

**ASKORBİK ASİT-ASETİLSALİSİLİK ASİT İÇEREN EFERVESAN
TABLETLERDE ABSORBANS ORANLARI YÖNTEMİ İLE
SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

**SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF EFFERVESCENT TABLETS
CONTAINING ASCORBIC ACID AND ACETYLSALICYLIC ACID BY
ABSORBANCE RATIO METHOD**

Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

SUMMARY

Absorbance ratio method was applied to the analysis of tablets containing ascorbic acid (AA) and acetylsalicylic acid (ASA) without prior separation. In the spectra of the AA and ASA solutions in 0.1 N H₂SO₄ an isosbestic point occurred at 233.8 nm. For calculations, as the second wavelength, 243.3 nm, at which the AA shows maximum absorbance was used. A plot of $Q = A_{243.3}/A_{233.8}$ versus the fraction of AA in the mixture, resulted in a straight line ($Q_1 = 8.72 \cdot 10^{-3} \%AA + 0.379$). Absolute concentrations of AA and ASA were calculated from the parameters of m and n and the absorptivity at 233.8 nm (23.3 23). The relative standard deviations obtained were 1.15% and 0.71% and the average percentage recoveries were 101.1% and 99.4% for AA and ASA, respectively.

The same procedure has been carried out using 228.5 nm, as the maximum absorbance wavelength of ASA, instead of 243.3 nm ($Q_2 = 3.54 \cdot 10^{-3} \%ASA + 0.773$). The relative standard deviations obtained were 1.41% and 0.84% and the average percentage recoveries were 99.7% and 100.2% for AA and ASA, respectively.

To compare the results, the tablets were analyzed with the methods suggested for AA and ASA in USP XXI. The statistical comparison of the results using t and F tests shows that, the differences were not significant at the 95% confidence level.

KEY WORDS: Ascorbic acid-Acetylsalicylic acid determination, absorbance ratio method.

ÖZET

Askorbik asit (AA) - asetilsalisilik asit (ASA) içeren tabletlerde bu ilaç etken maddelerinin birarada analizi herhangi bir ayırma işlemi uygulanmadan absorbanis oranları yöntemi ile yapıldı. AA ve ASA'in 0.1 N H₂SO₄'deki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumlarında izosbestik dal-

ga boyu 233.8 nm olarak saptandı. Hesaplamalar için ikinci dalga boyu olarak AA'in maksimum absorbands gösterdiği 243.3 nm alındı. Karışımların bu iki dalga boyundaki absorbandslarının oranı karışımdaki AA oranına karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen $Q_1 = 8.72 \cdot 10^{-3} \%AA + 0.379$ denkleminin m ve n parametrelerinden ve 233.8 nm'deki absorptivite değerinden (23.35 0.23) AA ve ASA'in reel konsantrasyonları hesaplandı. Sırası ile AA ve ASA için bağıl standart sapma değerleri %1.15 ve %0.71, ortalama geri kazanma değerleri ise %101.1 ve %99.4 olarak bulundu.

Analiz ASA'in en yüksek absorbands gösterdiği dalga boylarından biri olan 228.5 nm kullanılarak tekrarlandı ($Q_2 = 3.54 \cdot 10^{-3} \%ASA + 0.773$). Sırası ile AA ve ASA'in bağıl standart sapma değerleri %1.41 ve %0.84 ortalama geri kazanma değerleri ise %99.7 ve %100.2 olarak bulundu.

Sonuçların kıyaslanması amacıyla tabletler USP XXII'de AA ve ASA için önerilen yöntemler ile de analiz edildi. Elde edilen sonuçlar t ve F testleri yardımıyla %95 güvenilirlik düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve farkın anlamsız olduğu görüldü.

ANAHTAR KELİMELELER: Askorbik asit - Asetilsalisilik asit tayini, absorbands oranları metodu.

GİRİŞ

AA-ASA karışımını içeren tabletlerde bu ilaç etken maddelerinin birarada tayini için türev spektrofotometrik (1), ekstraksiyon ile ayırma işleminden sonra UV-spektrofotometrik (2) ve dansitometrik (3) yöntemler kullanılmıştır.

