

● مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره یازدهم، شماره ۳، ص ۱۶۲-۱۵۵، ۱۳۸۳

مقاله پژوهشی

## معرفی و تأیید روش تیتراسیون در محیط غیر مائی برای آنالیز اسید آزلائیک

دکتر پیام خزائی<sup>۱</sup> و دکتر ملیحه کرامتی<sup>۲</sup>

### خلاصه

امروزه آلفا هیدروکسی اسیدها به طور گسترده‌ای در کنترل و درمان ناراحتی‌های پوست به کار می‌روند. اسید آزلائیک یا Heptane-1,7-Dicarboxylic Acid، ماده‌ای طبیعی است که می‌تواند به صورت آندوژن از دی‌کربوکسیلیک اسیدهای زنجیره بلند، متابولیسم اسید اولئیک و امگا اکسیداسیون مونو کربوکسیلیک اسیدها بوجود آید. این ماده اثرات باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال بر علیه انواع گونه‌های هوازی و بی‌هوازی میکروارگانیسم‌های عامل آکنه نشان داده است. خواص مفید اسید آزلائیک باعث شده این ترکیب به صورت فرمولاسیون‌های مختلف دارویی عرضه شود. روش‌های آنالیز معرفی شده برای اندازه‌گیری اسید آزلائیک شامل روش‌هایی از قبیل HPLC و GC بوده که در مواردی چون اندازه‌گیری میزان این ترکیب در پلازما کاربرد دارند. البته با توجه به عدم وجود گروه کروموفور در ساختمان این ترکیب، در این روش‌های آنالیز نیز مراحل آماده‌سازی قبل از ستون بایستی صورت گیرد. اما در انجام فرمولاسیون‌های دارویی شاید استفاده از چنین روش‌های پرهزینه 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 اسید آزلائیک معرفی و پارامترهای تأیید متد آن بررسی شده است. در این روش پس از حل کردن آزلائیک اسید در دی‌متیل فرماید، تیتراسیون توسط متوکسیدسیم 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 اسید آزلائیک در فرآورده‌های دارویی می‌تواند با اطمینان به کار رود.

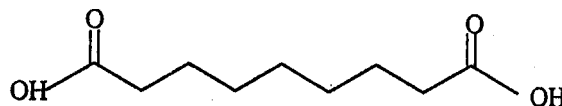
واژه‌های کلیدی: اسید آزلائیک، تیتراسیون در محیط غیر مائی، تأیید روش

۱- استادیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- دکتر داروساز

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

## مقدمه

اسید آزلائیک یا Nonandioic acid 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 امگا۱ اکسیداسیون مونو کربوکسیلیک اسیدها تولید شود. ثابت‌های اسیدی این ترکیب عبارتند از (۱۴):

$$K_{a1} = 2/951 \times 10^{-5}$$

$$K_{a2} = 4/677 \times 10^{-6}$$

از نظر ظاهری، این ترکیب به صورت کریستال‌های صفحه مانند یا سوزنی می‌باشد. اسید آزلائیک امروزه به عنوان یکی از عوامل مؤثر در درمان آکنه و لگاریس شناخته شده، به طوری که در اروپا از سال ۱۹۸۹ به صورت کرم ۲۰٪ وارد بازار دارویی شده است. اسید آزلائیک همچنین در درمان ملانوما بدخیم و حالات هایپرپیگماتاسیون از قبیل لنتیگویی 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 و لگاریس در سال ۱۹۹۵ تأیید شده است (۹).

روش‌های شناسایی و تعیین مقدار اسید آزلائیک

## HPLC-

HPLC یکی از روش‌های تجزیه اسید آزلائیک و اندازه‌گیری غلظت پلاسمایی آن می‌باشد. مرحله مشتق‌سازی قبل از انجام آنالیز کروماتوگرافی لازم است زیرا آنالیت (اسید آزلائیک) فاقد گروه کروموفور می‌باشد. مشتق‌سازی فلورسانس با استفاده از لوسین-کومارینیل آمید که برای مونو و دی‌کربوکسیلیک اسیدها به کار می‌رود، صورت می‌پذیرد (۱۲).

