

1-1-1987

## Determination of Propranolol Using Fluorescamine(การวิเคราะห์หยา Propranolol โดยใช้ Fluorescamine)

จินตนา หวังขุขสกุล

ดาราวัลย์ ชัยชนะภูมิ

สุนิพนธ์ ภูมิมางกูร

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjps>

 Part of the [Pharmacology Commons](#)

---

### Recommended Citation

หวังขุขสกุล, จินตนา; ชัยชนะภูมิ, ดาราวัลย์; and ภูมิมางกูร, สุนิพนธ์ (1987) "Determination of Propranolol Using Fluorescamine(การวิเคราะห์หยา Propranolol โดยใช้ Fluorescamine)," *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*: Vol. 12: Iss. 2, Article 2.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/tjps/vol12/iss2/2>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact [ChulaDC@car.chula.ac.th](mailto:ChulaDC@car.chula.ac.th).

650.0<sup>mg</sup> Propranolol

690.11<sup>mg</sup> Fluorescamine! 2.5 ph

24

✓ 63000540



ประชุมพันธ์

ORIGINAL ARTICLE

## การวิเคราะห์ยา Propranolol โดยใช้ Fluorescamine

จินตนา หวังบุญสกุล, ภ.ม. \*

คาราวัลย์ ธัญญะวุฒิ, M.S. (Pharm.) \*\*

สุนิพนธ์ ภูมิมางกูร, Ph.D. \*\*

### บทคัดย่อ

Flourescamine ทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม primary amine และ secondary amine ให้สาร fluorescent pyrrolinone และ nonfluorescent aminoenone ตามลำดับ การวิเคราะห์โดยวิธี UV spectrophotometry ได้นำมาใช้หาปริมาณยา propranolol ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม secondary amine การทดลองนี้ได้มีการศึกษาผลของสภาวะต่าง ๆ ของการทดลองต่อปฏิกิริยา พบว่ายา propranolol สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีง่าย ๆ โดยใช้สาร fluorecamine ซึ่งสามารถเปรียบเทียบผลได้ดี เมื่อเทียบกับวิธี USP (ไทยเภสัชสาร ปีที่ 12 (2) : หน้า 83-95 (2530)).

