

## การวิเคราะห์นอร์ฟลอกซาซินในเภสัชภัณฑ์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกอย่างง่าย

สีเส ปารมี<sup>1\*</sup>, วิรัช เรืองศรีตระกูล<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

การวิเคราะห์นอร์ฟลอกซาซินในเภสัชภัณฑ์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกอย่างง่าย

สีเส ปารมี<sup>1\*</sup>, วิรัช เรืองศรีตระกูล<sup>2</sup>

**บทนำ:** นอร์ฟลอกซาซิน (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piprazinyl)-3-quinoline carboxylic acid) ได้ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะและระบบทางเดินหายใจ **วัสดุและวิธีการ:** เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พร้อมด้วยควอทซ์เซลล์ที่ใช้สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ปริมาณสารละลายมาตรฐานของนอร์ฟลอกซาซิน 2.0 มิลลิกรัม นำมาผสมกับสารละลายเพอร์ริสซัลเฟตที่มีความเข้มข้น  $4.0 \times 10^{-1}$  โมลต่อลิตรจำนวน 1.0 มิลลิกรัม และได้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น  $2.5 \times 10^{-2}$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 1 มิลลิกรัมผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายปริมาตรเทียบปริมาตร สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณจะนำยาเม็ดนอร์ฟลอกซาซิน 20 เม็ด มาชั่งน้ำหนักและทำการบดยาให้ละเอียด ทำการชั่งนอร์ฟลอกซาซินให้มีเนื้อยาเทียบเท่ากับ 400 มิลลิกรัม ทำการละลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้น  $5.0 \times 10^{-3}$  โมลต่อลิตร ในขวดปริมาตรขนาด 250 มิลลิกรัม กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 จากนั้นทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยกรดไนตริกเข้มข้น  $5.0 \times 10^{-3}$  โมลต่อลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ **ผลการศึกษา:** การศึกษาวิธีวิเคราะห์นี้มีพื้นฐานมาจากปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างยาและเพอร์ริสซัลเฟตที่มาจากยาเม็ดที่ละลายในสารละลายกรด มีการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปเพื่อช่วยเพิ่มสัญญาณที่ตรวจวัดได้ ปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างยา เพอร์ริสซัลเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะให้สารประกอบที่มีสีเหลือง อัตราส่วนปริมาตรของสารละลายระหว่างตัวอย่างยา เพอร์ริสซัลเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมพบว่าเท่ากับ 2.0:1.0:0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดพบที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมจะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มีสมการเส้นตรงเมื่อตัวแปร x แทนความเข้มข้นและตัวแปร y แทนค่าการดูดกลืนแสง ได้สมการเส้นตรงเท่ากับ  $y = 0.0041x + 0.0026$  **สรุปผล:** วิธีที่นำเสนอนี้สามารถที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณนอร์ฟลอกซาซินได้ ข้อดีของวิธีนี้ประกอบไปด้วยค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี มีค่าความถูกต้องและแม่นยำที่เหมาะสม และสามารถใช่วิธีวิเคราะห์นี้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณนอร์ฟลอกซาซินที่เป็นงานประจำได้ และน่าจะสามารถพัฒนาวิธีนี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนของยาตัวอื่นๆได้ต่อไป

**คำสำคัญ :** นอร์ฟลอกซาซิน, เพอร์ริสซัลเฟต, สเปกโตรโฟโตเมตริกอย่างง่าย

### Abstract

#### Determination of norfloxacin in pharmaceutical formulation using simple spectrophotometric method

Palamy S<sup>1\*</sup>, Ruengsitagoon W<sup>2</sup>

**Introduction:** Norfloxacin (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piprazinyl)-3-quinoline carboxylic acid) is used in a wide range of gastrointestinal, urinary and respiratory tract infections. **Material and method:** An UV-Visible spectrophotometer with matched quartz cells was used for measuring an absorption of the standard or sample solutions. Accurate volumes (2.0 mL) of

