

T. C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
İSTANBUL

**BAZI ANALJEZİK İLAÇ MADDELERİNİN
YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE
MİKTAR TAYİNLERİ**

**DETERMINATION OF SOME ANALGESIC DRUGS
BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ünal YARS* ve H. Neşe DOĞAN*

SUMMARY

In this study, a new high pressure liquid chromatography procedure was developed for analysis of mefenamic acid and its capsules.

A reversed phase μ -bondopak C₁₈ column as a stationer phase and a methanol-water solution as a mobil phase were used.

The results were obtained by using an electronic integrator. This method is accurate; fast and economic.

ÖZET

Bu çalışmada, mefenamik asit ve kapsüllerinde yüksek basınçlı sıvı kromatografi işlemi yardımıyla yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

Bir zıt faz μ -bondopak C₁₈ kolon ve metanol-su mobil fazı kullanılmıştır.

Sonuçlar elektronik bir integratör yardımı ile elde edilmiştir. Bu metod doğru, hızlı ve ekonomiktir.

GİRİŞ

Analjezik ilaçlar günümüzde kullanım alanı ve sıklığı bakımından en ön sırayı teşkil eden guruplardan birisidir. Bu bakımdan hassas, güvenilir ve süratli tayin metodlarına ihtiyaç vardır.

* M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Nişantası, İSTANBUL.

Mefenamik asidin kalitatif ve kantitatif analizi amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bir kısmı mefenamik asidi etken madde ve farmasötik şekillerinde, bir kısmı ise biyolojik sıvılarda incelemiştir. Bu amaçla titrimetrik (1), fluormetrik (2, 3), polarografik (4, 5), spektrofotometrik (6, 7, 8, 9, 10, 11) yöntemler, ince tabaka kromatografisi (12, 13, 14, 15), gaz kromatografisi (16, 17, 18), iyon çifti kromatografisi (19) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (20, 21, 22, 23, 24, 25) yöntemleri ile teşhis ve miktar tayinleri yapılmıştır.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile etken maddede mefenamik asidin tayini daha çok kalitatif olup, bu çalışmalarda değişik mobil faz, internal standart, kolon kullanılarak değişik çalışma koşullarında mefenamik asit ayrılmış ve retensiyon zamanları verilmiştir (20, 21, 22).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle mefenamik asidin etken madde ve preparatlarında miktar tayini çok az çalışılmış bir konu olup, henüz farmakopelere geçmemiştir.

Bu çalışmada yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı kullanılarak, analjezik etkili mefenamik asidin ham madde ve katı bir farmasötik şekil olan kapsüllerinde miktar tayini için yeni bir yöntem araştırılmıştır.

Y Ö N T E M

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler: Mefenamik asit R. S. Nobel İlaç Fabrikasından temin edilmiştir. İnternal standart olarak p-aminobenzoik asit R. S. kullanılmıştır. Standart maddeleri ve farmasötik preparatları çözmek, ekstre etmek, mobil fazı hazırlamak amacıyla metanol (E. Merck) kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda kullanılan bidistle su 24 saatten eski değildir.

Çalışmada mobil faz olarak 70:30 (v/v) ve 65:35 (v/v) oranında metanol-su karışımı kullanılmıştır. Referans standart çözeltisi hazırlamak için mefenamik asit saf metanolde, internal standart çözeltisi hazırlamak için ise p-aminobenzoik asit 50:50 (v/v) oranındaki metanol-su karışımında çözülmüştür. Bütün çözeltiler kullanılmadan önce 0.5 µm membran filtrelerden (Millipore HF) süzölmüş ve ultrasonik banyoda gazlarından arındırılmıştır.

Kromatografik Koşullar: Model 510 HPLC Cihazı (Waters) ile mobil fazın akış hızı etken madde miktar tayininde 1 ml/dak.,

kapsüllerin miktar tayininde 0.8 ml/dak. olarak ayarlanmış olup, bu hızlarda pompa basıncı 3000-3800 psi arasında tutulmuştur. Çalışmalarda U6K enjektör (Waters) kullanılmış, teşhis değişebilir dalga boylu UV spektrofotometre (Waters 481) ile 290 nm-de gerçekleştirilmiştir. Cihazın duyarlılık derecesi (Aufs) 0.1'de tutulmuştur. Programlanabilen sistem kontrol edicisi (Waters Model 530 Data Modül) yardımı ile pikler kaydedilerek, sonuçlar otomatik olarak elde edilmiştir. Kaydedicinin kâğıt hızı 2 cm/dak.'dır.

