



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Anzibel Pastillerde Enoksolon-Benzokain-Klorheksidin HPLC Miktar Tayini

CumhurÖKÇELİK ^a, Ece ERGUN ^b, Ümit ERGUN ^{c,*}

^a Nobel İlaç Ar-Ge Merkezi, Düzce, TÜRKİYE

^b Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Ankara, TÜRKİYE

^c Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: umitergun@duzce.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, antiseptik etkili klorheksidini, antiinflamatuvar etkili enoksolonu ve lokal anestetik etkili benzokaini bir arada içeren ve bu içeriğiyle ağız-boğaz bölgesindeki lokal irritasyonlara bağlı rahatsızlıkları ortadan kaldırmaya yardımcı olarak kullanılan Anzibel pastillerin maliyet, iş yükü ve zaman açısından daha ekonomik olması nedeniyle miktar tayini analizinin tek bir HPLC yöntemi geliştirilerek, gerekli validasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Analizlerde 25°C'de ACE 5 C18 4,6 x 150 mm, 5mm kolon, 250nm'de dalga boyunda 0,01 M KH₂PO₄'ün fosforik asit ile pH 3,0± 0,05'e ayarlanmış tampon çözeltisi ve asetonyril kullanılmıştır. Sistem uygunluk, doğruluk ve doğrusalılık parametreleri çalışılmış ve kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klorheksidin, enoksolon, benzokain, HPLC

Quantitative HPLC Analysis of Enoxolone-Benzocaine-Chlorhexidine in Anzibel Pastilles

ABSTRACT

In this study, Anzibel pastilles are used in the treatment of the diseases related to the local irritation in oropharyngeal area with the antiseptic effect of a chlorhexidine, antiinflammatory effect of an enoxolone and locally anesthetizing effect of benzocaine. Because of economic reasons such as cost, workload and time, a new simultaneous HPLC method has been developed for the quantitative analysis of anzibel pastilles and the validation studies have been completed. Analysis were performed at 25°C by using ACE 5 C18 4.6 x 150 mm, 5 mm column, mobile phase consisted of a mixture of 0.01 M KH₂PO₄/H₃PO₄ buffer (pH = 3.0± 0.05) and acetonitrile and PDA dedector set at 250 nm. System suitability, accuracy and linearity parameters were studied and acceptable results were obtained.

Keywords: Chlorhexidine, Benzocaine, Enoxolone, HPLC

I. GİRİŞ

Klorheksidin, bakteri hücre membranının stabilizasyonunu bozar ve membrandan penetre olur. Bakteri hücre sitoplazmasının presipite olmasına yol açar. Hücrenin oksijen kullanımını engelleyerek hücrede ATP düzeylerini düşürür ve sonuçta hücre membranının işlevini bozar. Bu bakterilerin iç membranları yırtılmaz, fakat küçük molekülleri uptake etme yeteneği zayıflar. Klorheksidin düşük konsantrasyonda bakteristatik, yüksek konsantrasyonda ise bakterisid etki gösterir.

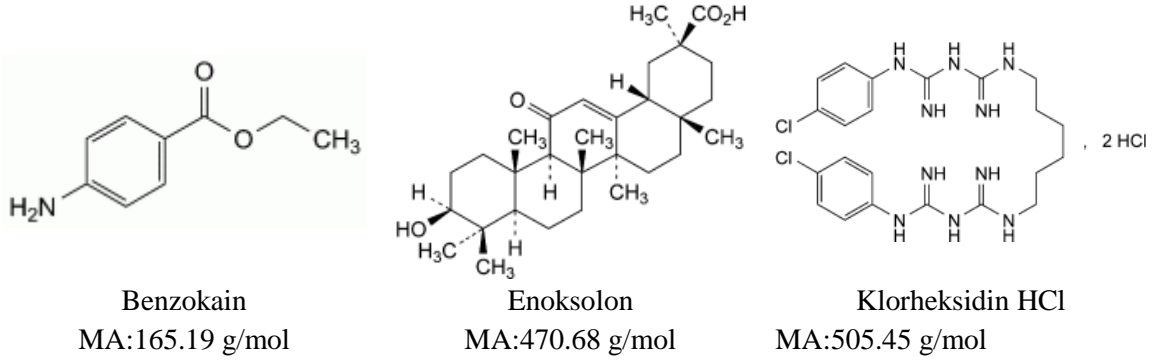
Benzokain kısa etki süreli, para-aminobenzoik asid (PABA) türevi, ester tipte bir lokal anesteziktir. Beyaz renkli kristal yapıya sahip toz veya renksiz kristaller halinde bulunur. Sinir hücresi zarını geri dönüşümlü olarak stabilize ederek sodyum iyonlarına yönelik geçirgenliğini azaltır. Böylece sinir hücresi zarının depolarizasyonu inhibe olur; bu da sinir uyarılarının başlatılmasını ve iletilmesini geçici olarak bloke eder. Benzokain suda çok az çözünür, eter ve alkolde ise çok çözünür.

