Faculty of Pharmacy, Pharos University in Alexandria
Department of Pharmaceutical Chemistry

The use of robust analytical methodology for the determination of some pharmaceutical nitrogenous compounds in biological fluids and in their changeable matrices

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master

In

Pharmaceutical Chemistry

Presented by

Shaza Amr Mohamed Ebied

B.Sc. in Pharm. Sci., Faculty of Pharmacy, Pharos University in Alexandria, 2012

2021

P.U.A. Library
Central Medical Library (B)
Faculty of :
Serial No : 823
Classification : 615.19

PREFACE

Nitrogen-containing compounds occupy a prominent position as a vital source of therapeutic agents. They display an enormous structural diversity, in which nitrogen atoms can form part of simple functional groups or complex heterocyclic systems.
A large number of drugs recently approved by the FDA and currently available in the market are nitrogen-containing heterocyclic moieties. In the upcoming years, a large number of new nitrogen-based pharmaceuticals is anticipated, as the number of novel nitrogenous moieties with significant physiological properties and promising applications in medicinal chemistry is ever growing.

The fact that these compounds possess various applications in the medical field and are used as the building blocks of a number of new drug candidates , is probably attributed to the ability of the nitrogen atom to easily form hydrogen bonding and variable interactions with biological targets.

Among the newly FDA approved nitrogenous compounds are the novel oral anticoagulants (NOACs), that act as direct factor Xa inhibitors. These medications do not require frequent monitoring and have less inter- and intra- patient variability, thus, offering great benefits in treatment. Factor Xa inhibitors include apixaban (approved in December 2012), edoxaban (approved in January 2015) and rivaroxaban (approved in July 2011). Being a hot spot in medicinal chemistry, chemical science and pharmacotherapy, directed us to confine the work in the present thesis to the development of analytical methods for the analysis of these three drugs, either alone or in binary mixtures with the lipid-lowering drug rosuvastatin, in different changeable matrices: tablet excipients, biological fluids as plasma and in presence of forced degradation products whenever possible.

The techniques that we adopted ranged from simple spectrophotometry based on derivative, derivative ratio, absorbance difference (ΔA) and absorbance ratio difference, to more sophisticated ones such as High performance liquid chromatography (HPLC) and High performance thin layer chromatography (HPTLC). Finally, conclusions and recommendations were drawn from a comprehensive comparison made between the different methods applied to analyze the three mixtures under investigation.

ملخص الرسالة

استخدام طرائق تحليلية مرنة لتقدير بعض المركبات الصيدلية النيتروجينية في السوائل البيولوجية و في قوالبها الصيدلانية المتغيرة

تهدف هذه الدراسة إلى استحداث طرائق تحليلية للتقدير الكمي لبعض المركبات المختارة ذات الأهمية الصيدلية و ذلك في قوالبها الصيدلانية المختلفة: كمواد خام، في المستحضرات الصيدلية، و كذلك في العينات البيولوجية إما بمفردها أوفي وجود أدوية مساعدة أو نواتج تحللها.

تتكون الرسالة من أربعة فصول رئيسية :

الفصل الأول (١)

يحتوي هذا الفصل علي مقدمة عامة تشمل الاسم الكيميائي والتركيب الكيميائي و الوزن الجزيئي و الخواص الفيزيائية مثل الذوبان، بالإضافة للتأثير الأقربازيني والاستخدام الطبي للأدوية . كما يتضمن الطرق المنشورة بالتراث العلمي للمركبات قيد الدراسة سواء في المستحضرات الصيدلية أو في السوائل البيولوجية.

الفصل الثاني (٢)