## GC-

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

## - تیتراسیون پتانسیومتریکی در محیط غیر آبی

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

## - تیتراسیون‌های 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 تیتراژ 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 تیتراژ کردن در حلال دیگری به غیر از آب تعیین کرد (۱). دو نوع ترکیبات را که در محیط آبی قابل تیتراژ کردن 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 اسید آزلائیک) متأسفانه به علت حلالیت ناچیز اسید آزلائیک در آب (۲/۴ گرم 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 تیتراسیون‌های 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 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). در تجربه عملی نگارندگان نیز عدم کارایی اتانول در این خصوص تأیید گردیده و لذا از حلال غیرمائی دی‌متیل‌فرمامید که اسید آزلائیک به خوبی در آن حل می‌شود و همچنین به عنوان یک حلال نسبتاً بازی،

(Limit of Detection: LOD)، حد تعیین کمی (Limit of Quantitation: L.O.Q) خطی بودن (Linearity)، انتخابی بودن (Selectivity)، اختصاصی بودن (Specificity)، سخت بودن (Ruggedness)، قوت (Robustness)، پایداری محلول‌های تجزیه‌ای (Stability)، میزان بازیابی (Recovery)، تعیین محدوده کاری غلظت (Working Concentration Range) و آزمایشات تناسب سیستم (System Suitability 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: اسید آزلائیک، دی‌متیل‌فرمامید، متانول، تولوئن، تیمول‌بلو، سدیم و اسید بنزوئیک که همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند، ترازوی الکترونیکی Sartorius مدل ASI20 با حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم ساخت آمریکا، هیتراسیتر 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 اسید آزلائیک، یک دی‌کربوکسیلیک اسید می‌باشد و با توجه به مطالعات انجام گرفته روش پیشنهادی برای آنالیز آزلائیک اسید، تیتراسیون در حلال نسبتاً بازی DMF توسط متوکسیدسیدیم می‌باشد.

### طرز تهیه محلول‌های مورد استفاده

#### محلول متوکسیدسیدیم

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 سرد کردن کنترل شده، با افزودن متانول و تولوئن حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و محلول تهیه‌شده در ظروف پیرکس یا پلی‌اتیلن نگهداری می‌شود (۶).

#### استاندارد کردن متوکسیدسیدیم

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

خواص اسیدی اسید آزلائیک را بهتر نمایان می‌سازد استفاده گردد.

### - کلیاتی در رابطه با تیتراسیون‌های غیرماتی

همه حلال‌هایی که جهت تیتراسیون اسیدها در 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<sub>2</sub> 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 به کار می‌رود. از سوی دیگر متوکسیدسیدیم، پتاسیم یا لیتیم در محلول متانول - بنزن به عنوان تیترانت اسیدهای ضعیف کاربرد دارند. از عیوب آنها این است که متوکسیدسیدیم و پتاسیم در برخی از موارد سبب تشکیل رسوب ژله مانند 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 به کار 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 در گرو بررسی این نتایج توسط یک سری 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

اطمینان نمود که ماده مورد سنجش در سیستم پایدار باشد. بدین منظور یک نمونه باغلظت مشخص از اسید آزلائیک 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 ۱۰ ml 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 به دست آمده جهت رسم منحنی استاندارد نسبت به مقدار واقعی به صورت درصد بازیابی محاسبه گردید.

#### ۶- 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 اسید آزلائیک 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 تیرانت با نرمالیت معلوم ۲۴ بار تیتراژ شد.

#### ۷- بررسی محدوده خطی بودن

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

#### ۸- بررسی انتخابی بودن روش

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

### نتایج

#### ۱- رسم منحنی استاندارد

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

متوکسیدسدیم  $1 \text{ ml} \cdot 0.1 \text{ M} = 12.21 \text{ mg } \text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2$

محلول تیمول‌بلو

تیمول‌بلو یکی از شناساگرهای سولفون فتالین می‌باشد. دامنه تغییر رنگ آن در pH: ۶-۷ بوده و تغییر رنگ آن از زرد در محیط اسیدی به آبی در محیط 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 اسید آزلائیک 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 نرمالیت معین در حضور شناساگر تیمول‌بلو، هم‌زمان با تیتراسیون شاهد توسط بورت شیشه‌ای تیتراژ 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 تجزیه‌شونده 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 اسید آزلائیک در دو محدوده که در بخش رسم منحنی استاندارد به کار رفته‌اند، هر کدام پنج مرتبه با متوکسیدسدیم 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.