Enoksolon glisiretinik asit beta-amirin tipi pentasiklik bir triterpenoit türevidir. Beyaz veya beyazımsı kristal tozdur. Enoksolon ekspektoran ve antitussif aktivite gösterir. Klorheksidin[1-5], benzokain [1, 6, 7, 8, 9] ve enoksolonun [10,11] her birinin tek tek analizi ve validasyonları ile ilgili literatürde oldukça çok çalışma vardır. Bu çalışmada, antiseptik etkili klorheksidini, antienflamatuar etkili enoksolonu ve lokal anestetik etkili benzokaini bir arada içeren ve bu içeriğiyle ağız-boğaz bölgesindeki lokal irritasyonlara bağlı rahatsızlıkları ortadan kaldırmaya yardımcı olarak kullanılan Anzibel pastillerin maliyet, iş yükü ve zaman açısından daha ekonomik olması nedeniyle tek bir yöntemde miktar tayini analizi yapılmıştır. Literatürlerde 3 etken maddenin bir arada miktarlandırılmasını sağlayacak bir çalışma yoktur. Yapılan çalışmalar ve analizler sonucunda üç etken madde içeren anzibel pastillerin tek bir HPLC yöntemi ile miktar tayini analizleri gerçekleştirilerek zamandan, cihazdan, iş gücünden kazanmak amacıyla alternatif bir ürün olarak kullanılması düşünülmektedir. Günümüzde ilaç sektöründe artık birbiri ile kombine ürünler çalışıldığından yaptığımız çalışmanın farklı projelere de ilham verici olacağını düşünüyoruz.

II. MALZEME VE YÖNTEM

A. REAKTİF VE STANDARTLAR

Reaktif	Firma	Seri Numarası
Klorheksidin HCl	EP	2.0
Benzokain	EP	1.0
Enoksolon	EP	3.0
Asetonitril	JT Baker	1707501801
Fosforik Asit	Merck	K47261373 550
KH ₂ PO ₄	Merck	AM1089773 707
18 α -glycyrrhetic acid	Sigma-Aldrich	BCBM5743V



Şekil 1. Anzibel pastillerde bulunan üç etken maddenin kimyasal yapıları.

B. ANALİTİK YÖNTEM VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Yöntem	: HPLC
Cihaz	: Waters e2695 ayırma modülü - Waters 2489 UV/Visible dedektör
Kolon	: ACE 5 C18 4,6 x 150 mm, 5mm
Akış Hızı	: 1.5 mL/dakika
Dalga Boyu	: 250 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µL
Kolon Sıcaklığı	: 25°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Analiz süresi	: 12 dakika
Tampon çözelti	: 0,01 M KH ₂ PO ₄ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin pH'sı %85'lik fosforik asit ile 3,0 ± 0,05'e ayarlandı.
Hareketli faz	: Tampon çözelti
Hareketli faz B	: Su : Asetonitril (10:90)
Seyreltme Çözeltisi	: Su : Asetonitril (50:50)
Gradient Program	:

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	70	30
3	15	85
8	15	85
9	70	30
12	70	30