<sup>1</sup> นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup> Ph.D, รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

\*ติดต่อผู้พิมพ์: โทรศัพท์ : +66-43-202378 , โทรสาร : + 66-43-202379; E-mail: sysay\_p@yahoo.com

<sup>1</sup> Graduate student, Faculty of pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

<sup>2</sup> Ph.D, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of pharmaceutical Sciences, Khon kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

\*Corresponding author: Tel: +66-43-202378 , Fax: + 66-43-202379; E-mail: sysay\_p@yahoo.com



the standard solutions of norfloxacin were mixed with 1.0 ml of  $4.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$  ferrous sulfate solution and then 0.1 ml of  $2.5 \times 10^{-2} \%$  (v/v) of hydrogen peroxide was added and mixed well. The absorbance of the complexation was monitored at 440 nm against the corresponding reagent blank. For sample determination, twenty tablets of norfloxacin were weighed and ground into a fine powder. A portion of the powder equivalent to 400 mg of active ingredient was transferred to 250 ml volumetric flask and dissolve by  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  and filtered through Whatman No. 42 filter paper and diluted with  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  nitric acid to volume in order to obtain the appropriate concentration for analysis. **Results:** The studied method based on the reaction between drug sample and ferrous sulfate tablets in acidic solution. The presence of hydrogen peroxide enhances the absorption signal. The reaction between the investigated drugs and ferrous sulfate in the presence of hydrogen peroxide was gave the soluble yellow complex. The optimum volume ratio of drug sample, ferrous sulfate solution and hydrogen peroxide were 2.0:1.0:0.1 (v/v). The maximum absorption was recorded at the wavelength of 440 nm. The proposed spectrophotometric method was developed and optimized using an univariate method. Under the developed condition, linear calibration graphs were obtained for the concentration range of  $1.0 - 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Over the above concentration range, linear regression equation of the absorbance of drug (y) versus drug concentration (x) was  $y = 0.0041x + 0.0026$ . **Conclusion:** The proposed method can be used for the quantification of norfloxacin. The advantages of this method showed good linearity, precision and reproducibility. This developed method can be used as an alternative including method for the routine quality control of norfloxacin tablet in pharmaceutical formulation. It should be using this proposed method for analysis of others fluoroquinolone.

**Keywords:** Norfloxacin, Ferrous sulphate, Simple spectrophotometric

## Introduction

Norfloxacin (1-Ethyl -6-fluoro-1,4 -dihydro - 4-oxo- 7 (1-piperazinyl) -3-quinoline carboxylic acid). It is used in a wide range of gastrointestinal, urinary and respiratory tract infections (Ballesteros *et al.*, 2003). Several methods have been reported in literature for the determination of norfloxacin in pure form, dosage forms and biological fluids. These were included spectrophotometric (Farhan *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2006), chromatographic (Bedor *et al.*, 2007; Pecorelli *et al.*, 2003), spectrofluorimetric (El-kommos *et al.*, 2003), chemiluminescence (Chen *et al.*, 2006) and flow injection analysis method (Murillo *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2004).

This studied describes the simple spectrophotometric method for the determination of norfloxacin in pharmaceutical tablets using simple reagent which was reacted with ferrous sulfate. The analytical method will be optimized base on the technique namely univariate method.

## Material and method

### Material

A Shimadzu<sup>®</sup> UV-visible spectrophotometer(model 1700, Japan) with matched quartz cells was used for

