

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı

27467

**KLOMİPRAMİN HİDROKLORÜRÜN
2,3 - DİKLORO - 5,6 - DİSİYANO - p - BENZOKİNON (DDQ) İLE
SPEKTROFOTOMETRİK MİKTAR TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Filiz ARIÖZ
Kimyager**

**Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi**

**Danışman
Prof. Dr. Lale ERSOY**

**İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İSTANBUL - 1993

TEŞEKKÜR

Bu Araştırmanın yapılmasına olanak sağlayan İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Sedat İMRE'ye, değerli yardımları ile bu çalışmayı hazırlamama öncülük eden Sayın Hocam Prof.Dr. Lale ERSOY'a, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof.Dr. Emre DÖLEN'e Teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1- GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2- GENEL BÖLÜM.....	3
2.1. KLOMİPRAMİN HİDROKLORÜR HAKKINDA GENEL BİLGİ.....	3
2.1.1. Özellikleri.....	3
2.1.2. Analiz Yöntemleri.....	5
2.1.2.1. Kalitatif Analiz Yöntemleri.....	5
2.1.2.2. Kantitatif Analiz Yöntemleri.....	6
2.2. 2,3-DİKLORO-5,6-DİSİYANO-p-BENZOKİNON (DDQ) İLE YAPILAN ANALİZLER.....	10
3- DENEYSSEL BÖLÜM.....	15
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYAL.....	15
3.1.1. Kimyasal Madde ve Çözücüler.....	15
3.1.2. Gereçler.....	15
3.2. KLOMİPRAMİN HİDROKLORÜRÜN DDQ İLE MİKTAR TAYİNİ.....	16
3.2.1. Deney Koşullarının Saptanması.....	16
3.2.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması.....	21
3.3. FARMASÖTİK PREPARATLARDA KLOMİPRAMİN HİDROKLORÜR MİKTAR TAYİNİ.....	23
3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem.....	23
3.3.1.1. Dragelerde Analiz.....	23
3.3.1.2. Enjektabl Preparatlarda Analiz.....	24
3.3.2. Farmakope Yöntemi.....	24
3.3.2.1. Dragelerde Analiz.....	24
3.3.2.2. Enjektabl Preparatlarda Analiz.....	24
4- SONUÇLAR	25
4.1. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİN İSTATİSTİKİ YOL İLE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	25
4.2. GELİŞTİRİLEN YÖNTEM İLE FARMAKOPE YÖNTEMİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	27

5- TARTIŞMA.....	30
6- ÖZET.....	33
7- SUMMARY.....	35
8- KAYNAKLAR.....	37



1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Trisiklik antidepresanlar grubundan olan klomipramin, hidroklorür tuzu halinde çeşitli sebeplere bağlı depresyon tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Klomipramin hidroklorürün özellikle vücut sıvılarından analizi için literatürde birçok gaz kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Piyasada tablet ve enjektabl preparatları halinde bulunan bu ilaç maddesinin miktar tayini için farmakope- de titrimetrik yöntem kayıtlıdır. Literatürde klomipraminin farmasötik preparatlarından miktar tayini için geliştirilmiş sınırlı sayıda spektrofotometrik yöntem bulunmaktadır.

İlaç etken maddelerinin analizinde, daha seçici olmaları nedeniyle UV spektrofotometrik yöntemlere üstünlük gösteren, uygun bir belirteçle oluşturulan renk şiddetinin ölçülmesine dayanan vizibl spektrofotometrik yöntemlerden sıkça yararlanılmaktadır.

Aminler gibi elektron donörü bir ödevli grup içeren maddeler, DDQ, TCNQ, kloranil gibi bir π akseptörü olan belirteçlerden radikal anyon oluşturmaktadır. Renkli özellikteki bu radikal anyondan yararlanılarak bazı ilaç maddelerinin spektrofotometrik analizi yapılmıştır.

Bu çalışmada klomipramin hidroklorürün, 2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzokinon (DDQ) belirtecinden oluşturduğu

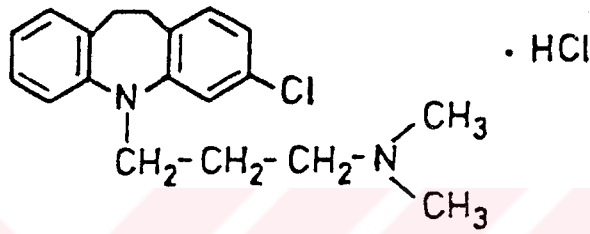
renkli radikal anyondan yararlanılarak spektrofotometrik tayini için basit ve kolay uygulanabilen bir yöntem geliştirilmesi ve farmasötik preparatlarında etken maddenin analizinde yararlanılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BÖLÜM

2.1. KLOMİPRAMİN HİDROKLORÜR HAKKINDA GENEL BİLGİ

2.1.1. Özellikleri



Klomipramin hidroklorür

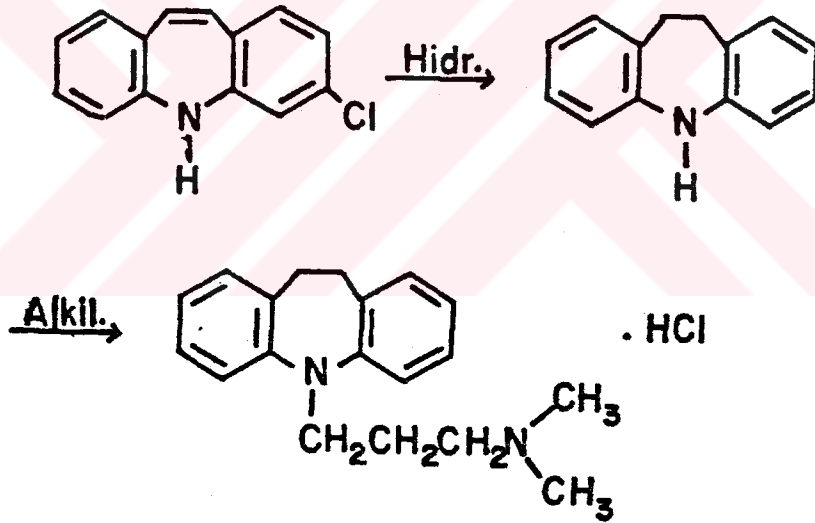
Kimyasal adı 3-kloro-5-(3-dimetilaminopropil)-10,11-dihidro-5-H-dibenz [b,f] azepin hidroklorür olan klomipramin hidroklorürün ($C_{19}H_{23}ClN_2 \cdot HCl$) molekül ağırlığı 351.3 tür.

Kokusuz ve beyaz renkli bir toz olan bu ilaç maddesi, acı lezzetli ve hafif uyuşturucu etkilidir. Su, etilalkol, kloroform ve eterde çözünen klomipramin hidroklorürün erime derecesi $192^{\circ}C$ 'dir (1).

Sulu asitli çözeltisinin UV alandaki absorpsiyon spektrumunda 251 nm de bir maksimum (1) gözlenir. Potasyum bromür diski ile alınan IR spektrumunda 3440, 2900, 1590 cm^{-1} ile 1000-1200 cm^{-1} ve 700-750 cm^{-1} alanlarında bandlar verir.

Craik ve arkadaşları klomipraminin ^{13}C ve ^1H NMR spektrumları üzerine bazı çalışmalar yapmışlardır(2).

Klomipramin hidroklorürün sentezi Craig ve arkadaşları tarafından başlangıç maddesi olarak 3,4-dikloro akridan kullanılarak yapılmıştır. 3,4-dikloroakridanın sırasıyla sodyum siyanür, asitli ortamda sodyum nitrit, tiyonil klorür, lityumalüminyum hidrür ve fosfor pentaoksit ile muamele edilmesinden sonra elde edilen 3-Cl-5H-dibenzazepinin katalitik hidrojenleme ve 3-dimetilaminopropil klorür ile alkilasyon işlemlerinden sonra klomipramin hidroklorür elde edilmiştir (3).



Klomipramin özellikle tedaviye dirençli depresyon vakalarında etkili olan ve klinikte uzun zamandan beri kullanılan bir antidepresandır. Diğer trisiklik antidepresanlar gibi nörotransmitterlerin geri alımını inhibe ederek etki ettiği ve bu grup ilaçlar arasında serotoninin geri alımını engelleyen en güçlü trisiklik olduğu bildirilmiştir(4). Aynı makalede klomipraminin ayrıca obsessif, kompul-

sif ve panik hastalığı vakalarında da etkili olduğu kayıtlıdır.

Ağızdan alındığında klomipramin, mide barsak kanalından tamamen emilir ve karaciğerde demetilasyon sonucunda önemli miktarda birinci aktif metaboliti olan demetilklomipramine dönüşür. Bundan başka hidrosilasyon ve N-oksidasyon ile de diğer metabolitler oluşur. Alınan dozun % 1-3 kadarı vücutta değişikliğe uğramadan atılır(4, 5).