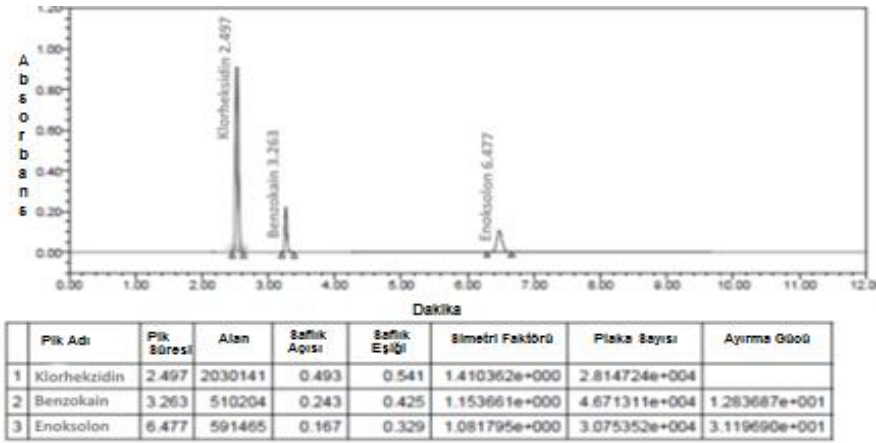
Standart Çözeltisi: 100 mL'lik balon jøjeye 50 mg klorheksidin HCl, 40 mg benzokain ve 30 mg enoksolon standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi eklenip ultrasonik banyoda 10 dakika bekletildi. Tamamen çözüldükten sonra seyreltme çözeltisi ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 50 mL'lik balon jøjeye 5,0 mL alındı ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0,45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. (C_{Klorheksidin HCl}=50µg/mL C_{Benzokain}=40µg/mL C_{Enoksolon}=30µg/mL)

Test Çözeltisi : 20 adet pastil tartıldı ve ortalama pastil ağırlığı belirlendi. 5 adet pastile eşdeğer pastil tozu 500 mL'lik balon jöjeye tartıldı. 200 mL seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyorulmuş 0,45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Klorheksidin HCl}} = 50\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Benzokain}} = 40\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Enoksolon}} = 30\mu\text{g/mL}$)

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

A. SİSTEM UYGUNLUK ŞARTLARI

Sistem uygunluğu standart çözeltinin 6 ardışık enjeksiyonu ile kontrol edilir (Şekil 2). Alıkonma zamanı ve alanların bağıl standart sapması % 0,85'ten küçük ve simetri faktörü klorheksidin için 0,8-1,8 arasında, benzokain ve enoksolon için 0,8-1,5 arasında olmalıdır. Teorik plaka sayıları 5000'den büyük olmalı ve klorheksidin ile benzokain arasındaki ayrışma 5'ten büyük olmalıdır.



Şekil 2. Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramı.

B. DOĞRULUK

Kullandığımız çözücü ve konsantrasyonda ürünün içerisinde klorheksidin, enoksolon ve benzokaini tam olarak çözeltilmeye alıp alamadığımızın kontrolü için doğruluk çalışması yapılmıştır. Üretim sırasında oluşacak hatalar kaynaklı miktar tayini sonucundaki sapma ve varyasyonları tespit edebilmek adına bu çalışma %80 'den %120'ye kadar geri kazanım aralıklarında yapılmıştır.

Tablo 1. Klorheksidin Geri Kazanım Sonuçları.

Klorheksidin HCl	Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım %
% 80	40,3	39,8	98,76
	40,7	40,0	98,28

	41,5	40,9	98,55
% 100	54,3	53,4	98,34
	50,2	49,7	99,00
	50,1	49,6	99,00
	60,9	60,3	99,01
% 120	59,9	59,2	98,83
	59,9	59,5	99,33
			98,79
Ortalama % Geri Kazanım :			98,526-99,057
Geri Kazanım %'in 95% Güven Aralığı Sınırları :			

Tablo 2. Benzokain Geri Kazanım Sonuçları.

