إستخدام طرق تحليلية مختلفة للتقدير الكمي الدقيق لبعض المضادات الحيوية الحديثة

إعداد

زكيـــة ضيف الله محمد الملاح

بحث مقدم لنيل درجة الدكتوراه في العلوم
الكيمياء / الكيمياء التحليلية

إشراف

أ.د علاء السيد أحمد أمين

أستاذ الكيمياء التحليلية بجامعة أم القرى

كلية العلوم للبنات

جامعة الملك عبدالعزيز

جدة– المملكة العربية السعودية

ربيع الثاني 1432هـــ– مارس2011

Utility of different analytical methods for the microdetermination of some recent antibiotics

By

Zakiya Dhaif-Allah Al-Mallah

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Doctor of Philosophy (Analytical Chemistry)

Supervised by

Prof. Alaa S. Amin

Chemistry Department, Faculty of Science
King Abdulaziz University
Jeddah, KSA

2011 - 1432

قائمـــــــــــــــة المحـــــــتويات

CONTENTS

الموضوع		رقم الصفحة
شكر وتقدير.....		أ
المستخلص باللغة العربية		ج
المستخلص باللغة الإنجليزية		د
قائمة المحتويات.....		هـ
قائمة الأشكال.....		ك
قائمـــــة الجداول.....		س
قائمة الرموز والمصطلحات.....		ف
الباب الأول		
المقـــــــدمة		
1.1 تعريف المركبات المختارة للبحث.....		1
1.1.1 البيفلوكساسين.....		1
1.1.2 الجيميفلوكساسين.....		3
1.1.3 الجاتيفلوكساسين.....		4
1.1.4 الميكليزين.....		4

.....
1.2 طرق تحليل المركبات تحت الدراسة..... 9
1.2.1 طرق تحليل مركبات الفلوروكينولينات..... 9
1.2.1.1 الطرق الطيفية..... 9
.
1.2.1.2 طرق التحليل التألقي..... 21
1.2.1.3 طرق التحليل الكروماتوجرافي..... 23
1.2.1.3.1 طرق التحليل الكروماتوجرافي السائلة ذات الضغط العالي..... 23
1.2.1.3.2 طرق الكروماتوجرافي ذات الطبقة الرقيقة..... 26
1.2.1.4 طرق البولاروجرافي..... 26
.
1.2.2 طرق تحليل مركبات مضادات الهيستامين..... 26
1.3 الهدف من الدراسة..... 28

الباب الثـــــــــاني
التقنيـــــــــــات العملية

2.1 الكيماويات المستخدمـــــــــــــــة..... 29
.....
2.2 تحضير المحـــــــــــــــــاليل..... 29

.....

2.3 الأجهـــــــــــــــــــزة المستخدمـــــــــة..... 31

2.4 تقدير العينات عن طريق تكوين متراكب المزدوج الأيوني مع البروموفينول الأزرق..... 34

2.4.1 كيفية تحديد الطول الموجي 34

2.4.2 تحديد الظروف الملائمة..... 34

2.4.2.1 دراسة تلأثير الرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم..... 34

2.4.2.2 دراسة تأثير حجم الكاشف..... 35

2.4.2.3 دراسة تأثير حجم المحلول المنظم..... 35

2.4.2.4 دراسة تأثير زمن 36

2.4.2.5 الفصل..... 36

دراسة تلأثير حجم الكلوروفورم وعدد مرات الفصل.....

2.4.3 تكافؤية المتراكب 36

2.4.3.1 الناتج..... 36

طريقة النسبة الجزيئية.....

2.4.3.2 طريقة التغيرات 37

2.4.4 المستمرة..... 37

دراسة التداخلات المتوقعة من الإضافات شائعة الإستعمال في صناعة الدواء.....

.....