Etken madde miktar tayininde 0,00200 ilâ 0,01800 mg/ml. arasında mefenamik asit içeren dokuz farklı konsantrasyonun her biri için Hamilton enjektörü ile 30 µl injeksiyon yapılmıştır. Her bir konsantrasyon 0.00320 mg/ml. konsantrasyonunda p-amino-benzoik asit internal standardı içerir. Tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1 : Etken madde miktar tayininde elde edilen sonuçlar.

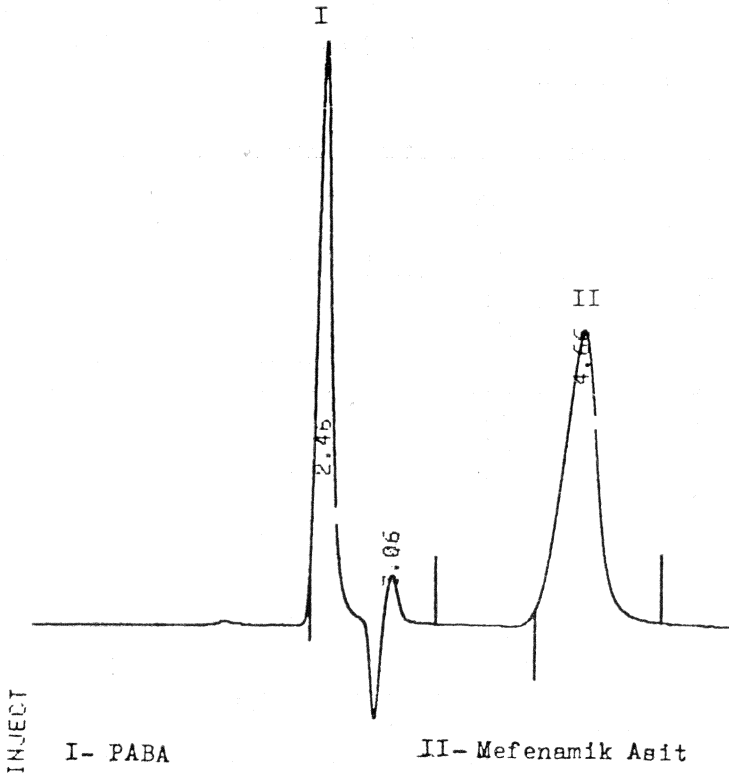
numarası İnjeksiyon	İnternal st. kons. (mg/ml)	Bulunan mefenamik a. kons. (mg/ml)	Hesaplanan mefenamik a. kons. (mg/ml)
1	0.00320	0.00200	0.00214
2	0.00320	0.00400	0.00401
3	0.00320	0.00600	0.00576
4	0.00320	0.00800	0.00794
5	0.00320	0.01000	0.00998
6	0.00320	0.01200	0.01179
7	0.00320	0.01400	0.01473
8	0.00320	0.01600	0.01575
9	0.00320	0.01800	0.01884

Yöntemin geçerliliğinin değerlendirilmesi amacıyla 0.00400 mg/ml.'lik konsantrasyon on kez injekte edilmiş ve standart sapma $s=1.5889 \times 10^{-4}$ bulunmuştur. Gerçek konsantrasyon değerinin güven aralığı sınırları %95 olasılıkla 0.00416—0.00394 mg/ml. arasındadır. Etken madde miktar tayininden elde edilen sonuçlar en küçük kareler metoduna göre değerlendirilmiştir (26). Preparatta miktar tayini yaparken bu grafikten yararlanılmıştır.

Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması: Yöntem 250 mg mefenamik asit ihtiva eden kapsüllere uygulanmıştır.

