جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم الكيمياء

تقدير بعض المركبات الدوائية باستخدام طرائق طيفية وكهربائية مختلفة وكروماتوغرافيا السائل عالِ الأداء

إخلاص ذنون سليم محمد العلاف

أُطروحة دكتوراه

علوم الكيمياء / الكيمياء التحليلية

إشراف

أ.د. نبيل صبيح عثمان الطيار أ.د. عامر ذنون عبد الرحمن الطائي

١٤٤٤هـ ٢٠٢٣ م

الخلاصة

تتضمن الأطروحة على أربعة فصول:

الفصل الأَوَّل: يتضمن مقدمة عامة عن المركبات الدوائية التي تم دراستها وهي الكارفيديلول والهيدروكلوروثيازيد والأتورفستاتين وأهميتها واستخداماتها في علاج الأمراض وصفاتها الفيزيائية والكيميائية فضلًا عن الطرائق التحليلية المختلفة المستخدمة في تقدير تلك المركبات الدوائية الثلاث والهدف من البحث.

الفصل الثاني: يشتمل على الطرائق الطيفية المقترحة لتقدير المركبات الدوائية ويتكون من أربعة أجزاء:

الجزء الأَوَّل: الطريقة الطيفية لتقدير الكارفيديلول باستخدام التفاعل التكثيفي بين الكارفيديلول وكاشف ٤- هيدروكسي بنزالديهايد بوجود حامض الكبريتيك المركز إذ يتكون مركب الاينامين (Enamine) ذو لون الأَحمر في الوسط الكحولي من الإيثانول المطلق ويكون الناتج مستقراً ويعطي أعلى امتصاص عند الطول الموجي ٥٣٣ نانوميتر. طبق قانون بير ضمن المدى ٠.٥-٥.٠ مايكروغرام/ مللتر، ومعامل الامتصاص المولاري لناتج التفاعل كان 8.4627×١٠٤ لتر. مول-١. سم-١، طُبقت الطريقة المقترحة بنجاح على المستحضرات الصيدلانية (أقراص).

الجزء الثاني: يشتمل على طريقة طيفية غير مباشرة لتقدير الكارفيديلول في الوسط المائي إذ تعتمد الطريقة على أكسدة الكارفيديلول مع زيادة من بيريودات البوتاسيوم بوصفه عامل مؤكسد في وسط من حامض الهيدروكلوريك المخفف، إذ تعمل الكمية الفائضة من العامل المؤكسد على قصر لون صبغة الأيروكرم الأسود-T والمضافة إلى وسط التفاعل ويتم قياس لون الصبغة المتبقية عند الطول الموجي الأَقصى ٥٢٠ نانوميتر وبعد تثبيت الظروف المثُلى كان مدى التركيز للمنحني القياسي ٠.٥-١٥.٠ مايكروغرام/ مللتر وكان معامل الامتصاص المولاري ١.١٣٤٠× ١٠٤ لتر.مول-١.سم-١، طُبقت الطريقة بنجاح في تقدير الكارفيديلول في المستحضرات الصيدلانية (أقراص).

الجزء الثالث: يتضمن طريقة طيفية مباشرة لتقدير الهيدروكلورثيازيد بتفاعله مع كاشف الإليزارين الأَحمر-S في وسط من الميثانول المطلق وذلك خلال تفاعل الشحنة المنتقلة ليعطي ناتجًا ملونًا له أعلى امتصاص عند الطول الموجي ٥٣٧ نانوميتر وكانت الاستجابة الخطية لناتج التفاعل ضمن المدى ٠.١-٢.٥ مايكروغرام/ مللتر وكانت قيمة معامل الامتصاص المولاري للناتج ١.٢٧٧٤×١٠٥ لتر. مول-١. سم-١، طُبقت الطريقة بنجاح في تقدير الهيدروكلوروثيازيد في المستحضرات الصيدلانية (أقراص) .