2.1.2. Analiz Yöntemleri

2.1.2.1. Kalitatif Analiz Yöntemleri

Klomipramin hidroklorürün teşhisi için İngiliz farmakopesinde (BP)(6 s.147) IR spektrumunun referans maddeninki ile aynı olması, 0.1 M HCl çözeltisindeki % 0.003'lük çözeltisinin UV spektrumunda 252 nm de bir omuzun gözlenmesi gerektiği kayıtlıdır. Ayrıca klorürler için karakteristik gümüş nitrat reaksiyonuna olumlu yanıt verdiği bildirilmiştir. İnce tabakada saflık kontrolü için silikajel plakta etilasetat-aseton-amonyak(75:25:5) çözücü sistemi ile kromatografi işlemi önerilmektedir. Belirteç çözeltisi sülfürik asitteki potasyum bikromat çözeltisidir(6).

Klomipraminin bazik özellikteki birçok ilaç maddesi ile birlikte ince tabakada teşhisi amacıyla literatürde birçok sistem kayıtlıdır(7-9). Çok sayıda antidepresan ve metabolitlerinin kalitatif analizi için gaz kromatografisi-

kütle spektrometrisi yönteminden de yararlanılmıştır(10,11). Benzer amaçla OV-17 sütunda trimetilsilil türevlerinin ayrılması ve teşhisi (12) ile kapiler sütunlarda analizler (13-15) yapılmıştır.Vücut sıvılarında klomipramin ile benzer yapılı pek çok ilaç maddesi normal fazlı (16) ve ters fazlı (17,18) sıvı kromatografisi yöntemi ile teşhis edilmiştir.

Kromatografik çalışmalardan başka yöntemlerden de bu tür maddelerin kalitatif analizinde yararlanılmıştır.Örneğin klomipramin ile birlikte trisiklikamino grubu içeren oniki ilaç maddesi sodyum tauroklat ile oluşturdukları iyon çiftinden yararlanılarak analiz edilmiştir(19).Benzer yapılı psikotropik maddelerin kalitatif analizi ve saflık tayininde termoanalitik (20,21), kalorimetrik (22), fosforimetrik (23) ve elektroanalitik (24) çalışmalar yapılmıştır.

2.1.2.2. Kantitatif Analiz Yöntemleri

Klomipramin hidroklorürün ham madde analizi için BP de susuz ortamda titrasyon yöntemi kayıtlıdır (6).Madde nin glasiyel asetik asitteki çözeltisi, civa (II) asetat çözeltisi katıldıktan sonra ayarlı perklorik asit çözeltisi ile titre edilmektedir.

Literatürde klomipraminin farmasötik preparatlarda başka titrimetrik yöntemlerle de miktar tayinleri kayıtlıdır.Örneğin sodyum tetrafenilborat ile potansiyometrik (25) ve perklorik asit ile termometrik (26) titrasyonlar yapılmıştır.

Klomipraminin kantitatif tayini için titrimetrik analizlerden başka bazı spektrofotometrik yöntemler de geliştirilmiştir.Örneğin klomipramin ile imipramin ve metabolitleri, kan ve idrardan organik çözücü ile ekstre edildikten sonra sodyum nitrit ve perklorik asitle reaksiyona sokularak analiz edilmiştir (27).

Pitarch ve arkadaşları onsekiz siklik yapıda antidepresanın analizi için çeşitli belirteçlerle oluşturdukları iyon çiftlerinden yararlanmıştır (28).Hussein ve arkadaşları ise bazı dibenzazepinlerin miktar tayini için iki farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir (29).Bunlardan birinde diazolanmış p-nitroanilinden diğerinde ise 3-metil benzotiazolin-2-on-hidrazon ile demir (III) amonyum sülfatan yararlanılmıştır.Her iki yöntem tabletlerin analizine uygulanmıştır.

Bunlardan başka yine farmasötik preparatlarda dibenzazepin türevleri için geliştirilen yöntemlerde pikril klorür (30) ve asitli ortamda potasyum bikromat (31) kullanılmıştır.Çalışma alanınının 0,4-2,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olduğu birinci yöntemde kloroformda ki çözeltinin 395 nm deki absorpsansı, 5-50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olduğu ikinci yöntemde ise 670 nm deki absorpsans ölçülmüştür.

Maddenin tanınmasında kullanıldığı gibi özellikle biyolojik materyalden miktar tayininde de kromatografik yöntemlerden yararlanılmıştır.Geliştirilen bu yöntemlerde klomipraminin metabolitleri ile ya da birçok ilaç maddesi ile birlikte analizleri yapılmıştır.

Klomipramin ve metabolitleri plazmadan ekstre edildikten sonra metabolitleri pentafloropropionik anhidrit ile türevlendirilmiş ve % 3 OV-17 sütunda azot seçici dedektör kullanılarak gaz kromatografik yöntemle analiz edilmiştir (32). Benzer bir çalışmada ise klomipramin ve diğer trisiklik antidepresanlar aynı sütunda ve türevlendirme işlemi uygulanmaksızın ölüm sonrası vücut sıvıları ve dokularında analiz edilmiştir (33). Bu grup ilaç maddelerinin plazmadan organik çözücülerle ekstre edildikten sonra ayrılmaları ve miktar tayinleri OV-25 (34), OV-225 (35) ve % 10 OV-17 (36) sütunları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda da azot seçici dedektörden yararlanılmıştır. Bazı araştırmacılar plazmadan analizde ön temizleme amacıyla C₁₈ kartuşlardan yararlanmıştır (37,38).

Aynı dedektör kullanılarak klomipraminin diğer antidepresanlar ile birlikte kapiler sütun kullanılarak da kan (39) ve karaciğerden (40) uygun çözücülerle ekstraksiyon işleminden sonra analizleri yapılmıştır.

Karlsson tersiyer amin grubu içeren benzer yapılu maddelerin plazmadan analizleri için 2,4-diklorofenil ve pentafluorofenil kloroformatın kullanıldığı yeni bir türevlendirme yöntemi geliştirmiştir (41). Oluşan türevler % 3 OV-17 sütunda ayrıldıktan sonra elektron yakalayıcı dedektör ile değerlendirilmişlerdir.

Klomipramin ve metabolitlerinin vücut sıvılarında diğer trisiklik antidepresanlar ile birlikte analizinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yönteminden de yararlan-

nılmıştır. Bu analizlerde duyarlık sınırı genellikle 5-10 ng ml⁻¹ olarak bildirilmiştir.

Plazmadan ekstre edilerek kısmen diğer maddelerden ayrılan, analiz edilecek maddelerin silikajel sütun kullanarak normal fazlı sıvı kromatografisi tekniği ile tayinleri yapılmışsa da (42-44) literatürde ters faz tekniği ile yapılan çalışmaların sayısı daha fazladır.

C₈ ve C₁₈ sütunlarda yapılan analizlerde hareketli faz olarak genellikle asetonitril-fosfat çözeltisi karışımları kullanılmıştır. Bu çalışmalarda vücut sıvılarından ekstraksiyon (45-48) veya reçine sütundan geçirme (49) gibi ön temizleme işlemi uygulanmış ve maddelerin saptanmasında UV-absorbans dedektör kullanılmıştır.

Klomipramin ile benzer yapıdaki ilaç maddeleri ve metabolitlerinin analizinde CN sütunlardan da yararlanılmıştır (50,51). Klomipraminin HPLC de iyon çifti tekniği ile de analizi yapılmıştır. Plazma ve idrardan, önce organik çözücüye sonra asitli fosfat tamponu çözeltisine ekstre edilen klomipramin ve dört metaboliti sütundan tetrametilamonyum klorürlü fosfat tamponu ve asetonitril karışımı ile elüe edilmiştir. Elektrokimyasal dedektörün kullanıldığı bu çalışmada tayin sınırı 0,2 ng ml⁻¹ olarak bildirilmiştir (52).

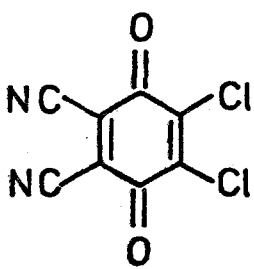
Klomipramin ve diğer trisiklik antidepresanların biyolojik materyalden herhangi bir ön temizleme işlemine gerek olmadan doğrudan analizleri için "radyoimmunoassay"

yöntemi de geliştirilmiştir (53,54).Basit ve kolay uygulanabilen bu yöntem ile adli tıp laboratuvarlarında antidepresanların rutin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı bildirilmiştir (54).

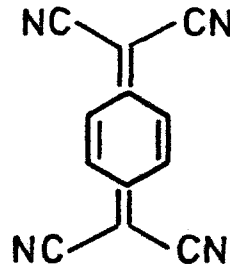
2.2. 2,3-DİKLORO-5,6-DİSİYANO-p-BENZOKİNON (DDQ) İLE YAPILAN ANALİZLER

Amin grubu gibi elektron verme özelliğinde olan ödevli grup içeren maddeler, π akseptörleri olarak tanımlanan elektron alma özelliğindeki bazı bileşikler ile etkileşerek, çözücünün polaritesine bağlı olarak renkli yük transfer kompleksleri veya radikal anyonlar oluştururlar. Bu reaksiyondan yararlanılarak amin grubu içeren maddelerin spektrofotometrik yöntemle miktar tayinleri yapılmıştır.

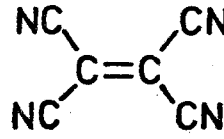
Bu amaçla π akseptörü olarak en çok kullanılan maddeler; 2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzokinon (DDQ), 7,7,8,8-tetrasiyanokinodimetan (TCNQ), tetrasiyanoetilen (TCNE), kloranil, bromanil, floranil ve benzokinondur.