M₁ kapsülleri için 12 adet, M₂ kapsülleri için de 20 adet kapsül içeriği boşaltılarak tartılmış ve porselen bir havanda iyice karış-

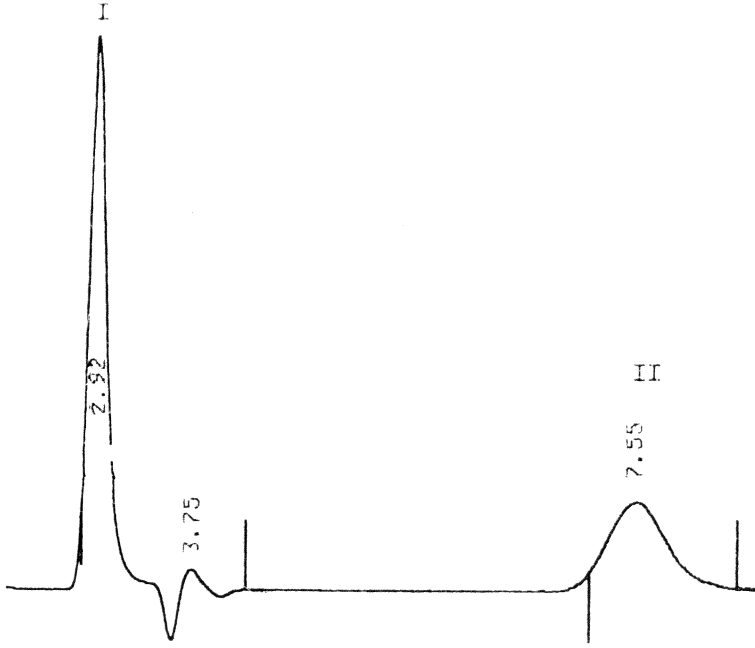
tırılmıştır. 25 mg. etken maddeye eşdeğer olan miktar tartılarak bir santrifüj tübüne aktarılmıştır. 5-er ml.'lik metanollerle üçer kez ekstraksiyon yapıp berrak kısımlar toplanmış, metanol ile belli hacme tamamlanmış, 0.45 μ m (HV tip organik) filtre ile kapaklı bir tübe süzölmüştür. 0.00320 mg/ml. konsantrasyonunda internal standart içerecek şekilde hazırlanan üç farklı çözeltilerden 30 μ l-lik injeksiyonlar yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak bir adet kapsüldeki etken madde miktarı hesaplanmıştır. Bu denemeler M_1 ve M_2 kapsülleri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.*



Şekil — 1 : 4 nolu injeksiyonun kromatogramı.

* M_1 kapsülleri : 250 mg. Mefenamik asit içeren Mart 1986 üretim tarihli kapsüller.

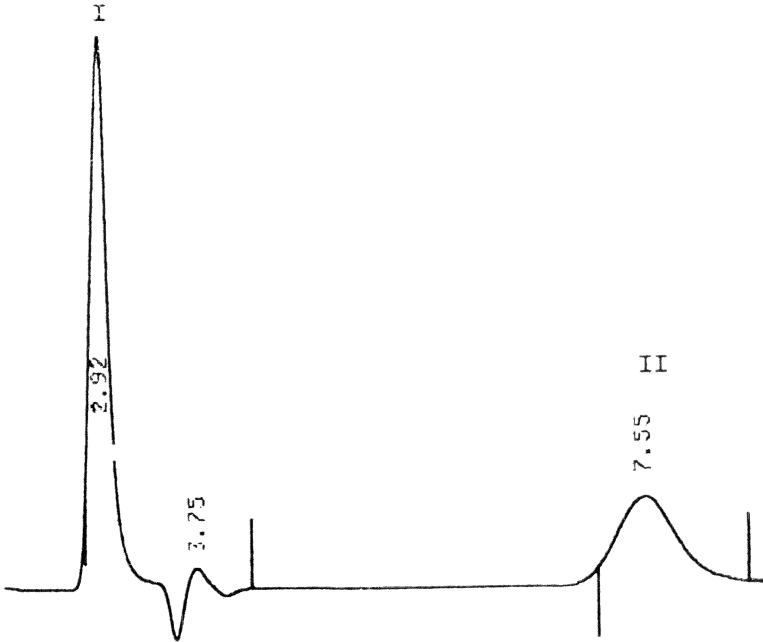
M_2 kapsülleri : 250 mg. Mefenamik asit içeren Ağustos 1986 üretim tarihli kapsüller.