الجزء الرابع: اشتمل على طريقة طيفية مباشرة لتقدير أتورفستاتين كالسيوم ثلاثي الماء بتفاعل الإضافة النيوكليوفيلية (تكوين الاسيتال) بوصفه حامضًا كاربوكسيليًا ويحتوي على مجموعتي

هيدروكسيل مع ٢-هيدروكسي نفثالديهايد بوجود حامض الكبريتيك المركز ليعطي ناتجًا ملونًا أعلى امتصاص له عند الطول الموجي ٥٨٠ نانوميتر. كانت العلاقة بين التركيز والامتصاص خطية ضمن مدى التراكيز من ٠.١ – ٥.٠ مايكروغرام/ مللتر وكان معامل الامتصاص المولاري للناتج 5.3576×10^4 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$، طُبقت الطريقة المقترحة بنجاح على تقدير الأتورفستاتين كالسيوم في المستحضرات الصيدلانية (أقراص).

الفصل الثالث: تضمن تقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة باستخدام تقنيات كهروكيميائية مختلفة ويشمل الفصل على ثلاث أجزاء:

الجزء الأَوَّل: يشتمل على مقدمة عامة عن الطرائق الكهروكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة.

الجزء الثاني: يتضمن الأجهزة والمواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة.

الجزء الثالث: يشتمل على النتائج والمناقشة للطرائق الكهروكيميائية المستخدمة في الدراسة.

نتائج **التقدير غير المباشر للكارفيديلول** باستخدام تقنية فولتامتري الموجة المربعة وقطب الكاربون الزجاجي (GCE) بوصفه القطب العامل إذ تعتمد الطريقة على تتبع النقص الحاصل في تيار أكسدة حامض النتروز (HNO_2) والمحضر آنياً داخل الخلية الكهروكيميائية عند الجهد ١.٣٥ فولت نتيجة إضافة الكارفيديلول في الوسط الحامضي عند دالة حامضية ٢.٠٠– ٢.٢ ويتناسب انخفاض قيمة التيار(ΔIp) مع تركيز الكارفيديلول المضاف في الخلية وعند رسم العلاقة بين التركيز و(ΔIp) أعطت علاقتين خطيتين بمدى تركيز (٠.٤٩٩ – ٥.٩٩)$\times10^{-8}$ و(٦.٩٩ – ١١.٩٨) $\times$ 10^{-8} مولاري بمعاملي تقدير(R^2) 0.9937 و0.9574 على التوالي. طبقت الطريقة بنجاح لتقدير الكارفيديلول في المستحضرات الصيدلانية (الأقراص).

التقدير غير المباشر للهيدروكلوروثيازيد باستخدام تقنية فولتامتري الموجة المربعة وذلك عن طريق تتبع الانخفاض الحاصل في تيار موجة الاختزال لصبغة الأيروكرم الأسود T– (ERO-T) المطلية على سطح قطب الكرافيت (GE) بأستخدام تقنية الفولتامتري الحلقي وبمسح جهد من –٠.٥ الى ١.٥ فولت وهي من صبغات الآزو الفعالة كهربائياً وتعطي موجه اختزال عند الجهد – 0.16 فولت في وسط قاعدي عند الدالة الحامضية 9.0 حيث يحدث تداخل بين الصبغة وبين الهيدروكلورثيازيد ، وكانت العلاقة بين تركيز الهيدروكلوروثيازيد وقيم ΔIp خطية ضمن المدى من التراكيز (٩.٩٩–٥٣٠) $\times10^{-8}$ مولاري وقيمة معامل التقدير 0.9947. طُبقت الطريقة بنجاح لتقدير الهيدروكلوروثيازيد في مستحضره الصيدلاني (الأقراص).