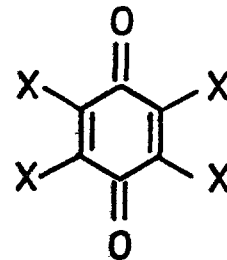
DDQ



TCNQ



TCNE



X = Cl : kloranil
X = Br : bromanil
X = F : floranil
X = H : benzokinon

TCNE belirteci ile tersiyer aminlerin (55), fenoller, aromatik hidrokarbonlar ve aril eterlerin (56) ve ince tabakada indollerin (57) analizi yapılmıştır.

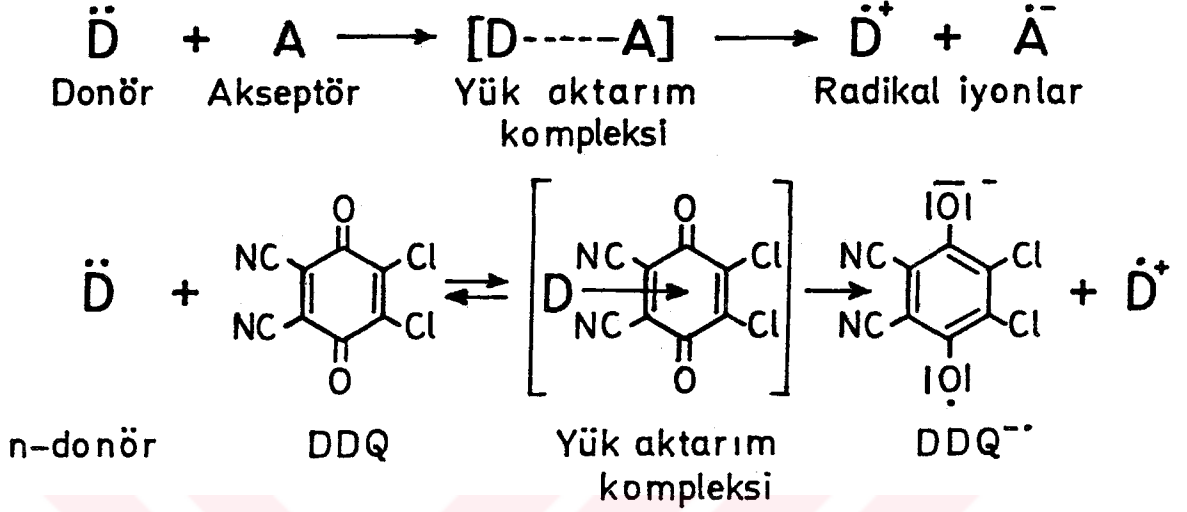
Bazı alkaloitlerin analizinde TCNQ diğer π akseptörleri ile kıyaslanmıştır (58). Ayrıca prokainin (59) ve bazı antihistaminiklerin (60) analizinde de TCNQ dan yararlanılmıştır.

Alifatik ve aromatik primer, sekonder ve tersiyer aminlerin (61) propanol-dioksan karışımında bazı trankilizan ve antidepresanların (62) dioksan-etanol karışımı içerisinde kloranil belirteci kullanılarak miktar tayinleri yapılmıştır. Glisiazid ve tolazamidin kantitatif analizi ise bromanil belirteci ile yapılmıştır (63).

Hassan ve arkadaşları alifatik primer ve sekonder aminlerin benzokinon ile miktar tayinlerini yapmış ve en uygun reaksiyon koşullarını incelemişlerdir (64).

DDQ belirteci ile yapılan miktar tayinlerinin çoğunluğu amin grubu içeren maddelerle etkileşim sonucu DDQ radikal anyonu oluşumuna dayanan spektrofotometrik analizlerdir.

Aşağıdaki reaksiyon denklemlerinde görüldüğü gibi amin grubu içeren maddeler, n-donörler, ile π akseptörü DDQ nun etkileşmesi sonucunda yük aktarım komplekslerinin meydana geldiği ve metanol, asetonitril gibi polar çözücüler içerisinde donörden akseptöre tam bir elektron transferi



sonucu kırmızı renkli DDQ radikal anyonunun oluştuğu bildirilmiş (65-68) ve radikal anyonun ESR spektrumu da verilmiştir (65,66).

DDQ belirteci ile bu şekilde birçok maddenin analizi yapılmıştır. Kodein, emetin ve pilokarpinin (65), bazı tranquilizan ve antidepresanların (66), bazı antimaleryal ilaçların (67), sekonder ve tersiyer amin grubu içeren kardiovasküler ilaçların (69) miktar tayinleri, DDQ ile oluşturdukları radikal anyonun 460 nm de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışmaların tümünde geliştirilen yöntem farmasötik preparatlarda etken madde analizine uygulanmıştır.

Elsayed ve arkadaşları bazı kardiovasküler ilaçların analizinde DDQ ile p-kloranik asit ve diklorofenilindfenol

belirteçlerini kıyaslamışlar ve yük aktarım komplekslerinin oluştuğunu bildirmişlerdir (70). Bazı alkaloitlerin (58) ve imidazolin (68) türevlerinin analizinde DDQ belirteci ile TCNQ, kloranil, floranil gibi diğer bazı π akseptörlerinin kıyaslaması yapılmıştır. Kinapiramin sülfat (71) ile veteriner hekimlikte kullanılan bazı antihelminetiklerin (72) analizinde ise DDQ, TCNQ ve tetranitrofluorenon (TNF) belirteçleri ile elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır.

Aksal ve arkadaşları penisilin türevlerinin analizinde DDQ ve TCNQ dan yararlanmışlardır (73). Kinnarizin (74) ve sefalosporinlerin (75) miktar tayinleri de DDQ belirteci ile 460 nm deki absorbanans ölçülerek yapılmıştır.

DDQ ile yapılan bu benzer çalışmalardan başka literatürde aynı belirteç ile farklı koşullarda yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin adrenalin ve noradrenalinin DDQ ile miktar tayininde 350 ve 390 nm lerdeki absorbanans ölçülmüştür (76). Piperazinin asetaldehit ile oluşturduğu N,N-divinilpiperazinin DDQ ile reaksiyonu farklı çözücülerde incelenmiş ve miktar tayininin dioksanda 570 nm veya dikloroetanda 600 nm deki absorbanans ölçülerek yapılabileceği bildirilmiştir (77).

Minakata ve arkadaşları bazı fenotiyazin türevlerinin miktar tayinini perklorik asit çözeltisinde yapmış ve çalışma alanını $0,5-10 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bildirmişlerdir (78).

DDQ belirtecinden, bazı maddelerin ince tabakada ayrılmalarından sonra püskürtme belirteci olarak da yararlan-

nılmıştır.Örneğin Karbozollerin (79), alkaloitlerin (80) ve bazı triterpenler ile steroidlerin (81) ince tabakada belirlenmelerinde diğer π akseptörlerinin çözeltilerinin yanısıra DDQ çözeltisinden de yararlanılmıştır.

Bu çalışmalardan başka DDQ çözeltisinden titrant olarak da yararlanılmıştır.Farmasötik preparatlarda askorbik asit, dipiron, penisilamin (82) ile bazı fenotiyazinlerin (83) titrimetrik analizi DDQ ayarlı çözeltisi ile yapılmıştır.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MATERYAL

3.1.1. Kimyasal Madde ve Çözücüler

Çalışmada klomipramin hidroklorür¹ , Anafranil[®] draje ve ampul¹ , 2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzokinon (DDQ)² , kloroform³ , asetonitril³ (HPLC grade), metanol³ , diklormetan³ , dimetilformamit⁴ , amonyak³ , perklorik asit³ , glasiyel asetik asit³ , susuz sodyum sülfat³ ve distile su kullanıldı.

Belirteç çözeltisi: % 0,08 konsantrasyonda asetonitrilde hazırlanan DDQ çözeltisi, +4 °C de en az bir hafta dayanıklıdır.

3.1.2. Gereçler

Analitik çalışmada Zeiss PMQ II, absorpsiyon spektrumlarının alınmasında ise Shimadzu 2100 spektrofotometreden yararlanıldı. Ölçmelerde 10 x 10 x 45 mm lik cam küvetler kullanıldı.

-
- 1) Ciba-Geigy Ltd. İstanbul-Türkiye.
 - 2) Sigma, Deisenhofen-Deutschland.
 - 3) Merck, E.Merck A.G. Darmstadt-Deutschland.
 - 4) Ferak, Berlin-Deutschland.

Çalışmada kullanılan diğer gereçler, terazi (Mettler H 72), girdap karıştırıcı (Elektro-mag), su banyosu (Nüve 400 SB), ultrasonik banyo (Bransonic 221), çalkalayıcı (Köttermann), mikro enjektör (Hamilton) ve bazı cam malzemelerdir.

Hesaplamalar Casio fx-3800 P hesap makinesi ile yapıldı.