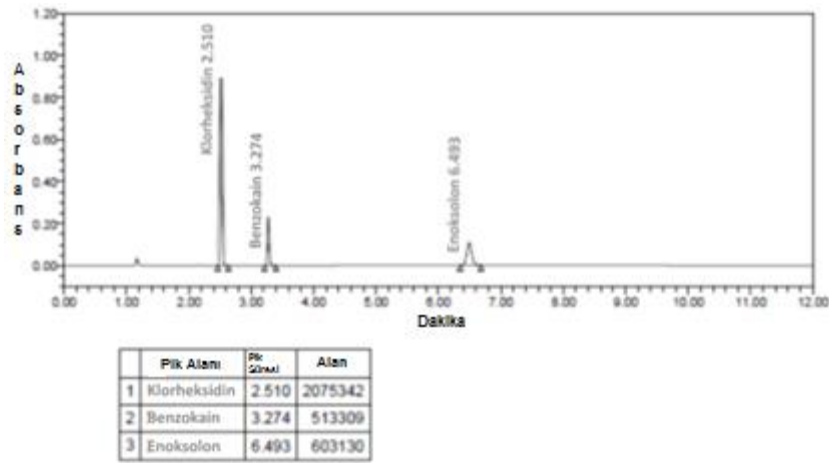
Benzokain	Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım %
% 80	33,4	33,3	99,70
	32,2	32,1	99,69
	32,4	32,2	99,38
% 100	39,7	39,6	99,75
	40,1	39,8	99,25
	40,3	40,2	99,75
% 120	48,3	48,2	99,79
	48,1	48,2	100,21
	48,1	48,2	100,21
Ortalama % Geri Kazanım :			99,75
Geri Kazanım %'in 95% Güven Aralığı Sınırları :			99,504-99,993

Tablo 1, tablo 2 ve tablo 3'te konsantrasyonlara karşı geri kazanım sonuçları görülmektedir. Ortalama geri kazanım değeri klorheksidin HCl için %98,79; benzokain için %99,75 ve enoksolon için %100,08'dir. Bu değerler kabul edilen sınırlar (%98-%102) içinde olduğu için Anzibel Pastil Miktar Tayini yöntemi doğruluk parametresine göre uygundur. Şekil 3'te klorheksidin, enoksolon ve benzokain %100'lük geri kazanım kromatogramı görülmektedir.

Tablo 3. Enoksolon Geri Kazanım Sonuçları

Enoksolon	Hazırlanan konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım %
% 80	23,8	23,9	100,42
	23,8	23,6	99,16

	23,8	24,0	100,84
	30,6	30,4	99,35
% 100	30,2	30,1	99,67
	30,5	30,8	100,98
	36,2	36,1	99,72
% 120	37,2	37,3	100,27
	37,2	37,3	100,27
	Ortalama % Geri Kazanım :		100,08
	Geri Kazanım %'in 95% Güven Aralığı Sınırları :		99,585-100,566



Şekil 3. Doğruluk Kromatogramı %100 ($C_{\text{Klorheksidin HCl}} = 50 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Benzokain}} = 40 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Enoksolon}} = 30 \mu\text{g/mL}$)

C. DOĞRUSALLIK VE ÇALIŞMA ARALIĞI

Doğrusallık çalışması bir konsantrasyon aralığındaki numune çözeltilerindeki analit cevabının konsantrasyonla doğru orantılı olduğunun gösterilmesidir. Çalışmaya karar verdiğimiz konsantrasyonun doğrusallık çalışma aralığı içerisinde olup olmadığını kontrol etmek ve lineerlik eğrisinden elde edilen kesişim değeri %100 standart için elde edilen alanın %2'sinden büyük olmadığını kanıtlamak için standart konsantrasyonu %100 kabul edilerek %50 ile %150 arasında 6 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı ve doğrusallık grafikleri çizildi. Tablo 4, tablo 5 ve tablo 6'da konsantrasyonlara karşı bulunan ve lineerlik denkleminde hesaplanan sonuçlar görülmektedir. Şekil 4, şekil 5 ve şekil 6'da klorheksidin, enoksolon ve benzokain doğrusallık grafikleri görülmektedir. y-kesişi, % 100 seviyesindeki analit için elde edilen; klorheksidin alanının % 1,60'ı, benzokain alanının %0,25'i ve enoksolon alanının %0,28'idir. Bu değerler %2'den küçük olduğu için kabul edilebilirdir. R^2 değerleri sınırlar (>0,995) içerisinde olup yöntem doğrusallık parametresine göre uygundur. Şekil 7'de %100'lük doğrusallık kromatogramı görülmektedir.