Bu çalışmada AA-ASA içeren efervesan tabletlerin analizi için absorbands oranları yöntemi uygulanmıştır.

Absorbans oranları yönteminin teorisi matematiksel olarak ilk defa Pernarowski (4, 5) tarafından ortaya atılmıştır. Bu yöntemden yararlanılarak sülfonamid karışımlarında (6), hidroklorotiazid-spiroonolaktin (7), amidopirin-barbital (8), oksifenbutazon-analjin (9), aspirin-kafein (10), vitamin B₁-B₆ (11), isopropil fenazon-kafein (12), trimetopirim-sulfametoksazol (13) kombinasyonlarında miktar tayini yapılmıştır.

USP XXII, AA için 2.6 diklorofenolindofenol ile yapılan titrimetrik, ASA için ise UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemlerini önermektedir (14). AA-ASA karışımının analizi için farmakopede bir monografi verilmemiştir. Bu nedenle AA-ASA içeren efervesan tabletlerin analizinde mukayese yöntemi olarak USP'de önerilen bu iki yöntem kullanıldı. AA tayini için uygulanan yöntemden ASA ve ASA tayini için uygulanan yöntemden ise AA etkilenmemektedir.

MATERYAL VE METOD

Araç ve Gereçler

Spektrofotometre: Philips PU 8700 UV-Visible spektrofotometre

Çalkalama aleti: Nüve SL 350 çalkalayıcı

Maddeler

Bayer İlaç Sanayi A.Ş.'den farmasötik saflıkta AA ve ASA, Aspirin Plus C tabletler (400 mg ASA, 240 mg AA) temin edildi. Kullanılan diğer madde ve çözücüler analitik saflıktadır (Merck, Darmstadt, FRG).

Çözeltilerin hazırlanmasında KMnO_4 üzerinden taze distillenmiş su kullanıldı.

Spektrum çizim şartları

190-300 nm dalga boyu aralığı, 2 nm band genişliği, $250 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ tarama hızı

Standart çözeltiler

AA ve ASA'in 0.1 N H_2SO_4 'de 50 mg ml^{-1} konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı.

İzosbestik noktanın diferansiyel spektroskopi tekniği ile bulunması.

İzosbestik noktanın tayini için ASA'in absorpsiyon spektrumu aynı konsantrasyondaki AA çözeltisine karşı alındı. Spektrumda absorpsiyonun sıfır olduğu nokta izosbestik noktadır.

USP XXII'de önerilen yöntemlerin tabletlere uygulanması

Askorbik asit: 50 mg AA'e eşdeğer örnek tartılarak 50 ml'lik balonjojeye konuldu. 25 ml metafosforik asit (%3 w/v)-asetik asit (%8 v/v) çözeltisi ilave edildi. Çalkalayıcıda 20 dakika çalkalandı sonra metafosforik asit-asetik asit çözeltisi ile hacmine tamamlanıp süzüldü ve süzütünün ilk 10-15 ml'si atıldı. Sonraki süzüntüden alınan 2 ml, içinde 5 ml metafosforik asit-asetik asit

çözeltisi bulunan 50 ml'lik erlene aktarıldı. Yeni ayarlanmış olan 2,6-diklorofenolindofenol çözeltisi ile gülpembe renk görülene kadar titre edildi. Aynı işlem üç kez tekrarlandı.

Boş deneme için 50 ml'lik erlene 7 ml metafosforik asit-asetik asit çözeltisi aktarıldı ve üzerine yukarıdaki titrasyonda harcanan 2,6-diklorofenolindofenol çözeltisi hacmi kadar distile su ilave edildi. Gülpembe renk görülene kadar titre edildi. Aynı işlem üç kez tekrarlandı. Sarfiyat ortalaması örneğin titrasyon sarfiyatı ortalamasından çıkarıldı.