تقدير الكارفيديلول بطريقة غير مباشرة عن طريق تداخله مع الكاشف ٤-هيدروكسي بنزالديهايد في وسط حامضي وباستخدام محلول من رباعي اثيل امونيوم رباعي فلورو بورات (TEATFB) بتركيز ٠.١٪ بوصفه الكتروليت مساند, وأُستخدمت تقنية فولتامتري الحلقي و قطب البلاتين بوصفه قطب عامل حيث يعطي ٤-هيدروكسي بنزالديهايد قمة أكسدة واضحة عند جهد ٠.٦٥ فولت وتيار

هذه القمة يتناقص مع إضافة محلول الكارفيديلول القياسي بتركيز ١×10^{-3} مولاري، وعند رسم العلاقة بين التركيز وIp_1 أو بين التركيز وΔIp_1 (التي تمثل الانخفاض في قيمة التيار للكاشف كنتيجة الإضافات المتعاقبة من الكارفيديلول) عند الموجة ٠.٦٥ فولت أعطت علاقة خطية وبمعامل تقدير 0.9495 وبمدى تركيز (٠.٠٩٩-٥٢.٣٨) ×10^{-6} مولاري.

التقدير غير المباشر للكارفيديلول بوجود الهيدروكلوروثيازيد من خلال تداخله مع الكاشف ٤-هيدروكسي بنزالديهايد في وسط حامضي وباستخدام محلول TEATFB بتركيز ٠.١٪ بوصفه الكتروليت مساند وتقنية الفولتامتري الحلقي مع قطب بلاتين بقطر (٢.٠ ملم) بوصفه قطب عامل وعند نفس الظروف المثلى المثبتة في الطريقة السابقة. عند رسم العلاقة بين التركيز و Ip_1 أو بين التركيز وΔIp_1 عند جهد ٠.٦٥ فولت أعطت علاقة خطية عند التركيز (٠.٠٩٩-٤٩.٧٥)×10^{-6} مولاري وهي تمثل التراكيز القليلة من الكارفيديلول بمعامل تقدير 0.9864، الطريقة أعطت امكانية تقدير الكارفيديلول بوجود الهيدروكلوروثايازيد والذي لايتفاعل مع الكاشف تحت نفس الظروف المثلى. ولوحظ ظهور موجة تأكسدية عن الجهد ٠.٢٥ فولت تابعة للكارفيديلول بعد انتهاء كمية الكاشف وعند رسم العلاقة بين التركيز والتيار عند الجهد ٠.٢٥ فولت أعطت علاقتين خطيتين عند التراكيز (٩.٩٩-٢٧.٩٢) ×10^{-6} مولاري و(٢٩.٩١-١٢٨.٣٣) ×10^{-6} مولاري وهي تمثل التراكيز العالية للكارفيديلول بوجود الهيدروكلوروثيازيد في المزيج وبمعاملي تقدير 0.9810 و0.9785 على التوالي. وعند مدى التراكيز (٧.٩٩٣ - ١٢٨.٣٣)×10^{-6} مولاري للمزيج تظهر موجة جديدة عند الجهد ١.٥ فولت وهي تابعة للهيدروكلوروثيازيد وعند رسم العلاقة بين التركيز والتيار عند ١.٥ فولت أعطت علاقتين خطيتين عند التراكيز (٧.٩٩٣-٢٩.٩١) ×10^{-6} مولاري (٤٩.٧٥-١٢٨.٣٣) ×10^{-6} مولاري بمعاملي تقدير ٠.٩٨٩١ و ٠.٩٣٧١ وهي تمثل التراكيز العالية من الهيدروكلوروثيازيد بوجود الكارفيديلول، طُبقت الطريقة بنجاح لتقدير الكارفيديلول بالتراكيز القليلة والعالية وتقدير الهيدروكلوروثيازيد بالتراكيز العالية في المستحضر الصيدلاني CO-Dilatrol.