يتناول هذا الجزء استحداث وتطبيق عدة طرق طيفية موثقة بسيطة ومباشرة لتحليل ابيكسبان أو ادوكسبان او ريفاروكسبان مع روسوفاستاتين في المخاليط الثنائية المخلوط معمليا. وتشمل الطرق المقترحة: أ- المشتقة التفاضلية الأولى والثانية والثالثة لمنحنى الامتصاص الضوئي، ب- المشتقة التفاضلية أو فرق الامتصاص الضوئي لمنحنى الامتصاص النسبي، ج- المشتقة التفاضلية لفرق الامتصاص لمنحني الامتصاص الضوئي. و قد تم تحليل الابيكسبان في المخلوط الأول مع روزوفاستاتين باستخدام المشتقة التفاضلية الثانية لمنحنى الامتصاص الضوئي و فرق الامتصاص الضوئي لمنحنى الامتصاص النسبي و المشتقة التفاضلية الأولى لمنحنى الامتصاص النسبي بدون أي تداخل من روزوفاستاتين. أما ادوكسبان في المخلوط الثاني مع روزوفاستاتين فقد احتاج إلى معالجة البيانات الرقمية باستخدام المشتقة التفاضلية الأول لمنحنى الامتصاص الضوئي و فرق الامتصاص الضوئي لمنحنى الامتصاص النسبي و المشتقة التفاضلية الأولى والثانية لفرق الامتصاص لمنحني الامتصاص الضوئي. وفي المخلوط الثالث الذي يحوي ريفاروكسبان مع روسوفاستاتين، تم تحليل ريفاروكسبان باستخدام المشتقة التفاضلية الثالث لمنحنى الامتصاص الضوئي و فرق الامتصاص الضوئي لمنحنى الامتصاص النسبي. و تم تحليل روسوفاستاتين باستخدام المشتقة التفاضلية الأولى لمنحنى الامتصاص الضوئي في المخاليط الأول والثاني و المشتقة التفاضلية الثانية لمنحنى الامتصاص الضوئي في المخلوط الثالث و المشتقة التفاضلية لفرق الامتصاص لمنحني الامتصاص الضوئي في المخلوط الثاني. و تم الحصول على علاقات خطية بين القراءات و تركيزات الأدوية محل الدراسة تحت الظروف المذكورة بنجاح وكانت قيمة معامل الارتباط حوالى ٠.٩٩٩ ، كما تم تطبيق الطرق المقترحة بنجاح لتحليل المركبات الأربعة في المخاليط المحضرة معمليا والمستحضرات الصيدلية وكان متوسط قيم الاسترداد بين ٩٨– ١٠٢ % وقيم الانحراف المعياري النسبي أقل من ٢ %. وقد تم توثيق المصداقية للطرق المقترحة طبقاً لإرشادات مؤتمر التوافق الدولي والتي أوضحت حسن الأداء من حيث العلاقة الخطية والحساسية والدقة والتكرارية والثبات و الحدود الدنيا للقياس و التقدير الكمي.

الفصل الثالث (٣)

يتناول هذا الفصل عرض طريقة مستحدثة، دالة على الثبات وعالية الانتقاء باستخدام كروماتوجرفيا السائل ذات الأداء العالي للتقدير المتزامن ابيكسبان وروزوفاستاتين باستخدام ادوكسبان كمعيار داخلي (مخلوط ١) و ادوكسبان وروزوفاستاتين باستخدام ابيكسبان كمعيار داخلي (مخلوط ٢) و ريفاروكسبان وروزوفاستاتين باستخدام ادوكسبان كمعيار داخلي (مخلوط ٣) و ذلك في الحالة النقية و كذلك في المادة الخام والمستحضرات الصيدلية والبلازما البشرية. و تمت عملية الفصل الكروماتوجرافي بنجاح باستخدام عمود الطور العكسي ك ١٨ (زورباكس إكليبس) و نظام متدرج لتغيير نسب الطور المتحرك المكون من خليط من ماء حامضي (ا) واسيتونيتريل (ب). وبدأت عملية الفصل بنسبة ٨٠:٢٠ (ب:أ) لمدة دقيقتين ثم تم تغييرها خطياً إلى ٢٠:٨٠ (ب:أ) حتى عشر دقائق. و تم ضبط معدل تدفق الطور المتحرك عند ١ مل/دقيقة و تم ضبط كاشف امتصاص الضوء عند طول موجة ٢٩١ ن م لقياس جميع المركبات.