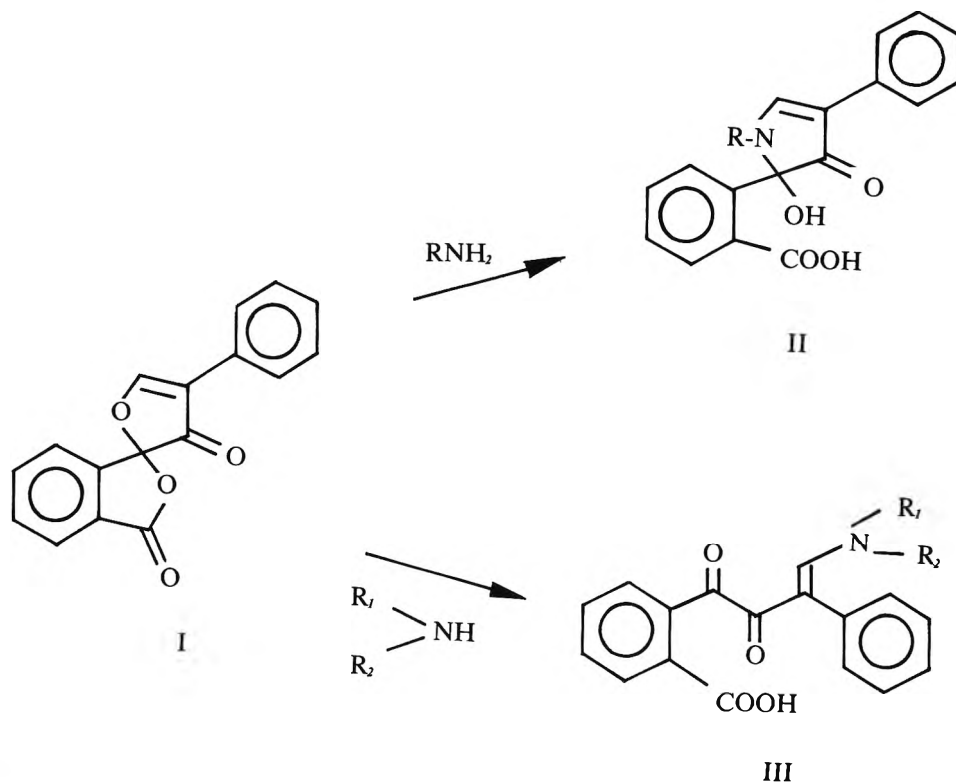
\* บริษัท สยามฟาร์มาซูติคอลล จำกัด

\*\* ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ

Fluorescamine, 4-phenylspiro furan-2 (3H), 1'-phthanlan-3, 3'-dione ถูกสังเคราะห์โดย Weigele และคณะ (1-2) โดยใช้เป็น fluorometric reagent สำหรับวิเคราะห์หาสารกลุ่ม primary amine และใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ primary amino acid(3-4), peptide(5-6) และ protein(7) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ทางด้านชีวเคมี, เคมี และยา(8-12) Fluorescamine สามารถใช้เป็น spray reagent สำหรับ thin - layer chromatography ในการตรวจหาสารกลุ่ม primary amine และ secondary amine เช่น amino acid, peptide, alkaloid และยา เป็นต้น(13-15)

Fluorescamine (I) ทำปฏิกิริยากับสารกลุ่ม primary amine ให้สาร highly fluorescent pyrrolinone (II) มี maximum absorption wavelenth ในช่วง 380-410 nm. fluorescamine ทำปฏิกิริยากับสารกลุ่ม secondary amine ให้สาร nonfluorescent aminoenone chromophore (III) มี maximum absorption wavelength ที่ 330 nm. (รูปที่ 1) สาร fluorescamine ส่วน excess จะเกิด hydrolysis ให้สาร nonfluorescent ซึ่งละลายได้ในน้ำ(16-18) สารกลุ่ม primary และ secondary amine ทำปฏิกิริยากับ fluorescamine อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องให้ chromophore ที่มีความคงตัวดี แต่สารกลุ่ม primary amine เท่านั้นที่ทำปฏิกิริยาให้สารที่มีคุณสมบัติ fluorescent Weigele และคณะ (19) ได้รายงานถึงวิธีวิเคราะห์ secondary amino acid โดยเปลี่ยนให้เป็น primary amine ด้วยปฏิกิริยา oxidative decarboxylation โดยใช้สาร N-chlorosuccinimide ซึ่งเป็นสารที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม secondary amine หลายตัว(18-20) เนื่องจากสาร aminoenone chromophore ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง secondary amine กับ fluorescamine ให้ strong absorption จึงเป็นแนวความคิดในการพัฒนาหาวิธีวิเคราะห์ propranolol โดยใช้วิธี spectrophotometry ในการทดลองนี้



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาเคมีระหว่าง fluorescamine กับสารในกลุ่ม primary และ secondary amine

## วัสดุและการทดลอง

### เครื่องมือ

1. UV Spectrophotometer - Shimadzu UV-180
2. Recorder - Shimadzu U-135
3. pH meter - Radiometer Copenhagen, PHM 62 Standard pH Meter
4. Temperature controlled (water bath) - Memmert

### สารเคมี

1. Fluorescamine AR - Sigma
2. Propranolol hydrochloride BP - Carlo Erba
3. Acetone AR - BHD Chemical
4. Potassium hydrogen phosphate AR - Merck
5. Potassium dihydrogen phosphate AR - Merck
6. Sodium hydroxide AR - Merck
7. Hydrochloric acid AR - Merck
8. Heptane AR - Carlo Erba

### วิธีการทดลอง

#### 1. หาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา

##### 1.1 หา Maximum absorption wavelength

นำสารละลาย propranolol hydrochloride  $1 \times 10^{-3}$  M 0.4 มล. ผสมกับสารละลาย phosphate buffer 0.05 M (pH 9.0) 3.6 มล. เติมสารละลาย fluorescamine ใน acetone  $2 \times 10^{-3}$  M 1 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีนำไปหา maximum absorption wavelength ที่ wavelength ระหว่าง 300-450 nm. เทียบกับ reagent blank

##### 1.2 ผลของ pH ต่อปฏิกิริยา

นำสารละลาย propranolol hydrochloride 0.4 มล. ผสมกับสารละลาย phosphate buffer pH ต่าง ๆ (pH 2-12) 3.6 มล. เติมสารละลาย fluorescamine 1 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีนำไปหาค่า absorbance ที่ 319 nm. เทียบกับ reagent blank

##### 1.3 ผลของเวลาต่อความคงตัวของ propranolol-fluorescamine derivative

นำสารละลาย propranolol hydrochloride 2 มล. ผสมกับสารละลาย phosphate buffer (pH 9.0) 18 มล. เติมสารละลาย fluorescamine 5 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที นำไปวัดค่า absorbance ที่ 319 nm เทียบกับ reagent blank ที่เวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 2 นาที - 3 ชั่วโมง