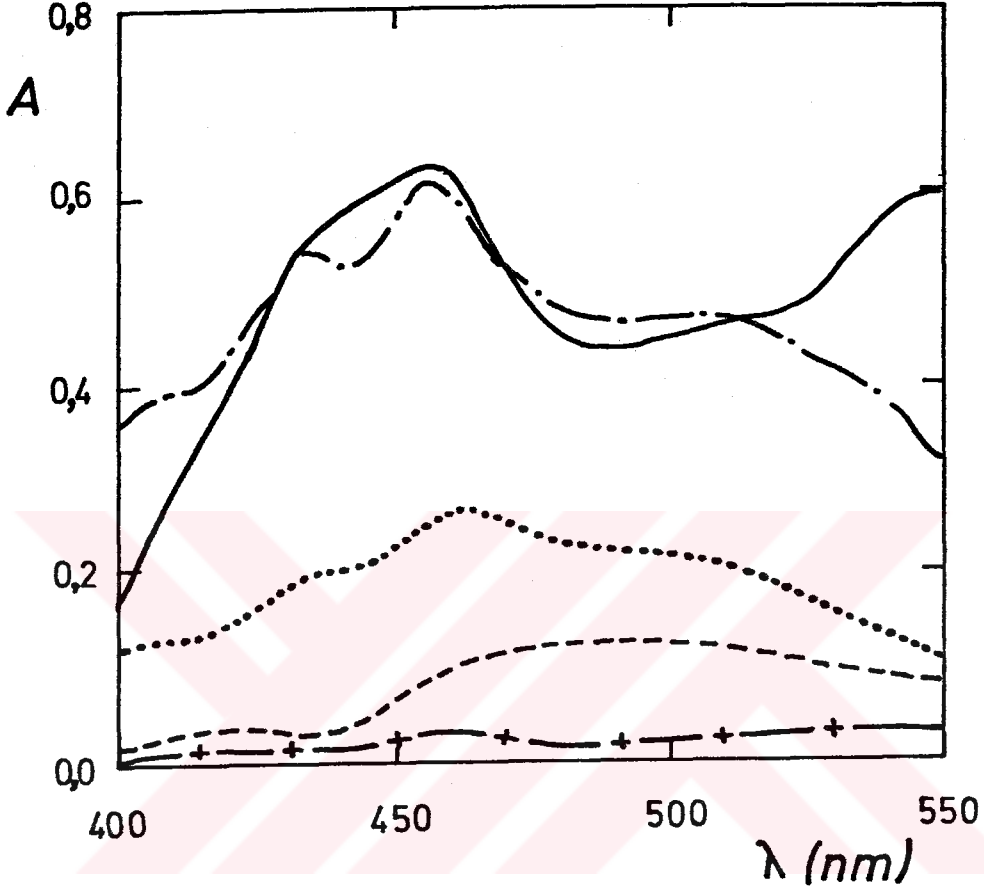
3.2. KLİMİPRAMİN HİDROKLORÜRÜN DDQ İLE MİKTAR TAYİNİ

3.2.1. Deney Koşullarınının Saptanması

Yapılan literatür araştırmasından π akseptörleri ile olan reaksiyonlarda amin grubu içeren ilaç maddelerinin tuzları halinde değil bazı şekline dönüştürüldükten sonra reaksiyon verdiği gözlemlendi. Bu nedenle bazını elde etmek için klomipramin hidroklorür, suda çözündürüldü ve seyr. amonyak çözeltisi ile bazik hale getirildikten sonra kloroform ile ekstre edildi. Susuz sodyum sülfat üzerinden süzülen kloroform tabakaları belli bir hacme tamamlandı.

Klomipraminin DDQ ile olan reaksiyonu için en uygun çözücü belirlemek amacıyla, kloroform, diklormetan, dioksan, metanol ve asetonitril gibi farklı çözücüler ile çalışıldı. Bunun için klomipraminin yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan kloroformdaki çözeltisinden aynı hacimlerde alınıp çözücü buharlaştırıldı. Arta kalan klomipramin baz, denenecek çözücüde çözündürüldükten sonra DDQ nun aynı çözücüdeki çözeltisinden katıldı ve karışım belli bir hacme

tamamlandı.Çözeltilerin absorpsiyon spektrumları boş deneme çözeltilerine karşı kaydedildi.ŞEKİL 1'de de görüldüğü gibi en uygun çözücü asetonitrildir.



ŞEKİL 1 - Renk oluşumuna çeşitli çözücülerin etkisi.

(—)Asetonitril, (— — —)diklormetan, (.....)kloroform,(- - -)dioksan, (-+-) metanol.

Asetonitrildeki çözeltide en yüksek absorbansın gözlemlendiği dalga boyu 460 nm dir.Bu dalga boyunda açık sarı renkli boş denemenin asetonitrile karşı absorbansı 0,09 dır.

Renk oluşumuna sıcaklığın etkisi incelendi.Oda sıcaklığında rengin 5 dak. içerisinde en yüksek değere ulaştığı

ve çözeltinin ısıtılması halinde bu değerde herhangi bir artış olmadığı gözlemlendi.

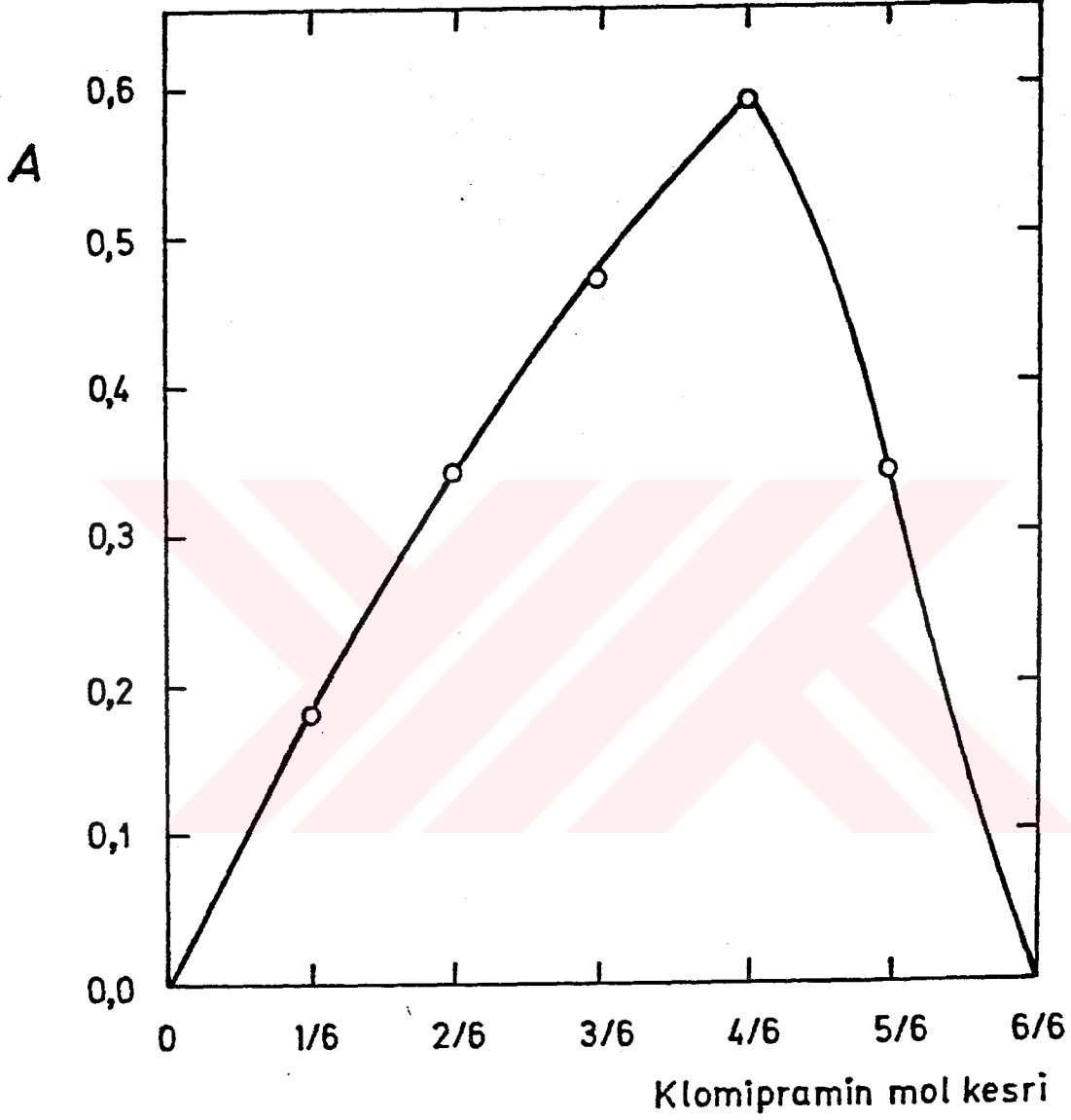
Oluşan rengin dayanıklılığı 3 saat boyunca belirli aralıklarla çözeltinin absorbanansı ölçülerek kontrol edildi. Bu süre içerisinde absorbanans değerinde herhangi bir değişikliğin olmadığı saptandı.

Klomipraminin DDQ ile hangi mol oranında reaksiyona girdiğini saptamak amacıyla Job'un sürekli değişim yöntemine (84) göre çalışıldı. Bu amaçla her iki maddenin aynı konsantrasyondaki (5×10^{-4} M) çözeltileri toplam hacim aynı kalacak şekilde değişen oranlarda karıştırıldı. Cetvel 1 de görülen değerlerle klomipraminin mol kesri absiste, okunan absorbananslar ordinatta olmak üzere bir grafik çizildi (ŞEKİL 2).

Job eğrisinde en yüksek absorbanans değeri klomipramin/DDQ mol oranınının 2:1 olması halinde gözlemlendi.

