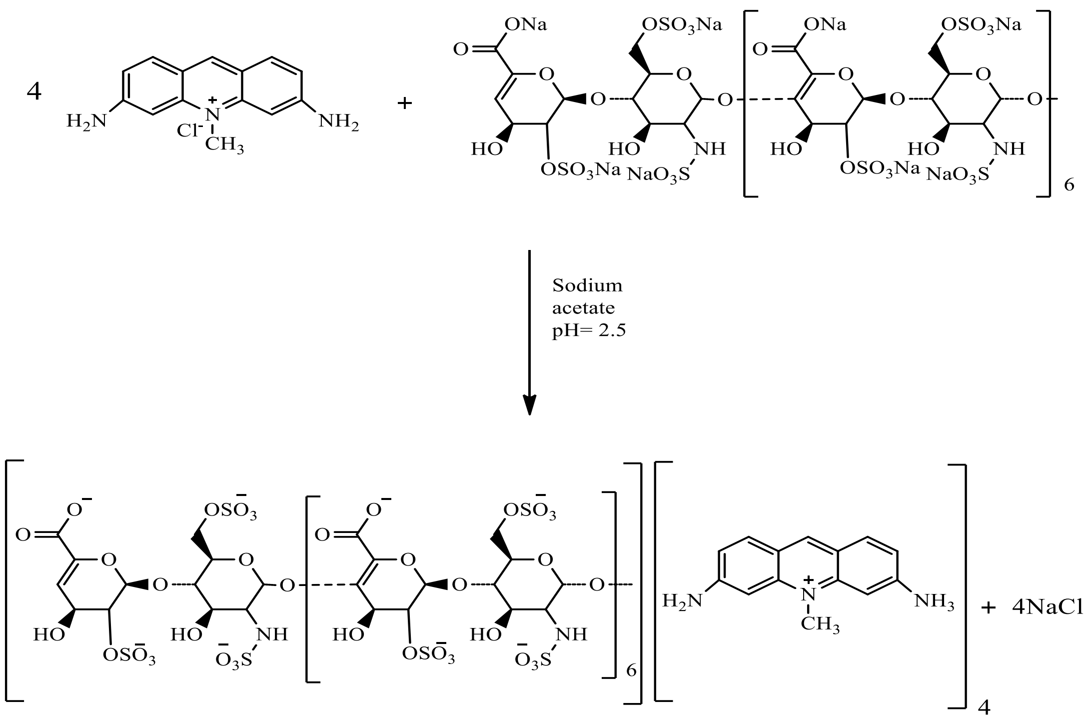
## التفاعل الكيميائي المقترح

يعد الاينوكساباربن من السكريات المتعددة لعائلة كليكوزامينوكليكان المتكونة من وحدات السكريات الثنائية التي تحتوي على مجاميع: واحدة نوع N− كبريتات واثنين نوع O− كبريتات ومجموعة كاربوكسيل ويحدث تأين لهذه المجاميع لذا يتواجد الاينوكساباربن بهيئة التكافؤ المتعدد الانيوني (Polyvalent state anionic) [19] وبكثافة سالبية عالية بوجود مجاميع $-OSO_3^-$ و $-NHSO_3^-$ و $-COO^-$ فيحدث تجاذب هيدروفوبي كاره للماء (Hydrophobic interaction) وترابط الكتروستاتيكي من خلال ثلاث مجاميع من الكبريتات ومجموعة الكاربوكسيل مع مجموعة امينو الثالثية لثلاث جزيئات من الاكريفلافين الموجبة الشحنة مكوناً معقد التجمع الايوني فائق الجزيئية المتعادل غير المتفلور[5] (مخطط 1) وبنسبة مولية 4:1 (الاينوكساباربن : الاكريفلافين).




**مخطط (1)**

وبالاعتماد على نسبة الميل المستحصل عليها ادناه التفاعل الكيميائي المقترح لتكوين معقد التجمع الايوني (مخطط 2).




**مخطط (2) التفاعل الكيميائي المقترح لتكوين معقد التجمع الايوني**

### تأثير المتداخلات

قبل تطبيق الطريقة على مستحضر الاينوكسابارين صوديوم وعلى السوائل الحيوية مستقبلاً, يجب التأكد من انتقائية الطريقة الفلورومترية وذلك بدراسة تأثير السكريات والاملاح والاحماض الامينية والبروتينات والايونات الفلزية وذلك باضافة زيادة من هذه المواد انفرادياً الى 180 مايكروغرام/10 مللتر من الاينوكسابارين صوديوم. وقد تبين من النتائج المستحصلة في الجدول 7 عدم حدوث تداخل يمكن ان تحدثه الجزيئات المتواجدة في السوائل والعينات الحيوية وهذا يعني امكانية تطبيق الطريقة في التحليلات الروتينية.