Asetilsalisilik asit:

Kolon: C₁₈ 10mm Bondapak

Dedektör: Değişken dalga boylu UV-Visible dedektör (280 nm)

Akış hızı: 2ml. dak⁻¹

Mobil faz: 2 g sodyum-1-heptansülfonat, 850 ml su ve 150 ml asetonitril karışımında çözüldü ve glasiyal asetik asit ile pH=3,4'e ayarlandı.

Solvent karışımı: Asetonitril:kloroform: formik asit (99:99:2)

Uygulama: 100 mg ASA'e eşdeğer tablet tozu tartıldı. Üzerine 20 ml solvent karışımı ilave edildi. 10 dakika çalkalandı ve santrifüj edildi. Bu çözeltilerden 10 ml'lik balonjojeye 1 ml aktarıldı ve solvent karışımı ile hacmine tamamlandı.

10 ml standart (solvent karışımında hazırlanan 0,5 mg.ml⁻¹ konsantrasyondaki ASA çözeltisi) ve 10 ml örnek çözeltisi sıvı kromatografa enjekte edildi. Kromatogramlar alındı.

$$C_o(\text{mg}) = 200 C_s (\text{mg.ml}^{-1}) \left(\frac{R_o}{R_s} \right)$$

bağıntısından ASA konsantrasyonu hesaplandı.

C_o: Örnek konsantrasyonu

C_s: Standart konsantrasyonu

R_o: Örneğin pik alanı

R_s: Standardın pik alanı

Askorbik asit-asetilsalisilik asit içeren tabletlerin analizi:

10 adet tablet ayrı ayrı tartıldı. Ortalama tablet ağırlığı bulundu. Tabletler birarada toz edildi ve bu karışımdan 50 mg AA'e eşdeğer örnek tartılarak 50 ml'lik balonjojeye konuldu. 25 ml 0.1 N H₂SO₄ çözeltisi ile 30 dakika çalkalandıktan sonra aynı çözelti ile hacmine tamamlanarak mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 10-15 ml'si atıldı. Sonraki süzüntüden 5 ml alınarak 100 ml'lik balonjojeye aktarıldı ve 0.1 N H₂SO₄ çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 2.5 ml örnek alınarak 10 ml'ye 0.1 N H₂SO₄ çözeltisi ile tamamlandı ve 0.1 N H₂SO₄'e karşı belirlenen ölçüm koşullarında absorpsiyon spektrumu alındı. Bu spektrumda 243.3 nm, 233.78 ve 228.5 nm'deki absorbans değerleri kaydedildi. Yöntem beş ayrı tartım örneğine uygulandı.

HESAPLAMALAR

İzosbestik noktadaki absorptivite değeri (a₁), farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözelti karışımlarının izosbestik noktadaki (233.8) absorbans değerinin, karışımın toplam konsantrasyonuna bölümü ile bulunan değerlerin ortalamasıdır. Bu çalışmada 23.35 0.23 olarak bulundu.

Miktar tayini çalışmalarında aşağıdaki formüllerden yararlanıldı (4).

Q₁ eşitliğinin eğim (m) ve kesişiminden (n) yararlanarak AA miktarı,

$$C_{AA} \text{ (mg.ml}^{-1}\text{)} = \frac{Q - 0.379}{8.72 \cdot 10^{-3}} \frac{A_{233.8}}{23.35} 1000$$

formülünden hesaplandı. ASA miktarını bulmak için ise,

$$C_{ASA} \text{ (mg.ml}^{-1}\text{)} = \frac{A_{233.8}}{23.35} 1000 - C_{AA}$$

formülü kullanıldı.

Aynı şekilde ASA için elde edilen doğrunun (Q₂) eğim ve kesişim değerleri kullanılarak önce ASA sonra AA'in tabletteki miktarları hesaplandı.

$$C_{ASA} \text{ (mg.ml}^{-1}\text{)} = \frac{Q - 0.379}{8.72 \cdot 10^{-3}} \frac{A_{233.8}}{23.35} 1000$$

$$C_{AA} \text{ (mg.ml}^{-1}\text{)} = \frac{A_{233.8}}{23.35} 1000 - C_{ASA}$$

Buradaki Q değeri AA için 243.3/233.8, ASA için 228.5/233.8 nm'deki absorpsiyon oranlarıdır.