Tablo 4. Klorheksidin HCl konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi	Klorheksidin HCl Konsantrasyonu (µg/mL)	Enjeksiyonların Alan Ortalaması	Hesaplanan Alan
% 50	24,8	1008428	1010330
% 60	29,7	1216714	1239588
% 80	39,6	1633286	1661161
% 100	49,5	2049858	2065301
% 120	59,4	2466429	2498812
% 150	74,3	3091287	3126114

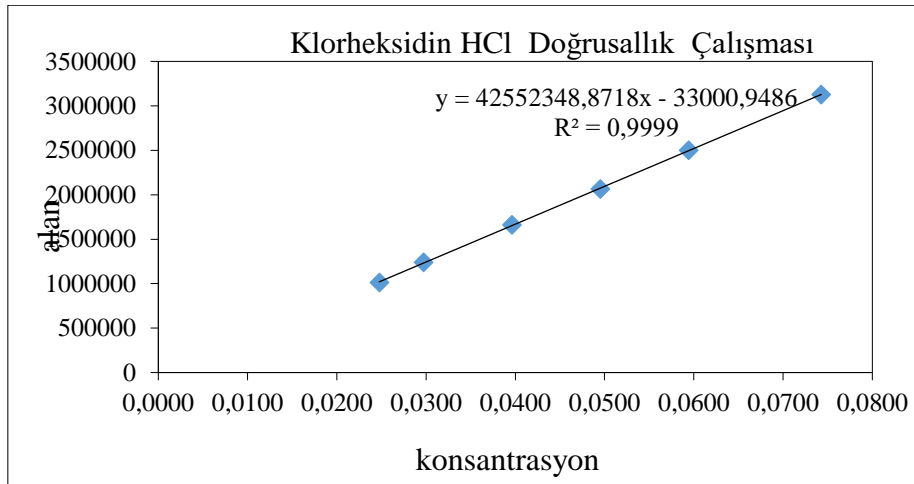
Eğim : 42552348,8718

Kesişim : -33000,9486

R : 0,9999

R²: 0,9999

y = mx + n : $y = 42552348,8718 x - 33000,9486$

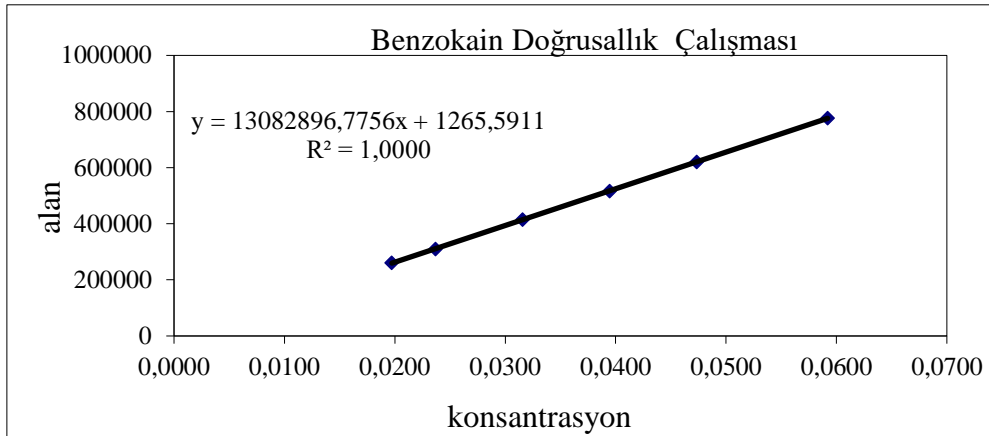


Şekil 4. Klorheksidin HCl doğrusallık grafiği.