**الجدول 7: تأثير المتداخلات في تقدير الاينوكسابارين صوديوم**

| Foreign compound | Recovery (%) of 180 µg enoxaparin per µg of foreign compound added | | |
|---|---|---|---|
| | 100 | 250 | 500 |
| Glucose | 101.30 | 101.71 | 102.37 |
| Fructose | 98.57 | 101.30 | 102.70 |
| Lactose | 99.07 | 99.48 | 100.19 |
| Sucrose | 100.97 | 101.24 | 101.89 |
| Glysine | 96.57 | 98.84 | 100.06 |
| Cystine | 99.61 | 101.41 | 102.23 |
| Cysteine | 101.61 | 102.16 | 102.54 |
| Albumin | 101.17 | 102.67 | 104.60 |
| L-glutamic acid | 100.82 | 101.46 | 101.93 |
| L-glutamin | 101.72 | 102.31 | 102.71 |
| L-theronine | 98.78 | 99.64 | 100.07 |
| Pepsin | 102.18 | 102.63 | 103.03 |
| Dopamine | 97.41 | 99.17 | 99.83 |
| Adrenaline | 103.69 | 104.29 | 104.72 |
| NaCl | 102.17 | 104.03 | 104.84 |
| KCl | 101.18 | 102.63 | 103.74 |
| $MgSO_4$ | 100.04 | 100.79 | 102.10 |
| $ZnSO_4.6H_2O$ | 97.37 | 98.22 | 99.59 |

**تطبيق الطريقة المطورة في تقدير الاينوكسابارين صوديوم على الحقن الدوائية**

تم تطبيق الطريقة الطيفية المقترحة لتقدير المركب الدوائي قيد الدراسة على مستحضراته الصيدلانية ومن مناشئ مختلفة ودونت النتائج في الجدول 8 ويلاحظ الدقة العالية للطريقة المقترحة واتفاقها على نحو جيد مع المحتوى الأصيل للمركب الدوائي في مستحضراته الصيدلانية.

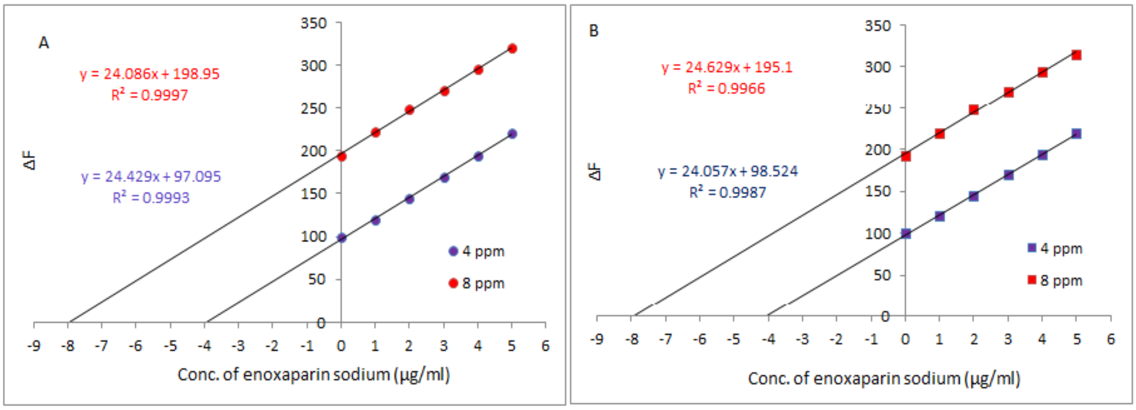
**الجدول 8: تقدير الاينوكسابارين صوديوم في الحقن الدوائية**

| Pharmaceutical preparation | Certified value (mg) | Amount taken (µg/ml) | Drug content found (mg) | Recovery* (%) | Average recovery (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Clexane 4000anti-Xa IU/0.4ml | 40 | 1 | 40.81 | 102.03 | 100.18 |
| | | 4 | 39.40 | 98.50 | |
| | | 8 | 39.55 | 98.88 | |
| | | 14 | 40.37 | 100.93 | |
| | | 18 | 40.22 | 100.55 | |
| Enox 6000 anti-Xa IU/0.6ml | 60 | 1 | 59.91 | 99.85 | 100.99 |
| | | 4 | 62.85 | 104.75 | |
| | | 8 | 59.85 | 99.75 | |
| | | 14 | 60.72 | 101.20 | |
| | | 18 | 59.63 | 99.38 | |

*Average of four determinations

**المقارنة مع طريقة الاضافة القياسية**

لاثبات كفاءة الطريقة المقترحة وللتأكد من خلوها من المضافات و لعدم توفر اجهزة ومتطلبات الطريقة القياسية المذكورة في دستور الادوية البريطاني[23], فقد تم تطبيق طريقة الاضافة القياسية على الحقن الدوائية للاينوكسابارين صوديوم اذ بينت النتائج الموضحة في الشكل7 والجدول9 ان طريقة الاضافة القياسية متفقة بشكل جيد مع الطريقة المطورة المقترحة ضمن المدى المقبول للخطأ (±5%) مما يدل على ان الطريقة ذات انتقائية بشكل مرض.