##### 1.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ propranolol-fluorescamine derivative

นำสารละลาย propranolol hydrochloride 0.4 มล. ผสมกับสารละลาย phosphate buffer (pH 9.0) 3.6 มล. เติมสารละลาย fluorescamine 1 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิต่าง ๆ (อุณหภูมิห้อง, 30°C, 40°C และ 50°C) หาค่า absorbance ที่ 319 nm เทียบกับ reagent blank

1.5 ผลของความเข้มข้นของ fluorescamine ต่อค่า absorbance ของ propranolol-fluorescamine derivative

นำสารละลาย propranolol hydrochloride 0.2 มล. ผสมกับสารละลาย phosphate buffer (pH 9.0) 3.8 มล. เติมสารละลาย fluorescamine 1 มล. ความเข้มข้นต่าง ๆ ( $1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-3}$  M) เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที หาค่า absorbance ที่ 319 nm เทียบกับ reagent blank

1.6 หาคความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของ propranolol hydrochloride

นำสารละลาย propranolol hydrochloride  $1 \times 10^{-3}$  M ปริมาณต่าง ๆ (0.1 - 0.8 มล.) ผสมกับสารละลาย phosphate buffer (pH 9.0) จนปริมาตรเป็น 4 มล. เติมสารละลาย fluorescamine 1 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที หาค่า absorbance ที่ 319 nm. เทียบกับ reagent blank

2. เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ propranolol hydrochloride ใน dosage form ต่าง ๆ โดยวิธี Fluorescamine เทียบกับวิธี USP

#### วิธี Fluorescamine

Standard preparation : ละลาย standard propranolol hydrochloride 20 มก. ใน HCl 0.01 N 100 มล.

Assay preparation (ยาเม็ด) : ชั่งและบด propranolol hydrochloride tablet อย่างน้อย 20 เม็ด ซึ่งผงยาให้นำหนักสมมูลย์กับ propranolol hydrochloride 20 มก. ละลายใน HCl 0.01 N 100 มล. (เขย่า 30 นาที) กรอง

(ยาฉีด) : เจือจาง propranolol hydrochloride injection ด้วย HCl 0.01 N ให้มีความเข้มข้นสมมูลย์กับ propranolol hydrochloride 20 มก. ใน 100 มล.

นำ standard preparation 0.5 มล. ผสมกับ phosphate buffer 0.2 M (pH 10.0) 3.5 มล. เติมสารละลาย fluorescamine  $2 \times 10^{-3}$  M 1 มล. เขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที วัดค่า absorbance เทียบกับ reagent blank ที่ 319 nm

นำ assay preparation มาเตรียมเช่นเดียวกับ standard preparation หาค่า absorbance เทียบกับ reagent blank ที่ 319 nm

หาปริมาณ propranolol hydrochloride จากสูตร

$$\% \text{ Labelled Amount} = \frac{0.1 \times C \times Au \times Wt \times 100}{As \times W \times P}$$

Au = absorbance ของ sample

As = absorbance ของ standard

C = ความเข้มข้นของ standard preparation (mcg/ml)

P = labelled amount

W = น้ำหนักของผงยาที่ชั่ง (ปริมาตรยาฉีดที่ใช้)

Wt = น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (ปริมาตรยาฉีดต่อหลอด)

## วิธี USP

Standard preparation : ละลาย standard propranolol hydrochloride 20 มก. ในน้ำ 100 มล.

Assay preparation (ยาเม็ด) : ชั่งและบด propranolol hydrochloride tablet อย่างน้อย 20 เม็ด ชั่งผงยาให้น้ำหนักสมมูลย์กับ propranolol hydrochloride 100 มก. ละลายใน HCl 0.1 N 500 มล. (เขย่า 30 นาที) กรอง

(ยาฉีด) : เจือจาง propranolol hydrochloride injection ด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นสมมูลย์กับ propranolol hydrochloride 5 มก. ใน 25 มล.

ตวง standard preparation 5 มล. ใส่ใน separator เติมน้ำกลั่น 10 มล. สารละลาย sodium hydroxide (1 : 5) 1 มล. และ heptane 25 มล. เขย่า 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น หาค่า absorbance ในชั้น heptane ที่ 293 nm โดยใช้ heptane เป็น blank

นำ assay preparation มาเตรียมเช่นเดียวกับ standard preparation หาค่า absorbance ในชั้น heptane ที่ 293 nm ใช้ heptane เป็น blank

หาปริมาณ propranolol hydrochloride จากสูตร

$$\% \text{ Labelled Amount} = \frac{0.5 \times C \times Au \times Wt \times 100}{As \times W \times P}$$