Tablo 5. Benzokain konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi	Benzokain Konsantrasyonu (µg/mL)	3 Enjeksiyonun Alan Ortalaması	Hesaplanan Alan
% 50	19,7	260696	259432
% 60	23,7	309590	311065
% 80	31,6	415333	414331
% 100	39,5	516387	517598
% 120	47,4	620758	620864

% 150	59,2	776291	775764
Eğim : 13082896,7756			
Kesişim : 1265,5911			
R : 0,9999			
R²: 1,000			
y = mx + n : y = 13082896,7756x + 1265,5911			

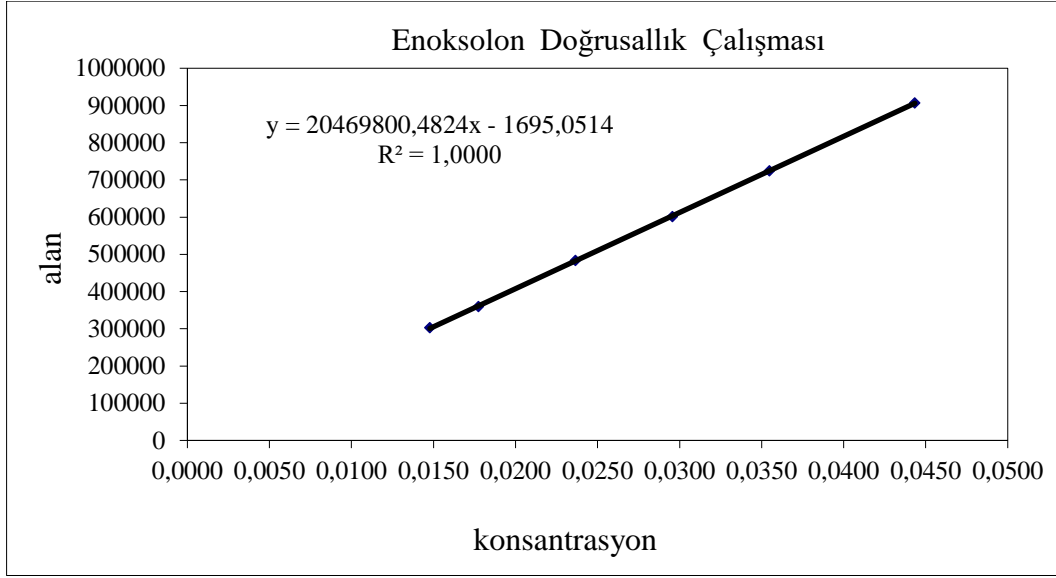


Şekil 5. Benzokain doğrusallık grafiği.

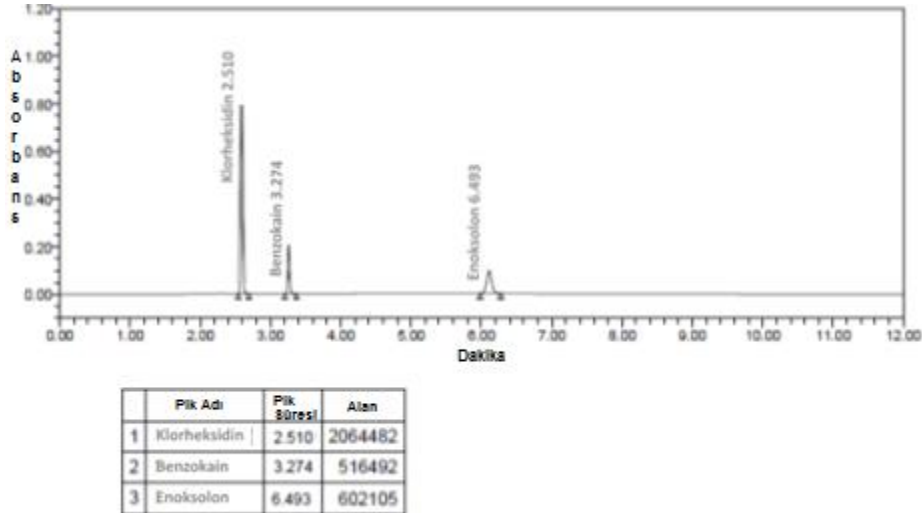
Tablo 6. Enoksolon konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi	Enoksolon Konsantrasyonu (µg/mL)	3 Enjeksiyonun Alan Ortalaması	Hesaplanan Alan
% 50	14,8	302796	300829
% 60	17,7	359392	361334
% 80	23,6	483295	482343
% 100	29,6	601743	603353
% 120	35,5	724093	724362
% 150	44,3	906779	905877

Eğim : 20469800,4824
Kesişim : -1695,0514
R : 0,9999
R²: 1,000
y = mx + n : y = 20469800,824 x - 1695,0514



Şekil 6.Enoksolon doğrusallık grafiği.