$A_{233.8}$: İzosbestik noktada saptanan absorpsiyon değeri

23.35: İzosbestik noktada saptanan absorptivite değeri

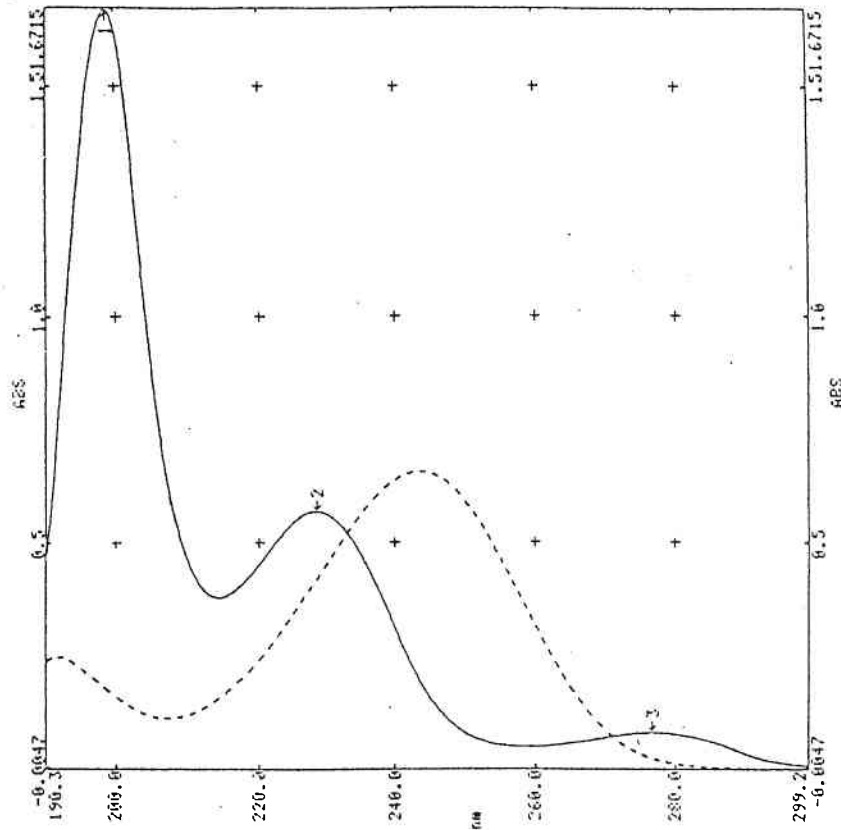
0.379, 0.773 ile $8.72 \cdot 10^{-3}$ ve $3.54 \cdot 10^{-3}$ değerleri ise AA ve ASA için 233.8 nm'de ayrı ayrı bulunan, regresyon denklemlerindeki (Q_1 ve Q_2) eğim ve keşim değerleridir.

C_{AA} : Karışımdaki AA miktarı

C_{ASA} : Karışımdaki ASA miktarı

BULGULAR

12.5 mg.ml^{-1} konsantrasyonda ASA ve AA içeren çözeltilerin belirlenen ölçüm koşullarında absorpsiyon spektrumları alındı (Şekil 1). Şekil 1'de görüldüğü gibi AA ve ASA'nin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyları 243.3 ve 228.5 nm olarak saptandı. İzosbestik dalgaboyu ise 233.8 nm'dir.



Şekil 1: Askorbik asit (----) ve asetilsalisilik asidin () 0.1 N H_2SO_4 'de 12 mg ml^{-1} konsantrasyondaki çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları Referans: 0.1 N H_2SO_4