Klomipramin (ml)	1	2	3	4	5
DDQ (ml)	5	4	3	2	1
A	0,180	0,340	0,470	0,590	0,340

Cetvel 1 - Klomipramin/DDQ Oranı



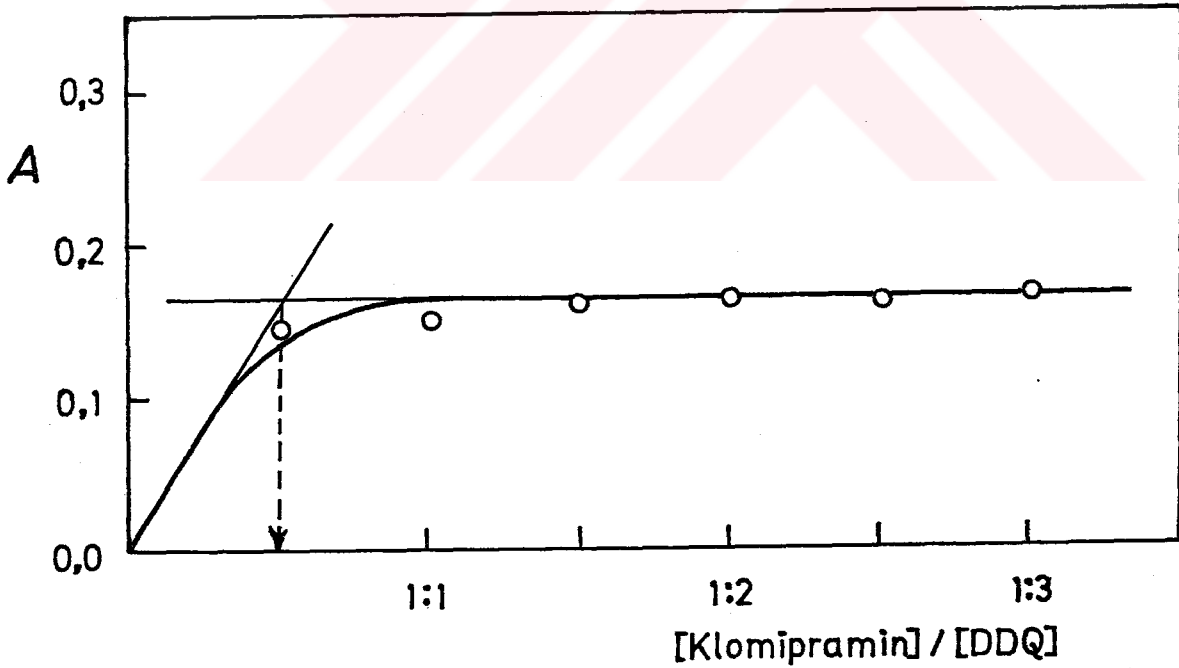
ŞEKİL 2 - Job'un sürekli değişim eğrisi.

Klomipramin ile DDQ arasındaki reaksiyonun kantitatif olarak yürümesi için gerekli belirteç miktarını saptamak amacıyla $6 \times 10^{-4}M$ konsantrasyondaki klomipramin çözeltisi-

sinin 1 ml si, aynı konsantrasyondaki DDQ çözeltisinin 0,5-3,0 ml si ile toplam hacim aynı kalacak şekilde karıştırılarak çalışıldı. Boş denemelere karşı okunan absorbanans değerleri Cetvel 2 de, bu değerlere göre çizilen grafik Şekil 3 dedir. Eğrinin ekstrapolasyonu ile klomipraminin DDQ ile 1:0,5 oranında reaksiyona girdiği görülmektedir.

Klomipramin/DDQ mol oranı	1:0,5	1:1	1:1,5	1:2	1:2,5	1:3
A	0,145	0,150	0,160	0,163	0,161	0,164

Cetvel 2 - Belirteç miktarı.



ŞEKİL 3 Mol oranı grafiği.

Diğer taraftan DDQ/klomipramin mol oranının en az 2 olması reaksiyonun kantitatif olarak yürümesi için yeterli olmaktadır.

Bu işlemler sonunda klomipramin ile DDQ belirteci arasındaki reaksiyonun asetonitril içerisinde, oda sıcaklığında, DDQ/klomipramin mol oranının en az 2 olması halinde, 5 dakika sürede kantitatif olarak yürüdüğü saptanmıştır.

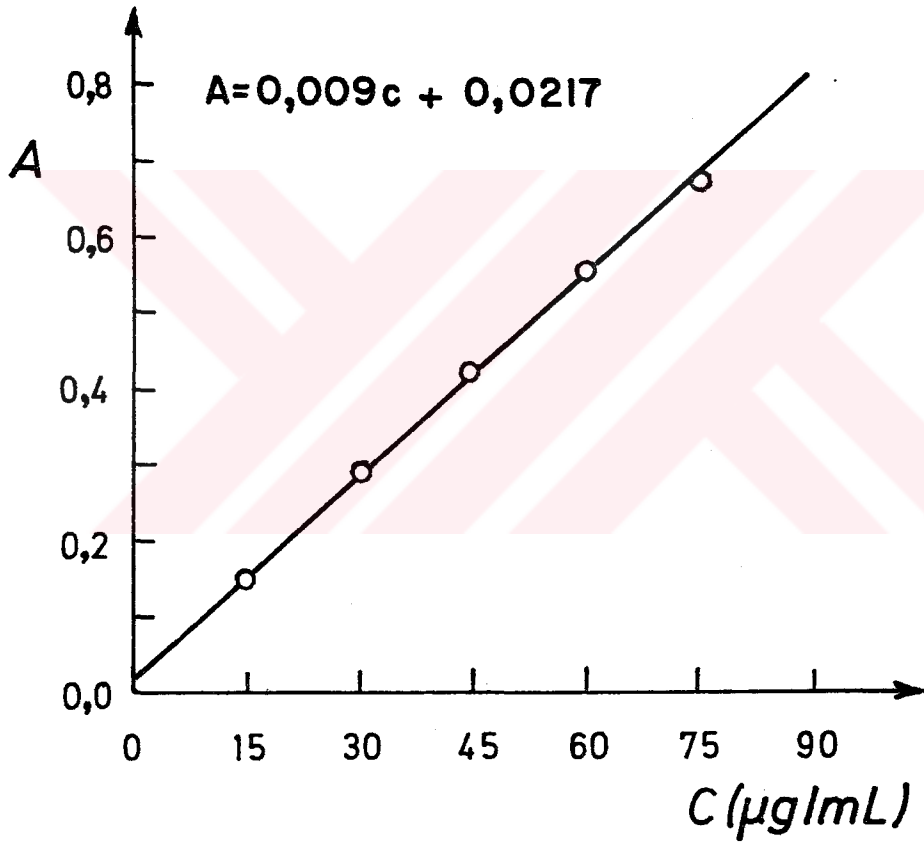
3.2.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Ölçmelerin yapılabileceği, Lambert-Beer yasasının geçerli olduğu konsantrasyon aralığını saptamak amacıyla aşağıda bildirildiği şekilde çalışıldı. 75 mg klomipramin baza eşdeğer klomipramin hidroklorür tam olarak tartıldı ve 25 ml lik balon jofede su ile çözündürüldü. Bu çözeltinin 5 ml si bir tüp içerisinde 0,1 ml 1,5 M amonyak çözeltisi ile bazik hale getirildikten sonra klomipramin baz 3 kez 5'er ml kloroform ile girdap karıştırıcıda ekstre edildi. Birleştirilen kloroform tabakaları susuz sodyum sülfat üzerinden süzüldükten sonra çözücü 80°C lik su banyosunda hava akımında buharlaştırıldı. Artık , asetonitrilde çözündürülerek aynı çözücü ile balon jofede 10 ml ye tamamlandı.

Ölçü eğrisini hazırlamak amacıyla klomipraminin asetonitrildeki çözeltisinden 0,05-0,25 ml lik hacimler 5 ml lik balon jofelere aktarıldı ve herbirine 1'er ml % 0,08'lik DDQ çözeltisi katıldı. Karışımlar asetonitril ile hacmine tamamlandıktan 5 dakika sonra kırmızı renkli çözeltilerin absorbanları aynı şekilde hazırlanan boş deneme çözeltisine

karşı 460 nm dalga boyunda okundu.

Aynı koşullarda 4 kez çalışarak her bir konsantrasyon için okunan absorban değerinin ortalaması alındı ve klomipramin konsantrasyonuna karşı absorban değerleri olacak şekilde ölçü eğrisi hazırlandı (ŞEKİL 4).



ŞEKİL 4 - Klomipraminin ölçü eğrisi.

3.3. FARMASÖTİK PREPARATLARDA KLOMİPRAMİN HİDROKLORÜR MİKTAR TAYİNİ

3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem

3.3.1.1. Drajelerde Analiz

10 adet klomipramin hidroklorür içeren draje (25 mg/draje) tek tek tartılarak ortalama draje ağırlığı saptandı. Bir porselen havanda ince toz haline getirilen drajelerden yaklaşık 150 mg klomipramin baza eşdeğer miktarda draje tozu dikkatlice tartıldı. Su ile 50 ml lik balon jöjeye aktarılan karışım önce 30' çalkalayıcıda sonra 15' ultrasonik banyoda tutuldu. Macmine su ile tamamlanan karışım kantitatif süzgeç kağıdından süzüldü. İlk 10 ml si atılan süzüntü daha sonra kuru bir erlenmayerde toplandı. Bu şekilde hazırlanan örnek çözeltisinin 5 ml si ile 3.2.2 de anlatıldığı şekilde "Bu çözeltinin 5 ml si " kısmından başlayarak çalışıldı ve asetonitrildeki örnek çözeltisinin 0,1 ml si ile elde edilen rengin şiddeti ölçüldü.