Au = absorbance ของ sample

As = absorbance ของ standard

C = ความเข้มข้นของ standard preparation (mcg/ml)

P = labelled amount

W = น้ำหนักของผงยาที่ชั่ง (ปริมาตรของยาฉีดที่ใช้)

Wt = น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (ปริมาตรยาฉีดต่อหลอด)

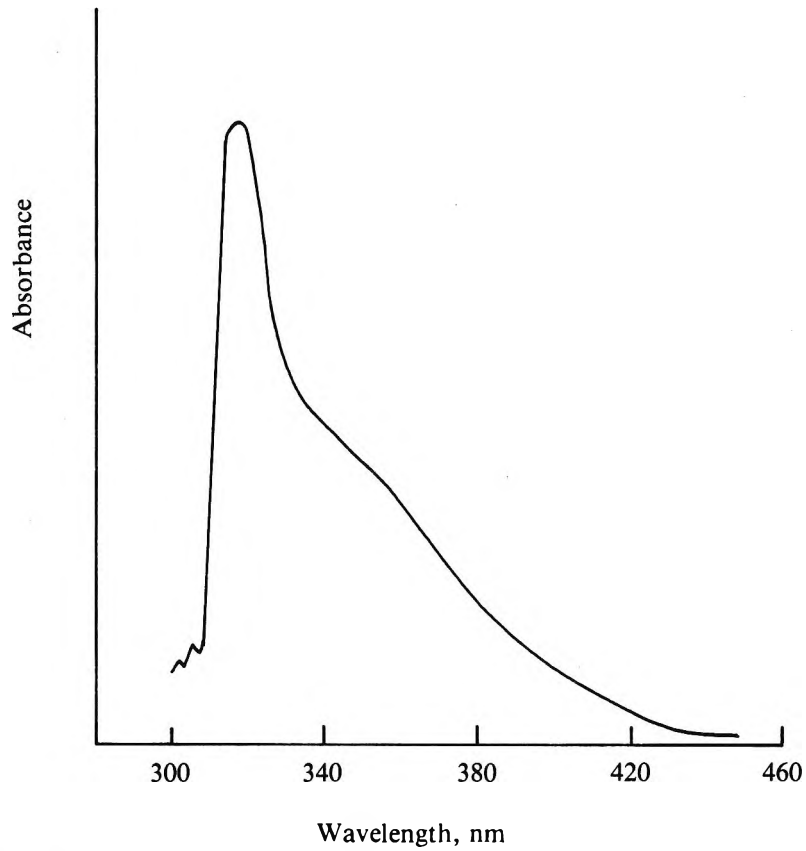
ในแต่ละวิธีทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา

##### 1.1 maximum absorption wavelength

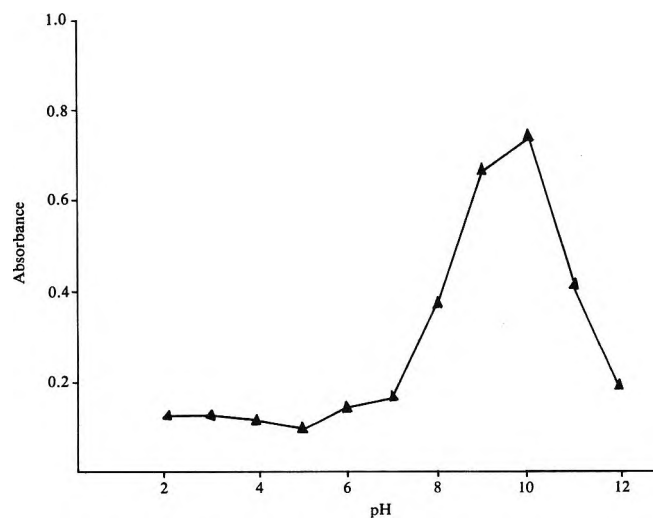
สารในกลุ่ม secondary amine สามารถทำปฏิกิริยากับ fluorescamine ให้ nonfluorescent aminoenone chromophore ซึ่งให้ maximum absorption wavelength ในช่วง 310-330 nm การทดลองนี้ propranolol hydrochloride จะทำปฏิกิริยากับ fluorescamine ได้สาร propranolol-fluorescamine derivative ให้ maximum absorption ที่ 319 nm absorption spectrum แสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดง Absorption spectrum ของ propranolol-fluorescamine derivative