Şekil 7. Doğrusallık kromatogramı ($C_{\text{Klorheksidin HCl}}=50 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Benzokain}}=40 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Enoksolon}}=30 \mu\text{g/mL}$).

IV. SONUÇ

Yapılan çalışmalar sonucu, 12 dakikalık enjeksiyon süresinde 3 etken maddeninde çıkartıldığı bir HPLC yöntemi yapılmış ve valide edilebilmiştir. Etken maddelerin alıkonma zamanları, klorheksidin için yaklaşık 2,5 dakika; benzokain için yaklaşık 3,2 dakika ve enoksolon için ise yaklaşık 6,5 dakika olarak ayarlanmıştır. Sistem uygunluk şartlarının tespiti için şekil 2'den aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir ve buna göre sistemimiz sistem uygunluk parametlerini sağlamaktadır.

- Alıkonma zamanı ve alanların Bağıl standart sapması %0,85'ten küçük bulunmuştur
- Simetri faktörü Klorheksidin için 0,8-1,8 arasında, benzokain ve enoksolon için 0,8-1,5 arasında bulunmuştur.
- Teorik plaka sayıları 5000'den büyük bulunmuştur.

- Klorheksidin ile Benzokain'in arasındaki ayrışma 5'ten büyüktür.

Doğruluk parametresinin belirlenmesinde klorheksidin HCl için %98,79;benzokain için %99,75 ve enoksolon için %100,08 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar kabul kriteri olan %98-%102 aralığı içerisinde olduğundan yöntemimiz doğruluk parametresi açısından uygundur.Doğrusallık parametresi için elde edilen değerler her 3 etken madde için elde edilen y-kesişim değerleri %2'den küçük olduğundan yöntemimiz doğrusallık parametresine göre de uygundur.Elde edilen korelasyon katsayısı ve R² değerleri de bunu desteklemektedir.

TEŞEKKÜR: Proje Nobel ilaç AR-GE merkezi tarafından desteklenmiştir.

V. KAYNAKLAR

- [1] 1RxMediaPharma 2017, İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı
- [2] T. Personen, J. Holmalahti and J. Pohjola, "Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography & Biomedical Applications*, c. 665, ss. 222-225, 1995.
- [3] L.Havlíková, L. Matysová, L. Nováková, R. Hájková and P. Solich, "HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 43, ss. 1169-1173, 2007.
- [4] Y. Ha and A. P. Cheung, "New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 14, ss. 1327-1334, 1996.
- [5] F. Fiorentino, M. Corrêa, H. Regina and N. Salgado, "Analytical Methods for the Determination of Chlorhexidine: A Review," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, c. 40, s. 2, ss. 89-101, 2010.
- [6] L.R. Paschoal and W.A. Ferreira, "Simultaneous determination of benzocaine and cetylpyridinium chloride in tablets by first-derivative spectrophotometric method," *Il Farmaco*, c. 55, ss. 687-693, 2000.
- [7] P. Perez-Lozano, E. Garcia-Montoya, A. Orriols, M. Minarro, J.R. Tico and J.M. Sune-Negre, "A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine, propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 39, ss. 920-927, 2005.
- [8] H. A. Merey, "Simple spectrophotometric methods for the simultaneous determination of antipyrine and benzocaine," *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, c. 54, ss. 181-189, 2016.
- [9] H. A. Merey and H. E. Zaazaa, "Validated simultaneous determination of antipyrine and benzocaine HCl in the presence of benzocaine HCl degradation product," *Royal Society of Chemistry: Analytical Methods*, c. 6, ss. 6044-6050, 2014.

[10] S. Esmaeili, F. Naghibi, M. Mosaddegh and N. Nader, "Determination of 18 β -Glycyrrhetic Acid in *Glycyrrhiza glabra* L. Extract by HPLC," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, c. 2, ss. 137-141, 2006.

[11] V. Andrisano, V. Cavrini, D. Bonazzi, "HPLC Determination of 18 [3-Glycyrrhetic and Glycyrrhizinic Acids in Toothpastes after Solid Phase Extraction," *Chromatographia*, c. 35, ss. 167-172, 1993.