Analiz işlemi aynı koşullarda 6 kez tekrarlandı. Drajelerdeki klomipramin miktarı (c) okunan absorban değerinden ve daha önce hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi yardımıyla hesaplandı. Drajelerdeki klomipramin hidroklorür miktarı ise,

$$c \times \frac{351,3}{314,8} \quad \text{formülü ile hesaplandı.}$$

3.3.1.2. Enjektabl Preparatlarda Analiz

Klomipramin hidroklorür içeren ampul çözeltisinden (25 mg/2 ml) dikkatlice bir tüpe aktarılan 1,2 ml çözelti ile 3.3.1.1. de drajelerde analiz bölümünde anlatıldığı gibi ve "3.2.2. de anlatıldığı....." kısmından başlayarak çalışıldı.

3.3.2 Farmakope Yöntemi

3.3.2.1. Drajerlerde Analiz

Yaklaşık 260 mg klomipramin hidroklorüre eşdeğer draje tozu BP de ham madde analizi için kayıtlı susuz ortamda yapılan titrasyon yöntemine göre ayarlı HClO_4 çözeltisi ile titre edilerek analiz edildi. 1 ml 0,1 M HClO_4 , 35,13 mg klomipramin hidroklorüre eşdeğerdir.

3.3.2.2. Enjektabl Preparatlarda Analiz

Ampullerin kırılması ile bir araya toplanan çözeltinin tam 20 ml si amonyak çözeltisi ile bazik hale getirildikten sonra klomipramin baz, kloroform ile ekstre edildi. Çözelti buharlaştırıldı. Kalıntı ile 3.3.2.1. de drajelerde analiz kısmında anlatıldığı şekilde çalışıldı.

Farmakope yöntemi ile bulunan sonuçlar, geliştirilen spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİN İSTATİSTİKİ YOL İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Spektrofotometrik analizlerde en az hata yapma olasılığı absorptans değerleri 0,2-0,7 aralığında olduğundan, yaklaşık olarak bu absorptans değerlerinin elde edildiği konsantrasyon aralığında çalışıldı.

15-75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ klomipramin (baz) içeren çözeltilerle çalışıldığında konsantrasyon ile absorptans arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu ve absorptansların uygun değerler verdiği görüldü. Bu nedenle çalışılacak konsantrasyon aralığı 15-75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

Çalışılan en düşük konsantrasyon 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve ölçmelerin yapıldığı çözeltiler hacmi 5 ml olduğundan tayin edilebilecek en düşük klomipramin miktarı 75 μg olmaktadır.

Ölçü eğrisinin hazırlanmasında 5 farklı konsantrasyonda 4 kez aynı şekilde çalışıldı. Okunan absorptans değerleri ve diğer bulgular Cetvel 3 de verilmiştir.

Cetvel 3 - Klomipraminin ölçü eğrisine ait absorbands ile standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri.

C $\mu\text{g. ml}^{-1}$	A_1	A_2	A_3	A_4	\bar{A}	SD	$\frac{SD}{\bar{A}} \times 100$
15	0,151	0,147	0,155	0,144	0,149	0,004	2,78
30	0,290	0,285	0,301	0,280	0,289	0,008	2,69
45	0,422	0,415	0,428	0,403	0,417	0,009	2,23
60	0,560	0,550	0,571	0,550	0,558	0,009	1,55
75	0,678	0,671	0,683	0,663	0,674	0,008	1,12

Herbir konsantrasyon için bulunan absorbands değerlerinden hesaplanan doğru denklemi :

$$A = 0,009 c + 0,0217 \quad (r= 0,99953)\text{dir.}$$

Ölçü eğrilerine ait regresyon analizi sonuçları Cetvel 4 de verilmiştir.

Cetvel 4 - Cetvel 3 deki ölçü eğrilerine ait regresyon analizi.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>Ortalama</u>
a	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
b	0,0230	0,0197	0,0298	0,0201	0,0231
r	0,99962	0,99977	0,99914	0,99907	0,99940

Cetvel 4 deki değerlerden hesaplanan ortalama a ve b değerleri ile ortalama absorbands değerlerinden hesaplananlar arasında önemli bir fark yoktur. Drajelerdeki klomipramin miktarının hesaplanmasında ortalama absorbands değerlerinden bulunan doğru denkleminde yararlanılmıştır.

4.2. GELİşTİRİLEN YÖNTEM İLE FARMAKOPE YÖNTEMİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Klomipramin hidroklorür içeren draje (25 mg/draje) ve ampuller (25 mg/2 ml) ile 3.3.1. ve 3.3.2. bۆlmlerinde anlatıldığı Şekilde, geliştirilen spektrofotometrik yۆntem ve farmakope yۆntemi ile çalışıldı. İki yۆntem ile bu preparatlardan alınan sonuçlar Cetvel 5 ve Cetvel 6 da birarada verilmiştir.

Yۆntemlerin karşılaştırılması amacıyla her iki preparatın analiz sonuçlarına t- ve F- testleri uygulandı.

Spektrofotometrik ve titrimetrik yۆntem ile drajelerin ve ampullerin analiz sonuçlarından hesaplanan t değeri sırasıyla 0,69 ve 0,93 dr.

% 95 olasılık ve 6 deneme için ilgili listelerden bulunan t değeri ise 2,23 tür. İki preparat için hesaplanan t değerleri teorik değerden küçük olduğu için iki yۆntem ile bulunan ortalama sonuçlar birbirinden önemli derecede farklı değildir.

F testi, iki yۆntem ile alınan sonuçların standart sapmalar yۆnnden kıyaslanması amacıyla uygulandı. İki yۆntem

Cetvel 5 - Klomipramin hidroklorür (25 mg/draje) içeren drajelerin analizi.

n	<u>Spektrofotometrik Yöntem</u>		<u>Titrimetrik Yöntem</u>	
	mg/draje	%	mg/draje	%
1	25,03	100,12	24,40	97,60
2	24,38	97,52	25,11	100,44
3	24,84	99,36	25,21	100,84
4	25,31	101,24	24,56	98,24
5	24,57	98,28	24,84	99,36
6	24,29	97,16	25,25	101,00
\bar{x}	24,74	98,96	24,89	99,56
SD	0,36		0,324	
$\frac{SD \times 100}{\bar{x}}$	1,46		1,304	
Güven sınırları (% 95)	24,36 - 25,12		24,55 - 25,23	

ile draje ve ampullerin analiz sonuçlarından hesaplanan F değerleri 2,82 ve 1,73 dür. % 95 olasılık ve 6 deneme için teorik F değeri 5,05 dir. Hesaplanan değerler sınır değerden küçük olduğu için iki yöntem standart sapma yönünden önemli derecede farklı değildir.

Cetvel 6 - Klomipramin hidroklorür (25 mg/ 2 ml) içeren ampulleri analizi.

n	<u>Spektrofotometrik Yöntem</u>		<u>Titrimetrik Yöntem</u>	
	mg/ampul	%	mg/ampul	%
1	24,55	98,20	24,88	99,52
2	24,68	98,72	24,71	98,84
3	24,42	97,68	24,83	99,32
4	24,29	97,16	24,85	99,40
5	24,91	99,64	24,62	98,48
6	24,83	99,32	24,40	97,60
\bar{x}	24,61	98,44	24,72	98,88
SD	0,24		0,18	
$\frac{SD \times 100}{\bar{x}}$	0,97		0,73	
Güven sınırları (% 95)	24,36 - 24,86		24,53-24,91	

5. T A R T I Ő M A

Klomipramin hidroklorürün miktar tayini için maddenin baz şeklinin DDQ belirteci ile etkileşimi sonucu oluşan kırmızı renkli DDQ radikal anyonundan yararlanılarak spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi. Reaksiyon asetonitril içerisinde, oda sıcaklığında, 5 dak. gibi kısa bir sürede tamamlanmakta ve çözeltinin 460 nm deki absorbanı ölçülmektedir. Absorbans değeri uzun süre değişiklik göstermemektedir.

Literatürde DDQ ile benzer şekilde çalışılarak, primer, sekonder ve tersiyer amin grubu içeren bir çok ilaç maddesinin analizi yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında elektron spin rezonans spektrumu verilerek 460 nm de, DDQ radikal anyonunun ölçüldüğü belirtilmiştir.

Klomipraminin analizi için geliştirilen yöntemde tayine esas olan DDQ radikal anyonunun en uygun hangi koşullarda oluştuğu incelenmiştir. En iyi sonuç oda sıcaklığında çalışılması ve çözücü olarak asetonitril kullanılması halinde alınmıştır. Literatürde de polar çözücülerde radikal anyon oluşumunun daha hızlı olduğu kayıtlıdır.