### 1.2 ผลของ pH ต่อปฏิกิริยา

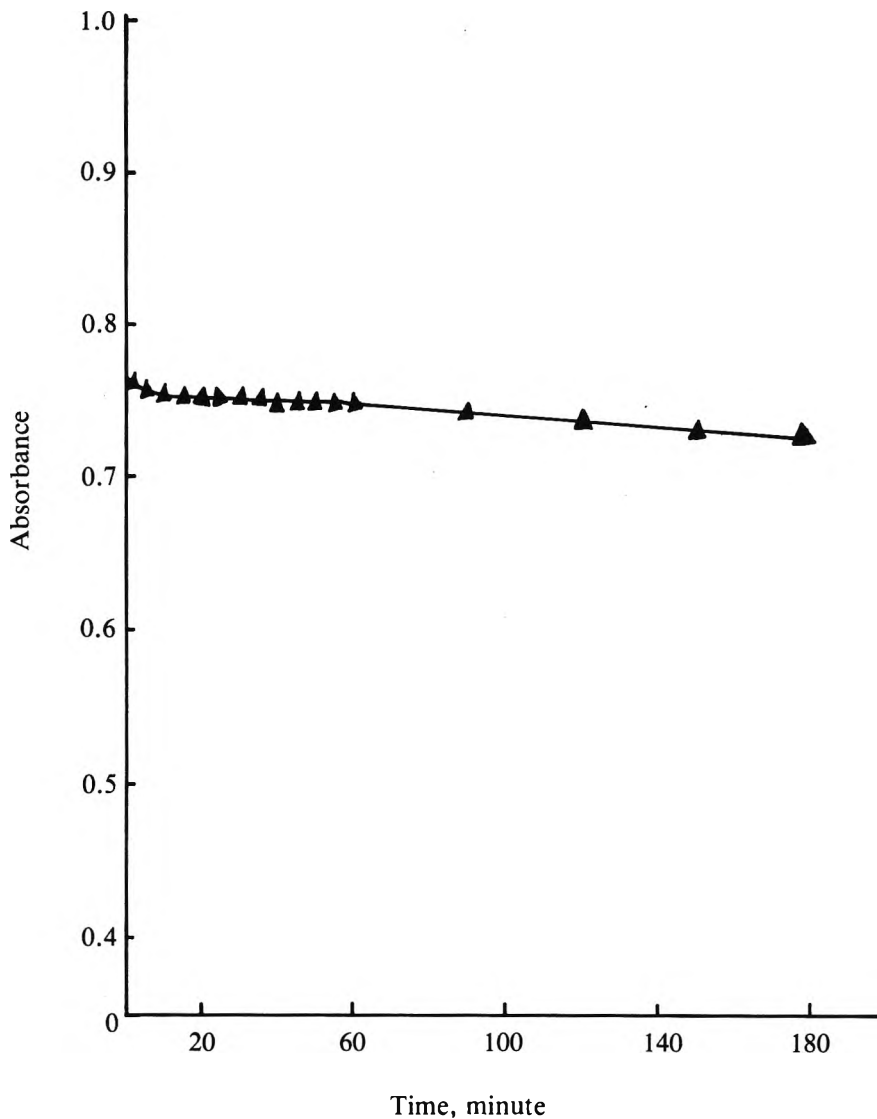
ผลของ pH ต่อปฏิกิริยาระหว่าง propranolol hydrochloride กับ fluorescamine แสดงไว้ในรูปที่ 3 จะเห็นว่าให้ค่า absorbance สูงที่ pH 9-10 และสูงสุดที่ pH 10 จะเห็นว่า pH มีความสำคัญต่อปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นเพราะการ protonation ที่ตำแหน่ง amino จะขัดขวางปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3 แสดงผลของ pH ต่อปฏิกิริยาการเกิด propranolol-fluorescamine derivative (ค่าเฉลี่ย  $n = 4$ )

### 1.3 ผลของเวลาต่อความคงตัวของ propranolol-fluorescamine derivative

ผลของเวลาต่อความคงตัวของ propranolol-fluorescamine derivative แสดงไว้ในรูปที่ 4 จะเห็นว่าค่า absorbance สูงสุดเกิดภายใน 2 นาที และให้ค่าเกือบคงที่ในช่วงแรก และจะลดลงช้าๆ จากข้อมูลนี้แสดงว่าเวลาเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทดลอง สำหรับการทดลองนี้เลือกวัดค่า absorbance ที่เวลา 15 นาทีหลังปฏิกิริยา