I- PABA

II-Mefenamik Asit

Şekil 2 : M₁ kapsüllerinden alınan bir kromatogram.



I- PABA

II-Mefenamik Asit

Şekil 3 : M₂ kapsüllerinden alınan bir kromatogram.

Tablo 2 ve 3'de gösterilen sonuçların ortalaması alınarak bir adet M_1 kapsülündeki etken madde miktarı 245.18 mg (%98.07) ve bir adet M_2 kapsülündeki etken madde miktarı 249.14 mg (%99.66) bulunmuştur.

Tablo 2 : M_1 kapsüllerinden elde edilen sonuçlar.

Hesaplanan kons. (mg/ml)	Bulunan kons. (mg/ml)	Hesaplanan mik. etken mad. (mg)	Bulunan etken mad. mik. (mg)	% saflık	250 mg'lık kapsüldeki etken mad. mik. (mg)
0.00397	0.00397	24.37	24.19	37.26	243.16
0.00400	0.00402	25.02	24.44	97.68	244.20
0.00796	0.00813	24.87	24.69	99.28	248.19

Tablo 3 : M_2 kapsüllerinden elde edilen sonuçlar.

Hesaplanan kons. (mg/ml)	Bulunan kons. (mg/ml)	Hesaplanan etken mad. mik. (mg)	Bulunan etken mad. mik. (mg)	% saflık	250 mg'lık kapsüldeki etken mad. mik. (mg)
0.00401	0.00406	25.09	24.62	97.26	243.16
0.00397	0.00408	24.86	24.81	99.80	249.50
0.00795	0.00826	24.86	25.12	101.05	252.61

Tüm sonuçlar farmakopede gösterilen %92.5—107.5 limitlerine uygundur (27).

SONUÇ

Bu çalışmada, HPLC cihazı kullanılarak mefenamik asidin etken madde ve kapsüllerinde miktar tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Kullandığımız yöntem sıvı-sıvı kromatografisi esasına dayanmaktadır. Stasyonier faz olarak μ -bondopak C_{18} kolon, mobil faz olarak da 70:30 (v/v) ve 65:35 (v/v) oranında metanol-su çözücü sistemi kullanılmıştır.

Pik alanlarının mukayesesi esasına göre ölçüm yapan elektronik bir integratör yardımı ile elde edilen sonuçlardan miktar tayinine geçilmiştir. Sonuçlar farmakope standartlarına uygundur.

HPLC ile mefenamik asidin etken madde ve preparatlarında miktar tayini çok az çalışılmış bir konu olup, henüz farmakopelere geçmemiştir. p-Aminobenzoik asit, mefenamik asit ile yakın maksimum absorpsiyon göstermesi ve benzer yapıda olması nede-

niyle internal standart olarak ilk defa bu araştırmada kullanılmıştır.

Yöntem minimum miktarda kimyasal madde ve çözelti gerektirdiğinden oldukça ekonomik olup, sonuçlar çok kısa bir sürede ve hassas bir şekilde elde edilmektedir.

Bu koşullar altında Mefenamik Asidin retensiyon zamanı 4,25-5 dakika arasında değişmektedir. Elde edilen kromatogramlardan bir tanesi Şekil-2'de görülmektedir.

Tablo 2 ve 3'de gösterilen sonuçların ortalaması alınarak bir adet M₁ kapsülündeki etken madde miktarı 245.18 mg (%98.07) ve bir adet M₂ kapsülündeki etken madde miktarı 249.14 mg (%99.66) bulunmuştur.

Tüm sonuçlar farmakopede gösterilen %92.5—107.5 limitlerine uygundur (27).