وقد تم تعيين العقاقير السابق ذكرها بعد ٧.٨٦و ٥.٧٩و ٧.٨٥ و ٨.٩١ دقيقة ابيكسيان وادوكسبان وريفاروكسبان وروزوفاستاتين علي التوالي. وكانت العلاقة خطية في مدى تركيزات يتراوح بين ٢.٥ - ٤٠ ميكروجرام/مل للعقاقير الأربعة وكان معامل الارتباط ٠.٩٩٩ ، وقد تم وضع العقاقير في ظروف تكسير مشددة متمثلة في التحليل المائي في وسط حامضي وقلوي ومتعادل وظروف مسببة للأكسدة والأكسدة الضوئية والتكسير الحراري. وأثبتت الطريقة المقترحة أنها دالة على الثبات و ذلك بقدرتها على فصل العقاقير قيد الدراسة عن نواتج تكسيرها. وتم تطبيق الطريقة بنجاح للتحليل المتزامن للعقاقير في المخاليط المحضرة معملياً والمستحضرات الصيدلية. وكان متوسط قيم الاسترداد بين ٩٨ – ١٠٢ % وقيم الانحراف المعياري النسبي أقل من ٢ %. أما بالنسبة للبلازما البشرية فكانت العلاقة خطية على مدى١.١٣ – ٢.٦٤ ميكروجرام/مل ادوكسبان وريفاروكسبان و روزوفاستاتين و ٠.٥٥ – ٢.٦٠ ميكروجرام/مل ابيكسيان وكان معامل الارتباط أعلي من ٠.٩٩٨. و قد تم توثيق المصداقية للطريقة المقترحة طبقاً لإرشادات مؤتمر التوافق الدولي و لدستور الأدوية الأمريكي والتي أوضحت حسن الأداء من حيث العلاقة الخطية والتكرارية والدقة و الحساسية والثبات.

الفصل الرابع (٤)

يعرض هذا الفصل التحليل المتزامن لثلاثة مخاليط مكونة من ابيكسبان وادوكسبان وريفاروكسبان (أدوية مانعة للتجلط) مع روزوفاستاتين (دواء خافض للكوليسترول) باستخدام طريقتين تعتمدان على كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة ذات الأداء العالي. و قد تم الفصل الكروماتوجرافي باستخدام شرائح رقيقة من السيليكا كوسط ثابت و خليط من (التولوين: أسيتات الإيثيل :الميثانول :الأمونيا) بنسبة (٣.٥: ٤.٥: ٢: ٢.٠) كوسط متحرك (الطريقة رقم ١)، و مكون من (الميثانول: الأمونيا) بنسبة (٩٫٩٥:٠٫٠٥) (الطريقة رقم ٢) يتم بعد ذلك قياس الكثافة الضوئية للبقع المفصولة عند طول موجة ٢٩١ ن م لتقدير جميع المركبات.المفصولة. و كان معامل الإعاقة ٦٥يساوي ٠٠ ± ٠١,٠ و ٢٠,٠ ± ٠١,٠ و ٧٥,٠ ± ٠٢,٠ و ١٠,٠ ± ٠١,٠ ابيكسبان و ادوكسبان و ريفاروكسبان و روزوفاستاتين على التوالي باستخدام الطريقة رقم ١ و كان يساوي٤ ٠٠ ± ٠٢,٠ و ٩٠,٠ ± ٠٢,٠ ادوكسبان و روزوفاستاتين على التوالي باستخدام الطريقة رقم ٢. و قد ثبت خطية العلاقة بين المساحات تحت القمم و التركيزات في مدى تركيزات ٥- ٤٥ ميكروجرام/مل لجميع المركبات و ذلك في صورتها النقية، في المادة الخام و المستحضرات الصيدلية أما في البلازما البشرية فكانت العلاقة الخطية في مدى تركيزات ١,١٣٢ – ٢,٦٤٠ ميكروجرام/مل ابيكسبان و ريفاروكسبان و روزوفاستاتين باستخدام الطريقة رقم ١ و ١,١٣٢- ٢,٨٣٠ ميكروجرام/مل ادوكسبان و روزوفاستاتين باستخدام الطريقة رقم ٢. و قد تم تطبيق الطريقتين المستنبطتين في هذا الفصل بنجاح في التقدير المتزامن للمخاليط الثلاثة في المستحضرات الصيدلية و الأقراص المخلوطة معملياً و كذلك في البلازما البشرية المضاف إليها هذه المركبات بلا أي تداخل سواء من الصواغات الصيدلية أو من مكونات البلازما. و قد تم توثيق مصداقية الطريقتين الموصوفتين طبقاً لإرشادات مؤتمر التوافق الدولي و لدستور الأدوية الأمريكي.

وتحتوي الرسالة على ملخص باللغة العربية وآخر باللغة الانجليزية وقائمة بالمراجع العلمية التي استخدمت في البحث. وتقع الرسالة في ١٤١ صفحة وتحتوى على ٥٠ جدولاً و ٤٢ شكلاً و٧٢مرجعاً وفي مقدمة الرسالة توجد قائمة بالاختصارات والجداول والأشكال و الرسالة مذيلة بملخص باللغتين العربية و الأنجليزية.