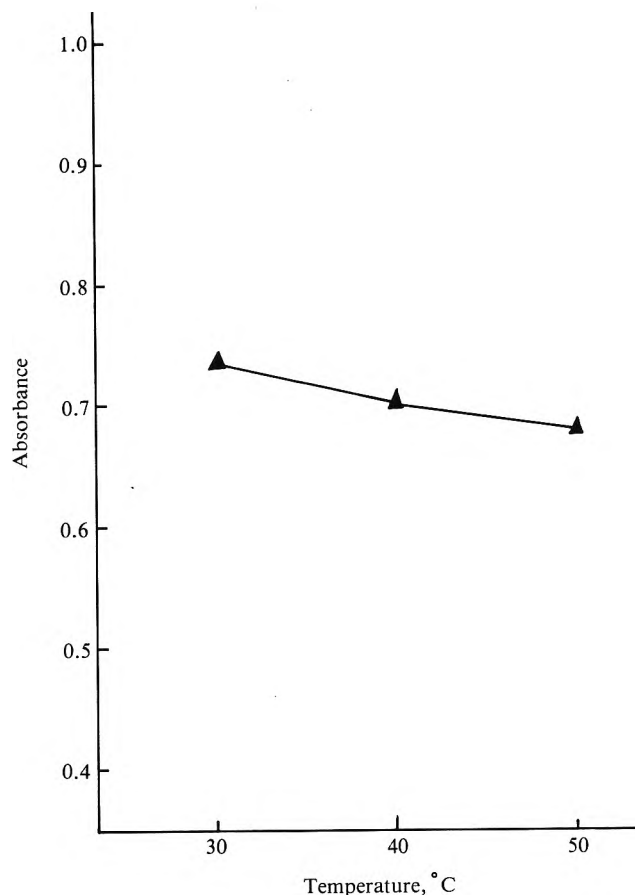


รูปที่ 4 แสดงผลของเวลาต่อค่า absorbance ของ propranolol-fluorescamine derivative (ค่าเฉลี่ย  $n = 4$ )



#### 1.4 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ propranolol-fluorescamine derivative

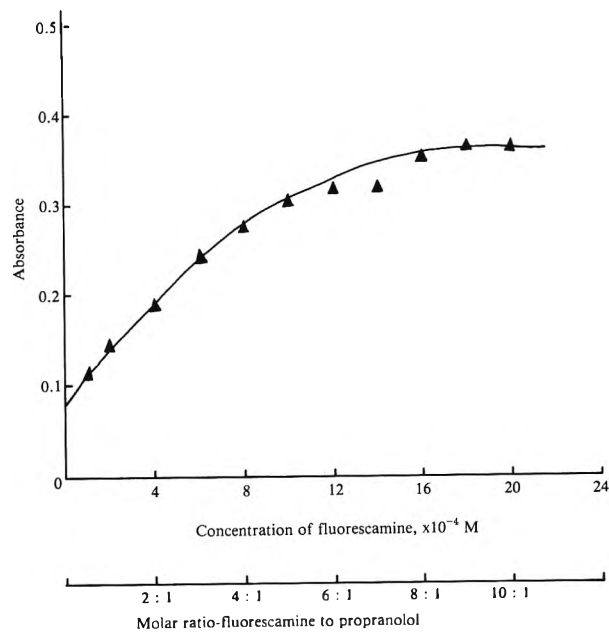
ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของ propranolol-fluorescamine derivative แสดงในรูปที่ 5 จะเห็นว่าค่า absorbance ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้เกิดการสลายของ derivative ที่เกิดขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) ให้ค่า absorbance สูงสุด จึงเลือกทำปฏิกิริยาในอุณหภูมิห้อง



รูปที่ 5 แสดงผลของอุณหภูมิต่อ absorbance ของ propranolol-fluorescamine derivative (ค่าเฉลี่ย n = 4)