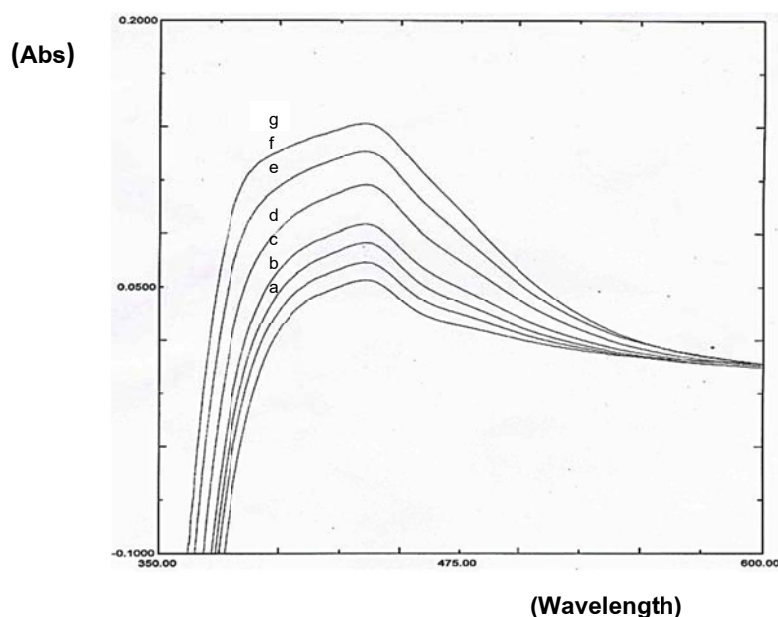
measuring an absorption of the standard or sample solutions.

### Recommended Procedure

Accurate volumes (2.0 ml) of the standard solution of norfloxacin was transferred into test tube which was mixed with 1.0 ml of  $4.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$  ferrous sulfate tablet solution afterward added 0.1 ml of  $2.5 \times 10^{-2} \%$  (v/v) of hydrogen peroxide, mixed well. The absorbance of the complexation was monitored at 440 nm (Figure 1) against the corresponding reagent blank.

### Sample Preparation

Twenty tablets of norfloxacin were weighed and ground into a fine powder. A portion of the powder equivalent to 400 mg of active ingredient was transferred to 250 mL volumetric flask and dissolve using  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  afterward filtered through Whatman No. 42 filter paper and diluted with  $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  nitric acid to volume in order to obtain the appropriate concentration for analysis.



**Figure 1.** Absorption spectra of norfloxacin (a): Blank, (b): 5, (c): 7.5, (d): 10, (e):15, (f): 20, (g): 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  coupled with  $\text{Fe}^{2+}$  solution with enhancer.

## Results and discussion

The studied based on reaction between drug sample and ferrous sulfate tablets in acidic solution. The presence of hydrogen peroxide enhances the absorption signal. The reaction between the investigated drugs,  $4.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$  of ferrous sulfate and  $2.5 \times 10^{-2} \%$  (v/v) of hydrogen peroxide was gave the soluble yellow complex. The optimum volume ratio of drug sample, ferrous sulfate tablets and hydrogen peroxide solution were 2.0 : 1.0 : 0.1 (v/v). The maximum absorption was recorded at the wavelength of 440 nm. The proposed spectrophotometric method was developed and optimized by an univariate method. Analytical characteristics for the determination of norfloxacin was studied under optimum conditions (Table1).

**Table 1.** Variable and optimum condition for determination of norfloxacin

Parameter studied	Optimum value
Wavelengths (nm)	440
Linear range ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	1–100
Types of acid	$\text{HNO}_3$
Nitric acid concentration ( $\text{mol l}^{-1}$ )	$5.0 \times 10^{-3}$
Ferrous sulfate concentration ( $\text{mol l}^{-1}$ )	$4.0 \times 10^{-1}$
Hydrogen peroxide concentration (%v/v)	$2.5 \times 10^{-2}$

## Calibration graph

The proposed procedure for the determination of norfloxacin under the optimum conditions, linear calibration graphs were obtained for  $1.0 - 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Over the above concentration range, linear regression analysis of the absorbance of drug (y) versus drug concentration(x) yield equations  $y = 0.0041x + 0.0026$ . The correlation coefficients was shown to be 0.9995. The detection limit of this drug, the concentration of analyte that gives a signal different from the blank by an amount equal to three times the standard deviation of the blank signal ( $s/n=3$ ), was found to be  $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

## Reproducibility and Accuracy

The relative standard deviation of proposed method (absorbance) calculated from 12 replicate measured of 10 and  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  of norfloxacin was found to be 0.62% and 1.64% ( $n=12$ ). Accuracy of the methods was determined from 7 replicate of this drug sample. After measurement of the absorbance, the recovery of spiked standard drug was calculated. The percentage recoveries of 12.50 and  $22.50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of norfloxacin was found to be 99.48 % and 100.97 %, respectively.