##### ۴- بررسی پایداری اسید آزلائیک در دی‌متیل‌فرماید

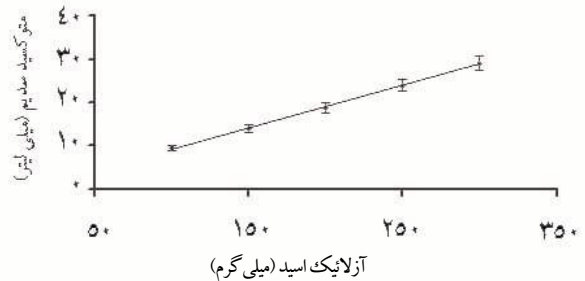
وقتی در یک روش آنالیز می‌توان به سیستم برگزیده شده

۲- بررسی دقت روش

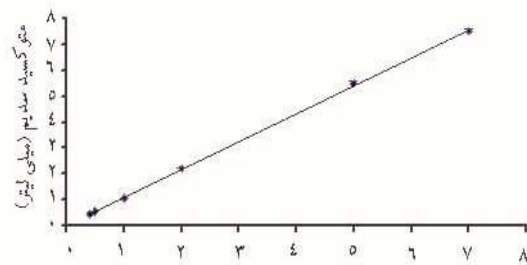
پس از انجام تیتراسیون در یک روز در مورد سه مقدار پایین، وسط و بالای منحنی استاندارد اسیدآزلائیک در دو محدوده که در بخش رسم منحنی استاندارد به کار رفته‌اند - هر کدام پنج مرتبه بامتو کسیدسیدیم - مقادیر SD و CV% برای حجم تیتراست مصرفی محاسبه گردید. نتایج این بررسی در جدول ۱ آمده است. مطابق این نتایج مشاهده 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.

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

$$1 \text{ MI Me-Na} (0/1 \text{ N}) \equiv 10/5915 \text{ mg AZA}$$



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



آزلائیک اسید (میلی گرم)

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

۳- بررسی صحت روش

نتایج محاسبه درصد خطا در جداول ۳ و ۴ آمده است. این نتایج نشان می‌دهند که در تمامی موارد درصد خطا کمتر از ۵٪ می‌باشد و این نشان‌دهنده صحت روش می‌باشد.

۴- بررسی پایداری اسیدآزلائیک در دی‌متیل‌فرماید

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

جدول ۱: حجم تیتراست مصرفی در تیتراسیون‌های متوالی مقادیر بالا از اسیدآزلائیک (AZA) جهت تأیید دقت روش (در یک روز)

CV%	SD	$\bar{X}$	$V_0$	$V_1$	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_5$	V
۱/۴۲۷	۰/۱۳۴۶	۹/۴۲۸	۹/۵۲	۹/۴۶	۹/۵۸	۹/۲۶	۹/۳۲	۱۰۰	AZA(mg)
۱/۲۸۱	۰/۲۳۷۶	۱۸/۵۴	۱۸/۴۴	۱۸/۳۰	۱۸/۳۰	۱۸/۸۸	۱۸/۷۴	۲۰۰	
۱/۵۸۶	۰/۴۵۸۴	۲۸/۹	۲۹/۳۴	۲۹/۱۲	۲۹/۲۲	۲۸/۵	۲۸/۳۲	۳۰۰	

$$Y = 0.9974C - 0.516 \quad R = 0.9993$$

جدول ۲: حجم تیتراست مصرفی در تیتراسیون‌های متوالی مقادیر پایین از اسیدآزلائیک جهت تأیید دقت روش (در یک روز)