**شكل 7: منحنيات الاضافة القياسية لتقدير الاينوكسابارين صوديوم A: كليكسان– فرنسي المنشأ**

**B: اينوكس– تركي المنشأ**

**الجدول 9: مقارنة الطريقة المقترحة لتقدير الاينوكسابارين صوديوم في الحقن الدوائية مع طريقة الاضافة القياسية**

| Pharmaceutical preparation | Certified value (mg) | Amount taken (µg/ml) | Drug content found (mg) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Present method* | Standard addition procedure |
| Clexane 4000anti-Xa IU/0.4ml France | 40 | 4 | 39.40 | 39.75 |
| | | 8 | 39.55 | 41.30 |
| Enox 6000 anti-Xa IU/0.6ml Turkey | 60 | 4 | 62.85 | 61.43 |
| | | 8 | 59.85 | 59.41 |

*Average of four determinations

## الاستنتاجات

أقترحت طريقة تفلورية غير مباشرة سريعة وحساسة وانتقائية لتقدير الاينوكسابارين صوديوم من خلال تكوينه معقد المزدوج الأيوني الفائق الجزيئية مع الاكريفلافين بوصفه صبغة تفلورية في المحلول المائي وبدرجة حرارة الغرفة والذي يؤدي الى اخماد كمي لتفلور الصبغة ودون الحاجة الى الاستخلاص، وتم تطبيق الطريقة على المستحضرات الصيدلانية للمركب المدروس بنجاح بدقة وتوفق جيدين ونتائج متفقة احصائياً مع طريقة الإضافة القياسية والمحتوى الأصيل للحقن الدوائية وبدون تداخل مما يجعل امكانية استعمال الطريقة في التحليلات الروتينية لتقدير الاينوكسابارين في السوائل الحيوية.

## المصادر


1. The United States Pharmacopoeia, (2007) 30th Revision, U. S. Pharmacopoeial Convention, Int., Rockville, MD.
2. Amold K. M., Capuzzi S. J. and Xu Y., *Pharmaceuticals*, *10*, 1-15. (2017).
3. Costa R., Ferreira I. and Pedroso A., Eur. J. Case Rep. Intern. Med., 5, 1-4. (2018).
4. Gavrilenko M. A. and Gavrilenko N. A., Mendeleev Commun, 27, 419-420. (2017).
5. Warttinger U., Giese C. and Krämer R., https://arxiv.org/abs/1712.03377. (2017).
6. Qin W., Zhang W. and Xiao K. P., Anal. Bioanal. Chem., 377, 929-936. (2003).
7. Sun W., Ding Y. and Wang Q., Electroanal., 18, 1114-1120. (2006).
8. Sadowski R., Gadzala- Kopciuch R. and Kowalkowski T., J. AOAC Int., 100, 1706-1714. (2017).
9. Zargar P., Ghani E., Mashayekhi F. J., Ramezani A. and Eftekhar E., Oncol. Lett., 15, 10084-10090. (2018).
10. Dana S., Dar A. and Dhar S. K., ACS Chem. Biol., 9, 2366-2373. (2014).
11. Jawad Y. M., Hamad H. T. and Al-Ragehey A. S. J. M., J. Coll. Basic Educ., 21, 197-204. (2015).
12. Duan Y., Sen B., Xie N., Paterson J. S., Chen Z. and Wang G., Microbes Environ., 33, 195-204. (2018).
13. Lateef S. M., Awad M. A. and Abdul Hameed H. H., J. Global Pharm. Tech., 10, 455-461. (2018).
14. Lee C. J., Yue C. H., Lin Y. J., Lin Y. Y., Kao S. H., liu J. Y. and Chen Y. H., Anticancer Res., 34, 6467-6472. (2014).
15. Qader A. F., and Fakhre N. A., 6th Int. Conf. Workshops Basic Appl. Sci., (2017).
16. Shenghui F., Jian L. and Shaopu L., Chem. Res. Appl., 22, 1170-1773. (In Chinese). (2010).
17. Ali L. I. A., Qader A. F., Salih M. I. and Aboul-Enein H. Y., Luminescence, 34, 168-174.(2019).
18. Perrin D. D. and Dempsey B., “Buffer for pH metal ion control”, Chapman and Hall Ltd., London, (1974), p. 128-139.
19. Sun W., Hang J-Y. and Jaio K., S. Afr. J. Chem., 60, 42-46.(2007)
20. Hui N., Sun W. and Ding Y-Q, J. Chinese Chem. Soc., 56, 271-278. (2009).
21. Jawad Y. M., Hamad H. T. and Al-Ragehey A. D. J. M., (2015), J. Coll. Basic Edu., 21, 198-204.(2015).
22. Ravisankar P., Navya C. N., Pravallika D. and Sri D. N., JOSRJ. Pharm., 5, 7-19 (2015).
23. British Pharmacopoeia, CD-ROM. London, The Stationery Office Ltd., Norwich NR3 1GN (2013).