## Interferences

The effect of inactive ingredients (e.g. glucose, lactose, cellulose, starch, magnesium stearate, sucrose, sorbital) were investigated for determination of norfloxacin. The synthetic sample solutions containing  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  of this drug and different concentration of some excipients were



tested. It was found that has no effect on the determination of norfloxacin.

### Application

The proposed spectrophotometric method for determination of norfloxacin (400 mg) in pharmaceutical formulation using simple reagent from ferrous sulfate tablets in nitric acid. The results were compared with those declared on the formulation labels and with those obtained using the official method of pharmacopoeia (The United States Pharmacopoeia, 2009). The results obtain by both methods were compared favorably by the student *t*- test at 95 % confidence level. The comparison between the proposed method and the official method was accepted with reasonable agreement.

### Conclusion

The proposed method can be used for the quantification of norfloxacin. The advantages of this method showed good linearity, precision and reproducibility. This developed method can be used as an alternative including method for the routine quality control of norfloxacin tablet in pharmaceutical formulation. The further study should be study for analysis of others fluoroquinolone drug.

### Acknowledgement

The author gratefully acknowledge Thailand International Development Cooperation Agency (TICA) for financial support of Mr. SYSAY PALAMY. Special thanks are also expressed to Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Graduate School of Khon Kaen University, for their partial support of the thesis.

### References

- Ballesteros O, Toro I, Sanz-Nebot V, Navalón A, Vílchez JL, Barbosa J. Determination of fluoroquinolones in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2003; 798: 137-144.
- Farhan AS, Arayne MS, Sultana N, Mirza AZ, Qureshi F, Zuberi, MH. Facile and manifest spectrophotometric methods for determination of six quinolone antibiotics in pharmaceutical formulations using iron salts. *Med Chem Res* 2010; 19: 1259-1272.
- Ibrahim AD, Ibrahim HR, Hassan FA. Genetic nonextractive spectrophotometric method for determination of 4 quinolone antibiotic by formation of iron pair complexes with  $\beta$ - naphthol. *J AOAC Int* 2006; 89: 334-340.
- Bedor DCG, Gonçalves TM, Bastos LL, Sousa CEM, Abreu LRP, Oliveira EJ. Development and validation of a new method for the quantification of norfloxacin by HPLC-UV and its application to a comparative pharmacokinetic study in human volunteers. *Braz J Pharm Sci* 2007; 43(2): 231-238.
- Pecorelli I, Galarini R, Bibi R, Floridi AI, Casciarri E, Floridi A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 2003; 483: 81-89.
- El-kommos ME, Saleh GA, El-Gizawi SM, Abou-Elwafa MA. Spectrofluorometric determination of certain quinolone antibacterails using metal chelation. *Talanta* 2003; 60, 1033- 1050.
- Chen SL, Liu Y, Zhao HC, Jin LP, Zhang ZL, Zheng YZ. Determination of norfloxacin using a terbiumsensitized electrogenerated chemiluminescence method. *Luminescence* 2006; 21: 20-25.
- Murillo JM, Molina AA, Peña AM, Merás, Girón. Resolution of ofloxacin - ciprofloxacin and ofloxacin/norfloxacin binary mixture by flow injection chemiluminescence in combination with partial least squares multivariate calibration. *J Fluorese* 2007; 17: 481-491.
- Liang YD, Song JF, Yang XF. Flow injection chemiluminescence determination of fluoroquinolones by enhancement of weak chemiluminescence from peroxynitrous acid. *Anal Chim Acta*, 2004; 510, 21–28.
- The United States Pharmacopoeia, USP 32. 2009 pp. 3130.