#### 1.5 ผลของความเข้มข้นของ fluorescamine ต่อค่า absorbance ของ propranolol-fluorescamine derivative

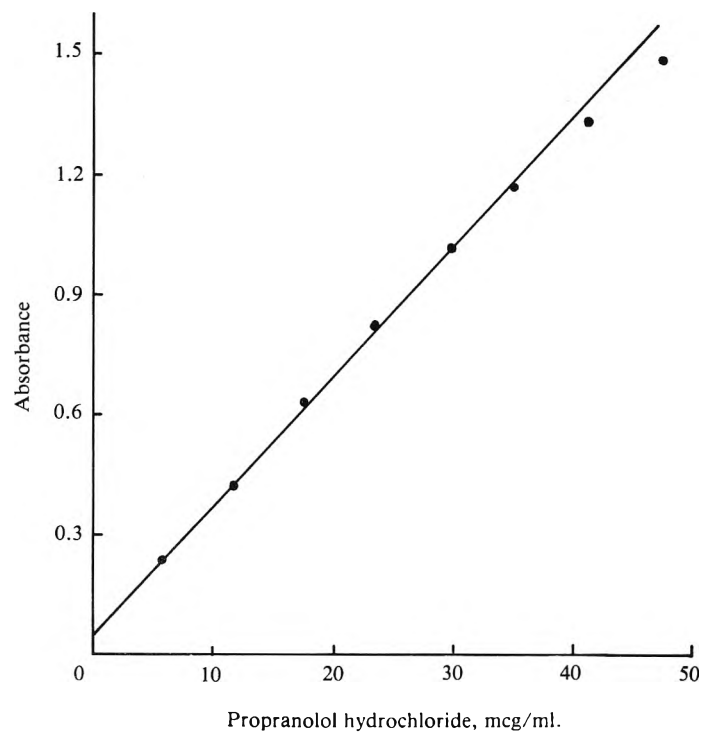
หาค่า absorbance ของ derivative โดยเปลี่ยนสารละลาย fluorescamine ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา ผลของความเข้มข้นของ fluorescamine หรือ mole-ratio ของ fluorescamine : propranolol ต่อค่า absorbance ของ propranolol-fluorescamine derivative แสดงในรูปที่ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การ form propranolol-fluorescamine derivative เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ fluorescamine และเกือบจะคงที่ที่ความเข้มข้น  $1.6 \times 10^{-3}$  -  $2.0 \times 10^{-3}$  M หรือใช้ fluorescamine 8-10 เท่าของ propranolol เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ นอกจากปฏิกิริยาที่เกิดระหว่าง fluorescamine กับ propranolol แล้ว ยังมีอีกปฏิกิริยาหนึ่งแข่งขันกับปฏิกิริยานี้คือปฏิกิริยา hydrolysis ของ fluorescamine ในน้ำให้ water soluble product ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ จึงใช้ fluorescamine ความเข้มข้น  $2 \times 10^{-3}$  M หรือเข้มข้นเป็น 10 เท่าของ propranolol ในการทดลองนี้



รูปที่ 6 แสดงผลของ fluorescamine concentration หรือ mole-ratio fluorescamine : propranolol ต่อค่า absorbance ของ propranolol-fluorescamine derivative (ค่าเฉลี่ย  $n = 4$ )

1.6 หาความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้นของ propranolol hydrochloride

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ (quantitative analysis) ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง เป็นปัจจัย



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของค่า absorbance กับความเข้มข้นของ propranolol hydrochloride (ค่าเฉลี่ย  $n = 4$ )

หนึ่งที่มีความสำคัญมาก ได้ทดลองหาความสัมพันธ์โดย plot calibration curve ระหว่างความเข้มข้นของ propranolol hydrochloride กับค่า absorbance แสดงไว้ในรูปที่ 7 ได้ linear concentration range ในช่วง 5.92 - 29.60 mcg/ml slope = 0.0331 ml/mcg และ % coefficient of variation = 0.61 - 7.24

2. เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ propranolol hydrochloride ใน dosage form ต่าง ๆ โดยวิธี Fluorescamine กับวิธี USP

วิเคราะห์หาปริมาณ propranolol hydrochloride ใน preparation ต่าง ๆ คือ ยาฉีด ความเข้มข้น 1 มก./มล. ยาเม็ด 10 มก. และ ยาเม็ด 40 มก. โดยใช้วิธี Fluorescamine และวิธี USP % L.A. ของ ยาฉีด ความเข้มข้น 1 มก./มล. = 98.32 และ 98.44% โดยมี % CV = 0.42 และ 0.78 สำหรับวิธี Fluorescamine และวิธี USP ตามลำดับ ยาเม็ด 10 มก. มี % L.A. = 97.58 และ 97.51 % CV = 0.38 และ 0.30 และ % L.A. ของ ยาเม็ด 40 มก. = 98.59 และ 99.25% โดยมี % CV = 1.01 และ 0.26% สำหรับวิธี Fluorescamine และวิธี USP ตามลำดับ แสดงไว้ในตารางที่ 1 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าวิธี Fluorescamine ให้ค่า % L.A. และ % CV ใกล้เคียง สามารถเปรียบเทียบกับวิธี USP ได้ดีในการวิเคราะห์หาปริมาณ propranolol hydrochloride ใน preparation ต่าง ๆ และเมื่อทดสอบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์โดยใช้ t test ที่ระดับความเชื่อมั่น 98% ปรากฏว่าวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ตำรับยา propranolol โดยวิธี Fluorescamine และวิธี USP (ค่าเฉลี่ย n = 5)

| Formulation                                | Fluorescamine Method |      | USP Method        |      | t test            |                    |
|--|----------------------|------|-------------------|------|-------------------|--------------------|
|  | % Labelled Amount    | % CV | % Labelled Amount | % CV | t <sub>cal.</sub> | t <sub>.01,8</sub> |
| Propranolol HCl<br>Injection 1 mg/ml       | 98.32                | 0.42 | 98.44             | 0.78 | .286              | 2.897              |
| Propranolol HCl<br>Tablet 10 mg/<br>tablet | 97.58                | 0.38 | 97.51             | 0.30 | .193              | 2.897              |
| Propranolol HCl<br>Tablet 40 mg/<br>tablet | 98.59                | 1.01 | 99.25             | 0.26 | 2.462             | 2.897              |