Klomipraminin DDQ ile 2:1 mol oranında etkileşime girdiği Job ve mol oranı yöntemi ile belirlenmiştir. Radikal reaksiyonunu başlatan donör, büyük bir olasılıkla klomipramin molekülünün alifatik zincirindeki tersiyer amin azotudur. 2 mol klomipraminin 1 mol DDQ ile diradikalanyon oluşturacak şekilde reaksiyona girdiği düşünülmektedir. Çok yüksek

enerjili, stabil olmayan bu bileşimin bu halde kalmayıp derhal bir DDQ molekülü ile reaksiyona girerek dayanıklı, DDQ radikal anyonu oluşturduğu sanılmaktadır.

Reaksiyonu başlatan klomipramin olduğu için klomipramin miktarı ile orantılı olarak radikal anyon oluşmakta ve ortamdaki aşırı DDQ nun analize herhangi bir zararı olmamaktadır. Nitekim gerekli minimum DDQ miktarı saptandıktan sonra konsantrasyonunun daha fazla arttırılması halinde absorbands değerinde bir değişme gözlenmemiştir.

Klomipramin konsantrasyonu ile absorbands arasındaki ilişki $15-75 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Ölçü eğrisi küçük bir intersept değeri (0,0217) ile sıfır noktasına çok yakın olarak geçmektedir ve korrelasyon katsayısı 1 e yakın bir değerdedir (0,99953). Bağıl standart sapma değerleri farklı konsantrasyonlarda önemli bir fark göstermemektedir.

Preparat hazırlanmasında kullanılan laktoz, glukoz, magnezyum stearat, talk, nişasta gibi maddeler tayine zarar vermemektedir. Buna karşılık amonyak DDQ ile etkileşime girerek radikal anyon oluşturmakta ve pozitif hataya sebep olmaktadır. Bu bakımdan klomipramin bazı elde edilirken sulu çözeltiyi bazik hale getirmek amacıyla katılan amonyağın ölçülü olmasına ve fazlasının tamamen uzaklaştırılmasına özen gösterilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda kloroformun su banyosunda, hava akımında buharlaştırılması sırasında amonyağın da tamamen uzaklaştırıldığı saptanmıştır.

Literatürde klomipramin ve benzer yapılı diğer anti-depresanların analizi için geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerde renkli bileşikler oluşturmak üzere, pikril klorür, potasyum bikromat, sodyum nitrit gibi çeşitli belirteçlerden yararlanılmıştır. Bu yöntemlerin duyarlılıkları her ne kadar geliştirmiş olduğumuz yöntemden daha fazla ise de genellikle ilaç maddesinin ancak fermasötik preparatlardan tayinine olanak verecek düzeydedir. Metabolit oluşması nedeniyle de biyolojik materyalden yapılacak bir çalışmada mutlaka bir ayırma işlemi gerekmektedir. Bu bakımdan bu amaçla daha çok HPLC ve GC yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Sadece bir spektrofotometrik yöntemde ince tabakada ayırma işleminden sonra kan ve idrarda analiz yapıldığı kayıtlıdır. Geliştirmiş olduğumuz yöntem ile de benzeri bir çalışmanın yapılabileceği düşünülmüşse de metabolitleri sağlama imkanı olmadığı için böyle bir çalışma yapılamamıştır.

Geliştirilen yöntem farmakopede klomipramin analizi için kayıtlı titrimetrik yöntemle kıyaslanacak olursa hem çok daha duyarlı hem de daha basittir. Her iki yöntemin istatistiksel karşılaştırılmasında gerek ortalama değerler, gerekse standart sapma değerleri yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen spektrofotometrik yöntem, klomipraminin ham madde ve fermasötik preparat analizlerinde güvenle kullanılabilir basit ve ekonomik bir yöntemdir.

6. Ö Z E T

Bu çalışmada klomipramin hidroklorürün farmasötik preparatlarda miktar tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi. Bu amaçla bir π akseptörü olan 2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzokinon (DDQ) belirtecinden yararlanıldı.

Yöntem klomipraminin DDQ ile etkileşimi sonucu oluşan DDQ radikal anyonunun 460 nm deki absorbansının ölçümü esasına dayanmaktadır.

Klomipramin ve DDQ nun stokiyometrik oranı 2:1 olarak Job'un sürekli değişim ve mol oranı yöntemiyle saptandı.

Bu reaksiyonun en uygun koşulları çözücü, reaksiyon zamanı, belirteç miktarı, dalga boyu, konsantrasyon aralığı ve radikal anyonun dayanıklılığı yönünden incelendi. Buna göre reaksiyon oda sıcaklığında 5 dakika da , asetonitril içerisinde ve DDQ/klomipramin mol oranının 2 olması durumunda kantitatif olarak yürümektedir.

Oluşan renk en az 3 saat dayanıklı kalmaktadır. Bu koşullarda $15-75 \mu\text{g ml}^{-1}$ aralığındaki konsantrasyonla absorbans arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Reglasyon denklemi;

$$A = 0,009 c + 0,0217 \quad (r=0,99953) \text{ dir.}$$

Geliştirilen yöntem klomipramin HCl in draje ve enjektabl preparatlardaki analizine uygulandı. Sonuçlar Farmakope yöntemi ile istatistiksel olarak kıyaslandı.

% 95 olasılık düzeyinde doğruluk ve katılık yönünden anlamlı bir fark olmadığı t- ve F- testleri uygulanarak anlaşıldı.



7- SUMMARY

In this study, a spectrophotometric method was developed for the determination of clomipramine hydrochloride in pharmaceutical preparations. 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinon (DDQ), a π acceptor, was used as reagent.

The method is based on the measurement of DDQ radical anion formed from the interaction of clomipramine base with DDQ at 460 nm.

The stoichiometric ratio of clomipramine and DDQ was determined as 2:1 by Job's continuous variation and molar ratio method.

The optimum conditions of this reaction with respect to the solvent, reaction time, amount of the reagent, wavelength, range of the concentration and stability of the radical anion were investigated. So, the reaction proceeds quantitatively in acetonitrile and 5 min. , at room temperature when the mol ratio of DDQ/clomipramine 2. The color developed is stable minimum 3 hours. At these conditions a linear correlation was observed between absorbance and clomipramine concentration over the range 15-75 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The regression equation is $A=0,009 C + 0,0217$ ($r= 0,99953$).

The method proposed was applied to the assay of clomipramine HCl in sugar coated tablets and injectable preparations. The results were compared statistically with

those obtained by official method using t- and F- tests. There is no significant difference between the proposed and BP method with respect to accuracy and precision at % 95 confidence level.



8. K A Y N A K L A R

- 1- Moffat , A.C. Clarke's Isolation And Identification Of Drugs The Pharmaceutical Press. London (1986).
- 2- Craik, D.J., Hall, J.G., Munro, S.L.A. Chem. Pharm. Bull. 35 , 188 (1987).
- 3- Craig, P.M., Lester, B.M., Saggiomo, A.J., Kaiser, C., Zirkle, C.L. J.Org. Chem. 26, 135 (1961).
- 4- Tavish, D.M., Benfield, P. Drugs 39 , 136 (1990).
- 5- Martindale The Extra Pharmacopoeia, The Pharmaceutical press. London (1982).
- 6- British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationery Office, London (1988).
- 7- Moll, H., Clerc, J.T. Pharm. Acta Helv. 62 , 210 (1987).
Ref., C.A. 107, 168162 f (1987).
- 8- Ojanpera, E.I., Vartiovara, J., Ruohonen, A., Vuori, E. J. Liq. Chromatogr. 14 , 1435 (1991).
Ref., C.A. 92 , 1147 q (1980).
- 9- Ersoy, Ö., Aydemir, R.S. Mar.Üniv.Ecz.Der. 5 , 107 (1989).
- 10- Maurer, H., Pflegler, K. J. Chromatogr. 305 , 309 (1984).
- 11- Midha, K.K., Charette, C., Mc Gilveray, L.J., Webb, D., Mclean, M.C. Clin. Toxicol. 18 , 713 (1981).
Ref., C.A. 95 , 55693 V (1981).
- 12- Dutt, M.C. J.Choromatogr. 248 , 115 (1982).

- 13- Markides, K., Blamberg, L., Buijten, J., Wanman, T.
J. Chromatogr. 267 , 29 (1983).
- 14- Hattori, H., Takashima, E., Yamada, T. Suzuki, O.
J. Chromatogr., 529 , 189 (1990).
- 15- Perrigo, B.J., Peel, H.W., Ballantyne, D.J. J. Chro-
matogr. 341 , 81 (1985).
- 16- Uges, D.R.A., Bauma, P. Pharm. Weekbl. Sci. Ed. 1,
417 (1979).
Ref., C.A. 91 , 68186 Z (1979).
- 17- Daldrup, T., Michalke, P., Boehme W. Chromatogr.
Newsl. 10, 1 (1982).
Ref., C.A. 98, 84433 C (1983).
- 18- Turcant, A., Premal-Cabic, A., Caitleux, A., Allain,
P. Clin. Chem. 37, 1210 (1991).
Ref., C.A. 115, 149643 n (1991).
- 19- Carlotti, M.E., Gasco, M.R., Trotta, M. Farmaco,
Ed. Sci. 39, 336 (1984).
Ref., C.A. 101, 225 f (1984).
- 20- Kunhert, B.M., Linsmayer, L., Kramer, G. Mikrochim.
Acta 2, 103 (1984).
- 21- Chauvent, A., Masse, J. Thermochim Acta 65 , 179
(1983).
Ref., C.A. 99 , 110620 d (1983).
- 22- Masse, J., Chauvet, A. Talanta 26 , 1019 (1979).
- 23- Khasawneh, I., Kerkhoff, J., Siegel, D., Jurgensen,
A., Imman, E., Winefordner, J.D. Mikrochem. J. 31,
281 (1985).
Ref., C.A. 103 , 110001 d (1985).