KAYNAKLAR

1. AGRAWAL, Y.K. : *Sci. Cult.*, **46** (8), 309-311 (1980); *C.A.*, **94**, 109394y (1981).
2. MILLER, J.N., PHILLIPPS, D.L., BURNS, D.T., BRIDGES, J.W. : *Talanta*, **25** (1), 46-49 (1978).
3. KHABAROV, A.A., POVALYAEVA, L.I., VAISTUKH, S.I. : **USSR 828, 083**, May 7, 1981; *Otkrytiya Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki*, **17**, 191 (1981); *C.A.*, **95**, 72818g (1981).
4. VDOVIKO, E.A., PRYAKHIN, O.R., POKHMELKINA, S.A., GOLOVKIN, V.A. : **USSR. 783, 675**, Nov. 30, 1980; *Otkrytiya Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki*, **44**, 178 (19807; *C.A.*, **94**, 162840s (1981).
5. PRYAKHIN, O.R., VDOVIKO, E.A., POKHMELKINA, S.A., PETRENKO, V.V., GOLOVKIN, V.A. : *Khim.-Farm. Zh.*, **15** (12), 93-96 (1981); *C.A.*, **96**, 110227u (1982).
6. VINNIKOVA, A.V. : *Farm. Zh.*, **3**, 74-75 (1979); *C.A.*, **91**, 129095t (1979).
7. VINNIKOVA, A.V. : *Farm. Zh.*, **1**, 32-36 (1980); *C.A.*, **92**, 157451v (1980).
8. SALMAN, S., BAYRAKDAR, N. : *Eczacılık Bul.*, **25** (2), 30-33 (1983).
9. TAKITANI, S., SUZUKI, M., YUASA, E. : *Iyakuhi Kenkyu*, **15** (4), 660-664 (1984); *C.A.*, **101**, 235679w (1984)).
10. ISSA, A.S., BELTAGY, Y.A., KASSEM, M.G., DAABEES, H.G. : *Talanta*, **32** (3), 209-211 (1985).
11. HASSAN, M., SHAABAN, S.A.M. : *Pharmazie*, **39**, 691-693 (1984).
12. THOMPSON, R.D., JOHNSON, G.L. : *J. Chromatogr.*, **88**, 361-363 (1974).

13. DEMETRIOU, B., OSBORNE, B.G.: *J. Chromatogr.*, **90**, 405-407 (1974).
14. NOYANALPAN, N., ATAY, O., ÖZDEN, S.: *Ankara Ecz. Fak. Mec.*, **8**, 80-89 (1978).
15. CAVAZZUTTI, G., GAGLIARDI, L., AMATO, A., PROFILI, M., ZACARESE, V., TANELLI, D., GATTAVECCHIA, E.: *J. Chromatogr.*, **268**, 528-534 (1983).
16. DUSCI, L.J., HACKETT, L.P.: *J. Chromatogr.*, **161**, 340-342 (1978).
17. ROSEBOOM, H., HULSHOFF, A.: *J. Chromatogr.*, **173**, 65-74 (1979).
18. DELBEKE, F.T., DEBACKERE, M., DESMET, N.: *Chromatographia*, **17** (7), 381-386 (1983); *C.A.*, **99**, 134880q (1983).
19. ADAMS, W.M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66** (5), 1178-1181 (1983); *C.A.*, **99**, 164109n (1983).
20. BAKER, J.K., FIFER, E.K.: *J. Pharm. Sci.*, **69**, 590-592 (1980).
21. EJİMA, A., TATSUZAWA, R.: *Iyakuhia Kenkyu*, **15** (1), 113-117 (1984); *C.A.*, **100**.
22. MATSUSHIMA, Y., NAGATA, Y., NIYOMURA, M., TAKAKUSAGI, K., TAKAI, N.: *J. Chromatogr.*, **332**, 269-273 (1985).
23. DUSCI, L.J., HACKETT, L.P.: *J. Chromatogr.*, **172**, 516-519 (1979).
24. PRESCOTT, L.F., KING, I.S., BROWN, L., BALALI, M., ADRIAENSSENS, P.I.: *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **16** (10) 300-302 (1979); *C.A.*, **92**, 69164y (1980).
25. LIN, C.K., LEE, C.S., PERRIN, J.H.: *J. Pharm. Sci.*, **69**, 95-97 (1980).
26. BRAUN, R.D.: *Introduction to Chemical Analysis*. (International Student Edition), (1983).
27. *British Pharmacopoeia*, **2**, 536 (1980).

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK DERGİSİ

(Received June 20, 1987)