CV%	SD	$\bar{X}$	$V_0$	$V_1$	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_5$	V
۳/۸۳	۰/۰۱۶۷	۰/۴۳۶	۰/۴۲	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۴	۰/۴۶	۰/۴	AZA(mg)
۲/۶۱	۰/۰۵۷۶	۲/۲۰	۲/۲۸	۲/۲۴	۲/۱۴	۲/۱۶	۲/۲۲	۲	
۱/۶۴	۰/۱۲۲	۷/۴۶	۷/۵	۷/۳۸	۷/۳۲	۷/۶۴	۷/۴۶	۷	

$$Y = 1.0613C + 0.398 \quad R = 0.9999$$

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

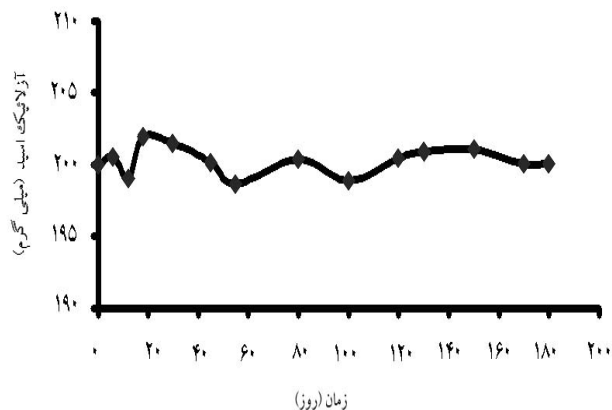
جدول ۴: نتایج حاصله از تعیین درصد خطا به منظور تأیید صحت روش (مقادیر پایین)

AZA(mg)	۰/۴	۰/۵	۱	۲	۵	۷
درصد خطا	-۲/۰	-۰/۲	۲/۶	-۲/۸	-۲/۰۶	۰/۳۲۸

### بحث و نتیجه‌گیری

روش‌های گزارش شده برای تعیین مقدار اسید آزلائیک شامل HPLC (۸) با کمک مشتق‌سازی فلورسانس با استفاده از I- لوسین - 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 اسید آزلائیک 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 همان‌طوری که 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. همان‌طوری که 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 چنددان واضح نیست ضمن آنکه رابطه خطی مناسبی بین مقدار اسید آزلائیک و مقدار تیترانته 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 تیتراسیون می‌شوند (۳). لذا ابتدا انتخاب سیستم، شرایط تیترانت، حلال و شناساگر در

این نتایج در نمودار ۳ آمده است. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود تغییر در میزان اسید آزلائیک 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 اسید آزلائیک در دی‌متیل‌فرماید 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  $5\% \pm 100\%$  قرار دارد.

### ۶- تعیین حد تشخیص و حد تعیین مقدار

پس از انجام تیتراسیون نمونه‌ها، با استفاده از منحنی استاندارد مقدار معادل اسید آزلائیک برای هر یک محاسبه و مقدار انحراف استاندارد (SD) تعیین شد ( $SD=0/0372$ ). ۳ برابر SD به عنوان LOD ( $LOD=0/111$ ) و ۱۰ برابر آن به عنوان LOQ ( $LOQ=0/372$ ) گزارش می‌شود.

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.

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: دی‌متیل‌فراماید (DMF) به عنوان حلال، متوکسیدسیدیم 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 ( $r=0/99989$ )، روش فوق می‌تواند به عنوان یک روش آنالیز مناسب، ارزشمند باشد. از این رو به منظور تأیید متد و ارزش‌گذاری این روش برای تعیین مقدار اسیدآزلائیک، پارامترهای صحت، دقت، پایداری، خطی بودن، 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

## Summary

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

Khazaeli P, PhD.<sup>1</sup> and Keramati M, Pharm D.<sup>2</sup>

1. Assistant Professor of Pharmaceutics, 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 occurring Alpha-hydroxy acid that can be formed endogenously from long-chain dicarboxylic 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. 4<sup>th</sup> 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. 3<sup>rd</sup> ed., New York, John Wiley & 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. 4<sup>th</sup> 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.