التقدير المباشر للأتورفستاتين كالسيوم ثلاثي الماء بشكله النقي وفي مستحضره الصيدلاني عن طريق دراسة السلوك الكهروكيميائي لمحلوله على سطح قطب الذهب (٢.٠ ملميتر) بوصفه القطب العامل باستخدام تقنية الفولتامتري النبضي التفاضلي (DPV) وبوجود محلول بروتن – روبنسون المنظم عند دالة حامضية 2 بوصفه محلول الكتروليت مساند. دُرس السلوك الكهروكيميائي للأتورفستاتين كالسيوم ثلاثي الماء وتم اختبار الظروف المثلى إذ يعطي الأتورفستاتين كالسيوم ثلاثي الماء موجة تأكسدية واضحة عند جهد ١.٠٥ فولت ولوحظ زيادة في قيمة تيار الأكسدة مع زيادة تركيز الأتورفستاتين من خلال الإضافات المتعاقبة له في خلية القياس، وعند رسم العلاقة بين التركيز وبين التيار أعطت علاقة خطية بمدى تركيز (4.99-118.57) ×10^{-7} مولاري وبمعامل تقدير

0.9761، طُبقت الطريقة المقترحة بنجاح في تقدير الأتورفستاتين في المستحضرات الصيدلانية (الأقراص).

الفصل الرابع تضمن فصل وتقدير مزيج من الكارفيديلول والهيدروكلوروثيازيد باستخدام طريقة كروماتوغرافيا السائل عالٍ الأداء للطور العكوس (RP-HPLC), بعمود الفصل من نوع C_{18}, وكانت درجة حرارته ٢٣ درجة مئوية الطور المتحرك المتكون من (Methanol: Acetonitrile: 5% Phosphoric acid) وبالنسب الحجمية للمكونات (١٠:١٥:٧٥), ١.٠ مللتر/ دقيقة سرعة جريان للطور المتحرك، والقياس بالمكشاف من نوع Diode Array Detection عند الطول الموجي 230 نانوميتر. وأعطت نتائج فصل المزيج بظهور ذروة عند زمن احتجاز ٢.٧٣١ دقيقة وهي تابعة للهيدروكلوروثيازيد وذروة أُخرى عند زمن الاحتجاز ٨.٣٤٣ دقيقة وهي خاصة للكارفيديلول وكانت قيمة عامل الوضوح (R_S) ٤.٣٧٣ وهي قيمة تدل على الفصل الجيد بين القمم لوقوعها ضمن المدى المثبت بالأدبيات، لوحظ بأن العلاقة بين التركيز وبين قيمة المساحة للذروة لكل تركيز عند حقن ١٠ مايكروليتر من محلول المزيج، خطية التي تم قياسها في مدى التراكيز ٠.١-٣٠.٠ مايكروغرام/ مللتر، طُبقت الطريقة المقترحة بنجاح على تقدير الهيدروكلوروثيازيد والكارفيديلول في المستحضر الصيدلاني CO-Dilatrol (أقراص).

Summary

This thesis contains four chapters:

Chapter one: Involves a general introduction of studied drug compounds (carvedilol, hydrochlorothaizide and atorvastatin calcium trihydrade), their importance, their uses in the treatment of diseases, some of their physical and chemical properties, as well as the analytical methods used in the quantitative estimation of these drug compounds.

Chapter two: Includes the suggested spectrophotometric methods for the determination of drug compounds and it is consists of four parts:

First part: the spectrophotometric method for the determination of carvedilol using the condensation reaction between carvedilol and the reagent 4-hydroxybenzaldehyde in the presence of concentrated sulfuric acid. The reaction involved the formation of enamine with a red color formed in alcoholic media of absolute ethanol. The product is stable and gives maximum absorption at 533 nm. The Beer's law was applied within the concentration range of 0.5-5.0 µg/ml, and the molar absorption coefficient was 8.4627×10^4 l. mol^{-1}. cm^{-1}. The proposed method has been successfully applied in the determination of carvedilol in its pharmaceutical preparations (tablets).

Second part: this part involved an indirect spectrophotometric method for the carvedilol determination in aqueous media. This method depends on the oxidation of carvedilol in the presence of dilute hydrochloric acid with an excess of potassium peridolate as an oxidizing agent, and the remaining amount of the oxidizing agent works as a color shortness of eriochrome black-T, which is added to the reaction media and the color of the remaining dye is measured at 520 nm. The absorption is directly proportional to the amount of carvedilol. The optimum conditions were tested, Beer's law was applied within the concentration range of 0.5-15.0 µg/ml and the molar absorption coefficient was 1.1340×10^4 l. mol^{-1}. cm^{-1}. The suggested method has been successfully applied in the determination of carvedilol in its pharmaceutical formulations (tablets).