AA ve ASA standart çözeltileri Tablo 1'de verilen miktarlarda 10 ml'lik balonjölere konuldu ve 0.1 N H₂SO₄ çözeltisiyle hacmine tamamlandı. Bu çözeltilerin 243.3 nm, 233.8 nm ve 228.5 nm'deki absorban değerleri kaydedildi. AA için %AA'ya karşı $Q = A_{243.3}/A_{233.8}$ ve ASA için ise %ASA'ya karşı $Q = A_{228.5}/A_{233.8}$ değerleri grafiğe geçirilerek standart Q eğrileri oluşturuldu. AA ve ASA için elde edilen regresyon denklemleri sırasıyla

$$Q_1 = 8.72 \cdot 10^{-3} \%AA + 0.379 \quad (r = 0.9999)$$

$$Q_2 = 3.54 \cdot 10^{-3} \%ASA + 0.773 \quad (r = 0.9998)$$

Yöntem 240 mg AA ve 400 mg ASA içeren Aspirin Plus C tabletlerine uygulandı. Sonuçlar Tablo 2'de verildi. Ayrıca tabloda 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%RSD) ve %95 güvenilirlik düzeyinde güven aralığı (X t.s/ n) değerleri görülmektedir.

Tablo 1: Q Eğrilerinin hazırlanması için kullanılan AA ve ASA çözeltilerinin % karışım oranları.

Çözelti No	Asetilsalistilik Asit			Askorbik Asit		
	Standart çözelti (ml)	Konsantrasyon ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Oran (%)	Standart çözelti (ml)	Konsantrasyon ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Oran (%)
1	0.5	2.5	10	4.5	22.5	90
2	1.0	5.0	20	4.0	20.0	80
3	1.5	7.5	30	3.5	17.5	70
4	2.0	10.0	40	3.0	15.0	60
5	2.5	12.5	50	2.5	12.5	50
6	3.0	15.0	60	2.0	10.0	40
7	3.5	17.5	70	1.5	7.5	30
8	4.0	20.0	80	1.0	5.0	20
9	4.5	22.5	90	0.5	2.5	10

TARTIŞMA ve SONUÇ

AA ve ASA'i birarada içeren efervesan tabletler önerilen absorbands oranları yöntemi ile herhangi bir ayırma işlemi yapılmaksızın analiz edildi. Bu yöntem ile yapılan analizde 243.3 nm veya 228.5 nm'deki maksimumların kullanılmasının, elde edilen sonuçlara olan etkisinin araştırılması amacıyla tabletlerin analizi her iki dalga boyunda yapıldı. Elde edilen sonuçların kıyaslanması amacıyla aynı tabletler USP XXI'de AA ve ASA tabletleri için önerilen yöntemlerle de analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verildi.

Sonuçlar t ve F testleri yardımıyla %95 güvenilirlik düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma ile ilgili değerler Tablo 3'de verildi. Tablonun incelenmesinden görüldüğü gibi absorbands oranları ve USP yöntemleri ile elde edilen sonuçlar arasındaki farklar anlamsızdır. İki ayrı maksimum dalga boyunun kullanıldığı absorbands oranları yöntemleri ile bulunan ortalamalar arasındaki fark da anlamsızdır. Buna göre izosbestik dalga boyu olan 233.8 nm'den başka sadece 243.3 nm veya 228.5 nm'deki absorbandslardan biri ölçülerek tabletlerdeki AA ve ASA miktarı tayin edilebilir.

Tablo 2: Aspirin Plus C (400 mg ASA, 240 mg AA) tabletlerinin analizi.

İstatistik Değerler	Asetilsalisilik Asit			Askorbik Asit		
	A	B	C	A	B	C
n	1	2	3	4	5	
	241.0	239.2	237.1	399.0	400.8	396.7
	241.7	235.5	239.9	392.4	395.4	398.7
	241.0	239.2	238.5	398.3	400.8	403.2
	247.6	244.6	242.6	398.3	404.4	405.5
	241.7	237.4	241.5	399.0	402.6	401.4
X	242.6	239.2	239.9	397.4	400.8	401.1
(%)	(101.1)	(99.7)	(100.0)	(99.4)	(100.2)	(100.3)
S	2.78	3.39	2.22	2.82	3.37	3.50
%RSD	1.15	1.41	0.93	0.71	0.84	0.87
±t.s/√n	±3.9	±3.89	±2.29	±3.24	±3.87	±3.62

A: Absorbans oranları yöntemi ($Q = A_{243.3}/A_{233.8}$)

B: Absorbans oranları yöntemi ($Q = A_{228.5}/A_{233.8}$)