2.4.5 إيجاد منحنى التعيير 38

2.4.6 القياسي..... 38

2.4.7 تطبيق الطريقة على أقراص 38

2.4.8 39

2.4.9 تيكوين..... 39
تطبيق الطريقة على محلول معقم العين تايمر.....
تطبيق الطريقة على عينات دم تحتوي على الجاتيفلوكساسين.....
تطبيق الطريقة على عينات بول تحتوي على الجاتيفلوكساسين.....
2.5 تقدير العينات عن طريق أكسدتها بواسطة برمنجنات البوتاسيوم في وسط حمضي..... 40
2.5.1 كيفية تحديد الطول الموجي..... 40
2.5.2 تحديد الظروف الملائمة..... 40
2.5.2.1 دراسة تأثير حجم برمنجنات البوتاسيوم..... 40
2.5.2.2 دراسة تأثير زمن التسخين..... 41
2.5.2.3 دراسة تأثير حجم حمض الكبريتيك..... 41
2.5.2.4 دراسة تأثير حجم الميثيلين الأزرق..... 42
2.5.3 دراسة التداخلات المتوقعة من الإضافات شائعة الإستخدام في صناعة الدواء..... 42
2.5.4 إيجاد منحنى التعيير 43
2.5.5 القياسي..... 43
2.5.6 تطبيق الطريقة على اقراص 43
2.5.7 تيكوين..... 43
2.5.8 تطبيق الطريقة على محلول معقم العين تايمر..... 44
تطبيق الطريقة على عينات دم تحتوي على

الجاتيفلوكساسين.....
تطبيق الطريقة على عينات بول تحتوي على الجاتيفلوكساسين.....
2.6 تقدير العينات عن طريق التفاعل مع النهيدرين..... 44
2.6.1 طريقة تحديد الطول الموجي وإختيار المذيب المناسب..... 44
2.6.2 تحديد الظروف الملائمة..... 45
2.6.2.1 تأثير نسبة خلط المذيبات على زيادة الحساسية..... 45
2.6.2.2 دراسة تأثير زمن التسخين..... 45
2.6.2.3 دراسة تأثير حجم النهيدرين..... 45
2.6.3 دراسة التداخلات المتوقعة من الإضافات شائعة الإستخدام في صناعة الدواء..... 46
2.6.4 إيجاد منحنى التعيير القياسي 46
2.6.5 تطبيق الطريقة على أقراص تيكوين..... 47
2.6.6 تطبيق الطرق على محلول معقم العين تايمر..... 47
2.6.7 تطبيق الطرق على عينات دم تحتوي على 47
2.6.8 الجاتيفلوكساسين..... 47
تطبيق الطريقة على عينات بول تحتوي على الجاتيفلوكساسين.....
2.10 الطريقة الدستورية الأمريكية..... 48
2.10.1 طريقة تحليل مركب الميكليزين..... 48
2.10.2 تحضير الطور 48

المتحرك.....
2.10.3 الجهاز 48
المستخدم.....
2.10.4 كيفية إجراء 48
التجربة.....

البـــــــــــاب الثالث

النتائـــــــج والمناقشـــــــــــة

الفصـــــــــــل الأول

تقدير العينات عن طريق تكوين متراكبات المزدوج الأيوني مع البروموفينول الأزرق

3.1.1 طيف الإمتصاص للمتراكب الناتج من تفاعل العينات مع البروموفينول 49
الأزرق.....
3.1.2 تحديد الظروف الملائمة 49
.....
3.1.2.1 دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني للمحلول 49
المنظم.....
3.1.2.2 دراسة تأثير حجم 49
الكاشف.....
3.1.2.3 دراسة تأثير حجم المحلول 50
المنظم.....
3.1.2.4 دراسة تأثير زمن 50
الفصل.....
3.1.2.5 دراسة عدد مرات 51
الفصل.....
3.1.2.6 إستقرارية المتراكب الناتج مع 51
الزمن.....
3.1.2.7 تكافؤية المتراكب 51
3.1.3 الناتج..... 51

حساب ثابت الإستقرارية للمتراكب الناتج.................................
3.1.4 ميكانيكية التفاعل... 52
3.1.5 المعالجة الإحصائية للنتائج.. 54
3.1.6 إيجاد منحنى التعيير القياسي... 56
3.1.7 حساسية الطريقة... 57
3.1.8 حساب دقة ومصداقية الطريقة 58
3.1.9 .... دراسة التداخلات المتوقعة من الإضافات شائعة الإستخدام في صناعة الدواء.. 58
3.1.10 التطبيقات التحليلية.. 58