Third part involves a direct spectrophotometric estimation of hydrochlorothiazide by its reaction with the alizarine red –S in absolute methanol media through the formation of colored charge transfer copmplex solution that gives a maximum absorption at 537 nm. The relation between concentration and absorbance was linear within the concentration range of 0.1-2.5 µg / ml with the molar absorption coefficient equal to 1.2774×10^5 l. mol^{-1}. cm^{-1}. The method was successfully applied for estimation of hydrochlorothiazide in its pharmaceutical preparations (tablets).

Fourth part includes a direct spctrophotometric method for estimating of the atorvastatin calcium trihydrate through the nucleophilic addition reaction

(acetal formation) where atorvastatin as carboxylic acid in two hydroxyl groups with 2-Hydroxynaphthylaldehyde, with the presence of concentrated sulfuric acid to gave higher absorption at wavelength 580 nm. The relation between absorbance and concentration was linear within the concentration range of 0.1 - 5.0 µg / ml, ,the molar absorptivity was 5.3576×10^4 l. $mol^{-1}.cm^{-1}$. The proposed method was successfully applied for the estimation of calcium atorvastatin in its pharmaceutical preparations (tablets).

Chapter three: Involves the estimation of the studied drug compounds using different electrochemical techniques. This chapter includes three parts:

First part includes a general introduction to the electrochemical methods used in this study.

Second part includes the devices and chemicals used in this study.

Third part consists of the results and discussion for the electrochemical methods used in this study, this part can be divided into the following.

Results for **the indirect determination of carvedilol** using square wave voltammetric technique with glassy carbon electrode (GCE) as a working electrode. The method depends on the decrease in the oxidation peak current of nitrous acid (HNO_2), which was prepared simultaneously in the electrochemical cell. Nitrous acid gives well-defined oxidation peak appared at a 1.35 V versus Ag/AgCl sat.KCl in an acidic medium (pH 2.0-2.2), this peak is gradually decrease with the sequence addition of carvedilol standard solution. The plot of carvedilol concentration added and the differencess in peak current (ΔIp) gaves two straight lines within the concentration ranges $(0.499 - 5.99) \times 10^{-8}$ and $(6.99 - 11.98) \times 10^{-8}$ M with determination coefficients (R^2) 0.9937, 0.9574, respectively. The method was successfully applied for the determination of carvedilol in its pharmaceutical formulations (tablets).

Results for the **indirect determination of hydrochlorothiazide** using square wave voltammetric technique by following the decrease in the reduction peak current of the eriochrome black-T dye, at (-0.16) V in an alkaline media (pH = 9.0), plated electrochemically on the graphite electrode (GCE) surface. The relation between the hydrochlorothiazide concentrations and the ΔIp gives a straight line within the concentration range of $(9.99\text{-}530) \times 10^{-8}$ M with the determination coefficient (R^2) 0.9947. The method was successfully applied for the determination of hydrochlorothiazide in its pharmaceutical preparation (tablets).

Results for the **indirect determination of carvedilol through its interaction with 4-hydroxybenzaldehyde** in acidic media using a 0.1% solution of tetraethylammonium tetrafluoroborate (TEATFA) as a supporting electrolyte, cyclic voltammetric technique with 2mm platinum electrode as working electrode. 4-hydroxybenzaldehyde gives a well-defined

oxidation peak at 0.65 V, this peak decrease with the sequence additions of standard carvedilol solution (1×10^{-3} M). The plot of carvedilol concentration added versus Ip_1 or concentration versus ΔIp_1 at 0.65V gives straight line within the carvedilol low concentrations rang (0.099-52.38) $\times10^{-6}$ M with determination coefficients R^2= 0.9495.