C: USP yöntemi

Tablo 3: Sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Karşılaştırılan yöntemler	Askorbik Asit		Asetilsalisilik Asit	
	t testi P= 0.05 n ₁ = n ₂ = 5 t = 2.31	F testi P= 0.05 n ₁ = n ₂ = 5 F = 6.39	t testi P= 0.05 n ₁ = n ₂ = 5 t = 2.31	F testi P= 0.05 n ₁ = n ₂ = 5 F = 6.39
A-B	1.55	1.49	1.55	1.43
A-C	0.80	1.45	1.63	1.57
B-C	0.19	2.15	0.08	1.14

KAYNAKLAR

1. Üstün, M., Sungur, S., "Derivative spectrophotometric determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid mixtures in pharmaceuticals". *Pharmazie*, 47(6), 459-460, 1992.
2. Nikolova, N., Taneva, N., Nin'jo, N., "Analysis of effervescent tablets". *Tr. Nauchnoizsled. Khim.-Farm. Inst.*, 12, 239-244, 1982.
3. Jarzebinski, J., Zakrezewski, Z., Suchocki, P., Dobosz, G., "Densitometric measurements in determining active components of drugs. VII". *Acta Pol. Pharm.*, 37(3), 309-314, 1980.
4. Pernarowski, M., Knevel, A.M., Christian, J.E., "Application of Absorbancy Ratios to the Analysis of Pharmaceuticals I-II-III-Theory of the Analysis of Binary Mixtures", *J. Pharm. Sci.*, 50(11), 973-957, 1961.
5. Pernarowski, M., Seare, R.O., Naylor, J., "Application of Absorbance Ratios to the Analysis of Tetracycline Hydrochloride in Presence of Anhydrotetracycline and Epianhydrotetracycline", *J. Pharm. Sci.*, 58 (4), 470-473, 1969.
6. Wahbi, A.A., Abdine, H., Korany, M., Yazbi, F., "Spectrophotometric Analysis of Binary Mixtures of Sulfonamides", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62 (1), 67-70, 1979.
7. Bulut, P., Ordu, H., "Hidroklorotiazid-Spironolakton Karışımının Absorbans Oranları Yöntemi ile Analizi". *FABAD Farm. Bil. Der.*, 9, 223-230, 1984.
8. Hu, Y., Yang, Q., Dong, Ş., Yu, R., "Application of Dual Wavelength Spectrophotometry and Absorbance Ratio Method in Analysis of Compound Preparations. Determination of Amidopyrine and Barbitol in Amidopyrine-Barbitol Injection", *Nanjing Yaoxueyman Xuebao*, 20 (3), 4-8, 1982, C.A., 99, 93842 h, 1993.
9. Chatterjee, P.K., Jain C.L., Sethi, P.D., "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Oxyphenbutazone and Analgin in Pharmaceutical Formulations", *Indian J. Pharm. Sci.*, 49 (3), 111-113, 1987.
10. Atay, O., Bulut, P., "Aspirin-kafein karışımının absorbans oranları tekniği ile spektrofotometrik tayini", *Türk Hij. Den. Biyol. Dergi.*, 44, 91-97, 1987.

11. Atay, O., and Çakır, B., "Spectrophometric quantitative determinations of thiamin HCl and pyridoxine HCl in vitamin combinations using absorbance ratio method", J. Fac. Pharm. Gazi., 5(2), 147-156, 1988.
12. Atay, O., and Gümüş, F., "Isopropilfenazon-kafein içeren analjezik ilaçlarda absorbans oranları yöntemi ile spektrofotometrik miktar tayini çalışmaları," Fabad Farm. Bil. Der., 13, 500-508, 1988.
13. Noyanalpan, N., and Atay, O., "Trimetoprim ve Sulfametoksazol İçeren Tabletlerde Absorbans Oranı Yöntemi ile Spektrofotometrik Miktar Tayini" Fabad Farm. Bil. Der., 15(1), 19-27, 1990.
14. The United States Pharmacopoeia (USP XXII), United States Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville p. 14, 1985.