الفصل الثاني
تقدير العينات عن طريق أكسدتها ببرمنجنات البوتاسيوم في وسط حامضي

3.2 مقدمـــة... 81
3.2.1 طيف الإمتصاص الناتج من أكسدة العينات تحت الدراسة بواسطة برمنجنات البوتاسيوم.. 81
3.2.2 تحديد الظروف الملائمة... 81

3.2.2.1 دراسة تأثير حجم برمنجنات البوتاسيوم.................................... 81
3.2.2.2 دراسة تأثير زمن التسخين.. 82
3.2.2.3 دراسة تأثير حجم حمض الكبريتيك.. 82
3.2.2.4 دراسة تأثير حجم الميثيلين الأزرق...................................... 83
3.2.3 إيجاد منحنى التعيير 83
3.2.4 القياسي... 84
حساسية الطريقة...
3.2.4 حساب دقة ومصداقية 84
3.2.5 الطريقة...
دراسة التداخلات المتوقعة من الإضافات شائعة الإستخدام في صناعة الدواء.. 85
3.2.6 التطبيقات التحليلية.. 85

الفصل الثالث

تقديـــــــــر العينات عن طريق التفاعل مع النـنهيدرين

3.3 مقـــــدمة 104
3.3.1 تقدير الجيميفلوكساسين... . 104
3.3.1.1 طيف الإمتصاص الناتج من تفاعل النـنهيدرين مع الجيميفلوكساسين في عدة مذيبات.. 104
3.3.1.2 دراسة تأثير زمن التسخين.. 106
3.3.1.3 دراسة تأثير حجم النـنهيدرين.. 106

3.3.1.4 إستقرارية المركب الناتج مع الزمن..... 106
3.3.2 تقدير الجاتيفلوكساسين..... 107
.
3.3.2.1 طيف الإمتصاص للمتراكب الناتج من تفاعل الجاتيفلوكساسين مع النانهيدرين..... 107
.....
3.3.2.2 دراسة تأثير زمن التسخين..... 107
3.3.2.3 دراسة تأثير حجم النانهيدرين..... 108
3.3.2.4 إستقرارية المركب الناتج مع الزمن..... 108
3.3.3 تقدير البيفلوكساسين..... 108
..
3.3.3.1 طيف الإمتصاص للمتراكب الناتج من تفاعل البيفلوكساسين مع النانهيدرين..... 108
.....
3.3.3.2 دراسة تأثير زمن التسخين..... 108
3.3.3.3 دراسة تأثير حجم النانهيدرين..... 109
3.3.3.4 إستقرارية المركب الناتج مع الزمن..... 109
3.3.4 إيجاد منحنى التعيير القياسي للعينات بعد تفاعلها مع النانهيدرين..... 109
3.3.5 110
حساسية
الطريقة.....
3.3.6 حساب دقة ومصداقية 111
3.3.7

الطريقة..... 111
دراسة التداخلات المتوقعة من الإضافات شائعة الإستخدام
في صناعة
الدواء.....
3.3.8 التطبيقات 111
التحليلية.....
قائمة 139
المراجع.....
..
الملخص باللغة I
الإنجليزية.....