Results for **the indirect determination of carvedilol in the presence of hydrochlorothiazide** through its interaction with 4-hydroxybenzaldehyde in acidic media using a 0.1% solution of TEATFA as supporting electrolyte, cyclic voltammetric technique with 2mm platinum electrode as working electrode, under the same measured optimum conditions. The plot of carvedilol concentration added versus Ip_1 or concentration versus ΔIp_1 at 0.65V gives straight line within the carvedilol low concentrations rang (0.099-49.75) $\times10^{-6}$ M with determination coefficients R^2= 0.9864. The method proved the possibility of carvedilol determination in the presence of hydrochlorothiazide, which does not interact with the reagent under the same conditions. Another oxidation peak appeared at 0.25V which is belonging to carvedilol after the amount of the reagent ended. The plot of carvedilol concentration and the peak current at 0.25V, gaves two straight lines within concentrations range (9.99-27.921) $\times$ 10^{-6} M and (29.91-128.33) $\times$ 10^{-6} M, which represent the high concentrations of carvedilol in the presence of hydrochlorothiazide in mixture with R^2 0.9810 and 0.9785 respectivly. At the mixture concentrations range (7.993 - 128.33) $\times$ 10^{-6} M, a new peak appared at 1.5V, which is attribute to the hydrochlorothiazide, and the plot of the hydrochlorothiazide concentration and peak current at 1.5V, gaves two straight lines within the concentrations range (7.993-29.91) $\times$ 10^{-6} M and (49.76-128.33) $\times$ 10^{-6} M, which represents the high concentrations of hydrochlorothiazide with carvedilol in mixture, with R^2 = 0.9891 and 0.9371respectivly. The method was applied successfully for the determination of carvedilol at low, high concentrations and hydrochlorothiazide at high concentrations in their pharmaceutical preparation (CO-Dilatrol).

Results for **the direct determination of atorvastatin calcium trihydrate** in pure form and in its pharmaceutical formulation using differential pulse voltammetric (DPV) technique, 2mm gold electrode as the working electrode and Britton-Robinson buffer (BRB) solution (pH 2) as supporting electrolyte. The electrochemical behavior of atorvastatin was studied, the optimum conditions were examined. Atorvastatin gives a well-defined oxidation peak at 1.05 V. An increase in the peak current was observed with the increasing additions of atorvastatin concentration. The relation between the concentration and the current was linear within the concentrations range (4.99-118.57) $\times$ 10^{-7} M with R^2 = 0.9761. The proposed method was

successfully applied for the determination of atorvastatin calcium trihydrate in its pharmaceutical preparations (tablets).

Chapter four: Includes the determination of carvedilol and hydrochlorothiazide in mixture using reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), C_{18} separation column, (Methanol :Acetonitrile: 5% Phosphoric acid) as mobile phase consisting of with the volumetric ratios of the components (75:15:10), 1.0 ml /min. flow rate of the mobile phase, the detector at a wavelength of 230 nm and a column temperature of 23 C^{o}. The mixture separation showed a peak at a retention time of 2.731 min., which is belong to hydrochlorothiazide, and another peak at a retention time of 8.343 min. which is refer to carvedilol. The value of resoulution factor (R_S) = 4.373, which is indicates a good separation occur between the peaks because it is located within the range mentioned by the literature. A linear relationship between the concentration and the peak area was observed within concentration range 0.1-30.0 μg / ml. The method was applied successfully for the determination of mixture of hydrochlorothiazide and carvedilol in their pharmaceutical formulation (CO-Dilatrol tablets).

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Chemistry

Determination of some Pharmaceutical Compounds using Spectrophotometric, Different Electrical and High Performance Liquid Chromatographic Methods

Ikhlass Thanoon Saleem Mohammed Al-Allaf

Ph.D. Thesis

Chemistry / Analytical Chemistry

Supervised by

Prof. Dr.Nabeel Sabeeh Othman **Prof. Dr.Amer Thanoon Al-Taee**

1444 A.H. **2023 A.D.**