- 24- Bishop, E., Hussein, W. Analyst 109 , 73 (1984).
- 25- Diamandis, E.P., Cristopoulos, T.K. Anal. Chim. Acta 152, 881 (1983).
- 26- Greenhow, E.J. Ladipo, O. Anal.Chim. Acta 172 , 387 (1985).
- 27- Santos, S.R.C.J., Sznclwar, R.B. Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sau Poulo. 15 , 173 (1977).
Ref., C.A. 91 , 82872 b (1979).
- 28- Pitarch, B., Manes, J., Bosch, F. An.R. Acad. pharm. 52 , 279 (1986).
Ref., C.A. 105 , 139735 y (1986).
- 29- Hussein, S.A., El-Kosmos, M.E., Hassan, H.Y., Mohame, A. M. I. Talanta 36 , 941 (1989).
- 30- Hussein, S.A., Mohamed, A. M. I., Hassan, H.Y. Talanta 36 , 1147 (1989).
- 31- Mohamed, H.A., Hassan, H.Y., Mohamed, A. M. I., Hussein, S.A. Anal. lett. 25, 63 (1992).
- 32- Ref., C.A. 116, 91558 r (1992).
- 32- Megazzini, I., Wondrak, G., Puliti, R., Giovannini, M.G., Cioni, P., Della, C.L., Sgarapli, G.P. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 56 , 2518 (1980).
Ref., C.A. 94 , 114153 y (1981).
- 33- Hebb, J.H., Jr, Crooks, C.R.C., Yale, H. Mergner, W. J. J. Anal. Toxicol. 6, 206 (1982).
Ref., C.A. 98 , 29093 s (1983).
- 34- Beredesen, J.E., Elligsen, O.F., Karlsen, J. J. Chromatogr. 204 , 361 (1981).

- 35- Kristinson, J. Acta pharmacol. Toxicol. 49 , 390
(1981).
Ref., C.A. 96 , 135269 x (1982).
- 36- Corano, G.L., Bonferoni, B., Frattini, P., Cucchi,
M.L., Santagostino, G. J. Chromatogr. 227 ,347 (1983).
- 37- Kwang, J., Martinez, R., Keller, J.M. Clin. Chim.
Acta. 126 , 203 (1982).
- 38- Ninci, R., Giovannini, M.G., Della C.L., Sgarapli,
G. J. Chromatogr. 381 , 315 (1986).
- 39- Cox, R.A., Crifasi, J.A., Dickey, R.E., Ketzler,
S.C., Pshak, G.L. J. Anal. Toxicol. 13 , 224 (1989).
Ref., C.A. 111 , 126348 y (1989).
- 40- Eklund, A., Jansson, J., Schuberth, J. J. Anal.
Toxicol. 7 , 24 (1983).
Reg., C.A. 98 , 155968 U (1983).
- 41- Karlsson, K.E. J. Chormatogr. 219 , 373 (1981).
- 42- Godbillon, J., Gauron, S. J. Chromatogr. 204 , 303
(1981).
- 43- Jane, I., McKinnon, A. J. Chromatogr. 323 , 191
(1985).
- 44- Boll, E. Tarighati, M.A., Holsboer, F. Pharma-
copsychiatry 19 , 257 (1986).
Ref., C.A. 105 , 183906 d (1986).
- 45- Lagerström , P.O., Marle, I., Person, B.A.
J. Chromatogr. 273 , 151 (1983).
- 46- Trouvin, J.H., Dessalles, M.C., Mahuzier, G. Analisis
11 , 278 (1983).
Ref., C.A. 100 , 17111 t (1984).

- 47- Rop, P.P., Viala, A., Durand, A. J. Chromatogr. 338 , 171 (1985).
- 48- Ergendorf, H.G. Pharmazie 43 , 287 (1988).
- 49- Wedy, L. , Bohn, G., Blaschke, G. Fresenius Z. Anal. Chem. 332 , 266 (1988).
Ref., C.A. 110 , 33229 Z (1989).
- 50- Ni, P., Guyon, F., Caude, M., Rosset, R. J. Liq. Chromatogr. 11, 1087 (1988).
Ref., C.A. 109 , 47744 (1988).
- 51- Visser, T., Dostelbas, M.C.J.M., Toll, P.J. M.M. J. Chromatogr. 309 , 81 (1984).
- 52- Spreux-Varoquaux, O., Marin, D., Advenier, C., Pays, M. J. Chromatogr. . 416 , 311 (1987).
- 53- Carmen De Felipe, M., Fuentes, J.A., Drummond, A.H. Biochem. pharmacol. 31 , 1661 (1982).
Ref., 97 , 65866 j (1982).
- 54- Mason, P.A., Rowan, K.M., Law, B., Moffat, A.C. Analyst 109 , 1213 (1984).
- 55- Schenk, G.H., Warner, P., Bazelle, W. Anal. Chem. 38 , 907 (1966).
- 56- Schenk, G.H., Santiago, M., Wines, P. Anal.Chem. 35 , 167 (1963).
- 57- Heacock, R.A., Forrest, J.E., Hutzinger, O. J. Chromatogr. 72 , 343 (1972).
- 58- Taha, A., Rücker, G. Arch.pharm. 310 , 485 (1977).
- 59- Kovar, K.A., Mayer, W., Auterhoff, H. Arch. pharm. 314 , 447 (1981).

- 60- Khalek, M.M.A., Hamid, M.E.A., Mahnous, M.S. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68 , 1057 (1985).
- 61- Smith, R.E., Davis, W.R. Anal.Chem. 56 , 2345 (1984).
- 62- Ibrahim, E.A., Issa, A.S., Abdel Salam, M.A., Mahrous, M.S. Talanta 30 , 531 (1983).
- 63- Hussein, S.A., Mohamed, A. M. I., Abdel-Alim, M. Analyst 114 , 1129 (1989).
- 64- Hassan, S.S.M., Iskander, M.L., Nashed, N.E. Talanta 32 , 301 (1985).
- 65- Abdel-Hamid, M.E., Abdel-Salam, M., Mahrous, M.S., Abdel-Khalek, M.M. Talanta 32 , 1002 (1985).
- 66- Abdel-Salam, M., Issa, A.S., Mahrous, M., Abdel-Hamid, M.E. Anal. lett. 18 , 1391 (1985).
Ref., C.A. 103 , 183644 a (1985).
- 67- Issa, A.S., Mahrous, M.S., Abdel-Salam, M., Abdel-Hamid, M. J. pharm. Belg. 40 , 339 (1985).
Ref., C.A. 104 , 95612 d (1986).
- 68- Kovar, V.K.A., Abdel-Hamid, M. Arch. pharm. 317, 246 (1984).
- 69- Issa, A.S., Mahrous, M.S., Abdel-Salam, M., Soliman, N. Talanta. 34 , 670 (1987).
- 70- Elsayed, M.A.H., Barary, M., Abdel-Salam, M., Mohamed, S. Anal. lett. 22 , 1665 (1989).
Ref., C.A. 111 , 160396 x (1989).
- 71- Boni, N.S., Issa, A.S., Abdel-Salam, M.A., Daabees, H.M.G. Alexandria J. pharm. Sci. 3 , 216 (1989).
Ref., C.A. 112 , 104634 g (1990).

- 72- Issa, A.S., Abdel-Salam, M.A., Daabees, H.M.G., Boni, N.S. Alexandria J. pharm. sci. 4 , 7 (1990).
Ref., C.A. 113 , 158800 x (1990).
- 73- Aksal, H.F., Saleh, G.A., Omar, N.M. Analyst 116 , 387 (1991).
- 74- Saleh, G.A., Aksal, H.F. Pharmazie 45 , 220 (1990).
- 75- Saleh, G., Aksal, H. Omar, N. Anal. lett. 23 , 833 (1990).
Ref., C.A. 113 , 103502 w (1990).
- 76- El-Shabouri, S.R. Sidhom, M.B. Egypt. J. Pharm. Sci. 27 , 59 (1986).
Ref., C.A. 106 , 219697 y (1987).
- 77- Sidhom, M.B. J. pharm. pharmacol. 35 , 24 (1983).
- 78- Minakato, K., Suzuki, O., Ishikawa, Y., Seno, H., Harada, N. Forensic. Sci. Int. 52 , 199 (1992).
Ref., C.A. 116 , 189200 t (1992).
- 79- Roy, S., Chakraborty, D.P. J.Chromatogr. 96 , 266 (1974).
- 80- Rucker, G., Taha, A. J. Chromatogr. 132 , 165 (1977).
- 81- Agarwal, S.P., Niwaiwu, J. J. Chromatogr. 295 , 537 (1984).
- 82- Rizk, M.S., Zakhari, N.A. Farmaco, Ed. Prat. 41 , 75 (1986).
Ref., C.A. 104 , 136129 x (1986).
- 83- Rizk, M., Zakhari, N., İbrahim, F., Walash, M.I. Mikrochim. Acta 1 , 355 (1989).
- 84- Job, P., Ann. de chim. 9 , 113 (1928).