المستخلص

إن التداوي بالمستحضرات الصيدلانية يشكل أمل وأمان لكل المرضى الذين تعتل صحتهم خلال فترة المرض عافانا الله وإياهم، ولذلك فلابد من تقييم جودة ذلك المنتج الحيوي والضروري لحياة بني البشر وكذلك ضمان فعالية المنتج خاصة في الأماكن الحارة مثل مكة المكرمة والتي يتوافد عليها حجاج ومعتمري بيت الله الحرام ونظرا لأهمية التداوي بالمستحضرات الصيدلانية بين المرضى بجرعاته وتراكيزه المضبوطة أثناء فترة العلاج فمن الحكمة إحكام رقابة الجودة علي هذه المستحضرات الدوائية المتواجدة بالأسواق سواء كانت محلية أو مستوردة وذلك باستحداث وتطبيق طرق طيفية جديدة وبسيطة وغير مكلفة اقتصاديا. وفي هذه الدراسة تم اختيار ثلاث مضادات حيوية من فصيلة الفلوروكينولينات (الجيميفلوكساسين ، والجاتيفلوكساسين ، والبيفلوكساسين) ومركب من مضادات الهيستامين (الميكليزين) حيث تضمنت الرسالة التعريف بهذه المركبات وأهميتها بالإضافة إلى أهم الأبحاث التي نشرت في مجال تقديرها وأيضا الطرق المقترحة لتقديرها حيث تضمنت الطريقة الأولى تقدير هذه المركبات عن طريق تكوين متراكبات المزدوج الأيوني مع البروموفينول الأزرق في وجود محلول الخلات المنظم والتي تميزت بالثبات والحساسية لتراكيز تتراوح من 10.0 الى 100 ميكروجم / مل، أما الطريقة الثانية فقد تضمنت تقدير هذه المركبات عن طريق أكسدتها ببرمنجنات البوتاسيوم في وسط حمضي والتي تميزت بالحساسية لتراكيز تتراوح من 10.0 الى 100 ميكروجم / مل وأخيرا تقديرها عن طريق تفاعلها مع النهيدرين باستخدام مخاليط من عدة مذيبات بهدف زيادة الحساسية حيث تراوحت التراكيز المقاسة من 20.0 الى 120 ميكروجم / مل بالنسبة للجيميفلوكساسين ومن 20.0 الى 150 ميكروجم / مل بالنسبة للجاتيفلوكساسين ومن 200 الى 1000 ميكروجم / مل بالنسبة للبيفلوكساسين أما مركب الميكليزين فلم يحدث أي استجابة لهذه الطريقة نظرا لغياب مجموعة الأمين، هذا وقد طبقت الطرق المقترحة على المادة الخام النقية وعلى المستحضرات الدوائية المتداولة أثناء العلاج وعلى عينات بيولوجية (الدم والبول) ومقارنتها إحصائيا بالطريقة الدستورية الأمريكية وكذلك طريقة الكروماتوجرافي السائلة ذات الضغط العالي. وقد تم تحديد الظروف العملية المثلى وإيجاد نسب التكوين وثوابت الإستقرارية للمتراكبات الناتجة وإيجاد منحنيات التعيير القياسي وقد وجد أن الطرق المقترحة تتمتع بدقة ومصداقية جيدة.

Abstract

The medication pharmaceutical is a hope and safety for all patients who have their health deteriorates. Therefore, the quality of the product is vital and necessary for the life of human being as well as ensuring the effectiveness of the product, in warm places. Given the importance of pharmaceutical treatments between patients and concentrations seized during the treatment, it is wise to tighten quality control on these pharmaceuticals available in the market, whether domestic or imported.Thus, the development of new simple and inexpensive spectrophotometric methods. In this work, three flouroquinolones drugs (gemifloxacine, gatifloxacine, and pefloxacine) and one of antihistamine drug (meclizin) were determined by three simple and sensitive spectrophotometric methods. The first method was based on the reaction of these drugs with bromophenol blue (BPB) in the presence of acetate buffer solution to give a highly coloured ion pair complexes, extractable with chloroform. The second method was based on oxidation of the drugs by potassium permanganate in acidic medium and determined the unreacted oxidant by measuring the decrease in absorbance by methylene blue (MB). The finally method was based on the reaction of the drugs with ninhydrin reagent in the presence of different organic solvents. The proposed methods are applied for determination of the studied drugs in their tablet formulations and spiked human urine and plasma. The results were in good agreement with those obtained by the official and HPLC methods.

Summary

In this work, four drugs were studied. These drugs are gemifloxacin, gatifloxacin, pefloxacine, and meclizin. The analytical procedures which would be specific and stability indicating (as possible) for the assay of the mentioned drugs and tha analytical application of these procedures to the available pharmaceutical dosage forms and biological samples such as a human urine and plasma.

The thesis consists of Part I, deals with the general introduction, In this part, Introduction and review of literature include two parts, the first part gives an idea about an active antibiotics, which has been used for the treatment of many diseases. A detailed discussion about the definitions, action and indications, metabolism and pharmacokinetics, chemical structures and characters of the studied. The second part gives a literature survey of the previous studies for the analysis of studied drugs including spectrophotometric, spectrofluorimetric, chromatographic methods, physicochemical and electro-analytical methods, Part II, contains the experimental part which includes apparatus used for measurement and procedures for preparation of drug solutions and reagents. It contains the proposed spectrophotometric methods for determination of studied drugs in pure form and in dosage forms. It is also, contain pharmacopoeia and official methods for analysis of the studied drugs.

Part III, results and discussion, This part was divided into three sections, Section I, deals with the determination of the studied drugs by reaction with bromophenol blue (BPB) in presence of acetate buffer solution to yield a highly coloured extracted ion - pair complexes, Section II, outlines the determination of the drugs by oxidation with potassium permanganate in acidic mediumthe optimum condition for complete oxidation is studied. Section III, determination of the drugs by reaction with ninhydrin in different organic solvents and the reaction conditions were optimised. Under the optimum conditions, the calibration graphs correlating the increase in the absorption intensity (*A*) with the corresponding concentration of the studied drugs were constructed. Regression analysis for the results were carried out using least-square method. In all cases, Beer's law plots (n=6) were linear with very small intercepts and good correlation coefficients (0.9992–0.9997) in the general concentration ranges

present in the thesis. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) were determined using the formula:

LOD or LOQ= KSDa/*b*,

where K =3 for LOD and 10 for LOQ, SDa the standard deviation of the intercept and *b* is the slope. The accuracy of the proposed methods was evaluated by the standard addition method at three different concentrations levels. The recovery values of the added concentrations were calculated. This indicated the accuracy of the proposed method. The precisions of the proposed methods were determined by replicate analysis of six separate solutions of the working standards at three concentration levels of the studied drugs. The intra-day precision was assessed by analyzing six replicates of each sample as a batch in a single assay run, and the inter-day precision was assessed by analyzing the same sample, as triplicate, in two separate runs. The method gave satisfactory results; the relative standard deviations did not exceed 1.55% indicating the good reproducibility of the proposed method. This precision level is adequate for the precision and routine analysis of the investigated drugs in quality control laboratories. Before proceeding with the analysis of the studied drugs in their pharmaceutical dosage forms, interference liabilities were carried out to explore the effect of common excipients that might be added during formulations. Samples were prepared by mixing known amount of the drug with various amounts of the common excipients: lactose, sucrose, starch, magnesium stearate. The analysis of these laboratory-prepared samples was carried out using the general recommended procedure, and the recovery values were determined. No interference was found from lactose, sucrose, starch, talc, gum acacia, glucose and magnesium stearate; the recovery values were evaluated. This indicated the absence of interference liabilities from these excipients. Although the method, being based on oxidation reaction is not selective, however, the good recoveries ensured its suitability for the analysis of the investigated

drugs in their solid dosage forms without interference from the common reducing excipients. This was attributed to the high sensitivity of the method that necessitated the dilution of the sample, and consequently the excipients beyond their interference capabilities. Nevertheless, the proposed method has the advantage that the measurements are performed at the visible region away from the UV absorbing capabilities of interfering substances that might be co-extracted from dosage forms.

The high sensitivity of the proposed methods allowed the determination of the studied drugs in biological fluids. The proposed method was further applied to the in-vitro determination of the studied drugs in spiked human urine and plasma. This value lies within the working concentration range of the proposed methods, thus it could be successfully applied to the determination of the studied drugs in spiked human urine and plasma over the specific concentration range. The results are abridged in Tables. The mean percentage recoveries for the studied drugs in spiked urine and plasma are calculated (n = 6)

(لاتوجد خاتمه-لايوجد ملخص عربي)