## สรุปผลการทดลอง

จากข้อมูลการทดลองแสดงว่า propranolol hydrochloride ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม secondary amine สามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธี spectrophotometry โดยใช้ fluorescamine ได้ศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทดลอง ได้แก่ pH, เวลา, อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของ fluorescamine และ linear absorbance concentration relationship propranolol-fluorescamine derivative ให้ค่า maximum absorption ที่ 319 nm pH ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาคือ pH 9-10, ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ภายใน 2 นาทีและให้ค่า absorbance ค่อนข้างคงที่ภายในชั่วโมงแรก ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) ให้ค่า absorbance สูงกว่าที่ 40 และ 50°C ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ fluorescamine ความเข้มข้น 8-10 เท่าของ propranolol hydrochloride จึงเลือกสารละลาย fluorescamine ความเข้มข้น  $2 \times 10^{-3}$  M สำหรับการทดลองนี้, linear concentration range อยู่ในช่วง 5.90 - 29.60 mcg/ml (0.61 - 7.24 % CV)

จากการทดลองหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา จึงนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ propranolol hydrochloride ใน preparation ซึ่งผลสามารถเปรียบเทียบได้ดีกับวิธี USP แต่เป็นวิธีวิเคราะห์ใหม่ ซึ่งทำงาน มีความไว ความแม่นยำสูง ใช้เครื่องมือง่าย และใช้เวลาน้อยกว่าวิธี USP และจากหลักการเดียวกันนี้ คิดว่าสามารถพัฒนาไปใช้ในการวิเคราะห์ยาในกลุ่ม secondary amine ตัวอื่น ๆ ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Weigele, M., DeBernardo, S.L., Tengi, J.P. and Leimgruber, W. (1972), "A Novel Reagent for the Fluorometric Assay of Primary Amines." *J.Amer.Chem.Soc.* 94(16), 5927-5928.
2. Weigele, M., Tengi, J.P., DeBernardo, S., Czajkowski, R. and Leimgruber, W. (1976), "Fluorometric Reagents for Primary Amines." *J.Org.Chem.* 41(2), 388-389.
3. Felix, A.M. and Terkelsen, G. (1973), "Determination of Hydroxyproline in Fluorometric Amino Acid Analysis with Fluorescamine." *Anal.Biochem.* 56(2), 610-615.
4. Stein, S., Bohlen, P., Stone, J., Dairman, W. and Udenfriend, S., (1973), "Amino Acid Analysis with Fluorescamine at the Picomole Level." *Arch.Biochem.Biophys.* 155(1), 203-212.
5. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. and Weigele, M. (1972), "Fluorescamine : A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range." *Science* 178, 871-872.
6. Perrett, D., Webb, J.P.W, Silk, D.B.A. and Clark, M. (1975), "The Assay of Dipeptides Using Fluorescamine and Its Application to Determining Dipeptidase Activity." *Anal.Biochem.* 68(1), 161-166.
7. Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W. and Udenfriend, S. (1973), "Fluorometric Assay of Proteins in the Nanogram Range." *Arch.Biochem.* 155(1), 213-220.
8. Toome, V. and Wegrzynski, B. (1978), "Chiroptical Properties of Fluorescamine Condensation Compounds with Amino Acid Esters *in situ*. Pyrrolinone Chirality Rule." *Biochem. Biophys. Res.Commun.* 85(4), 1496-1502.
9. Cheng, L.K., Levitt, M. and Fung H.L. (1975), "Fluorescence Reactions of Fluorescamine with Levodopa and Its Derivatives : Fluorescence Assay of 3-Methoxy-4-hydroxyphenylalanine in Levodopa Dosage Forms." *J.Pharm.Sci.* 64(5), 839-841.
10. Silva, J.A.F. and Strojny, N. (1975), "Spectrofluorometric Determination of Pharmaceuticals Containing Aromatic or Aliphatic Primary Amino Groups as Their Fluorescamine (Fluram) Derivatives." *Anal. Chem.* 47(4), 714-718.

11. Sterling, J.M. and Haney, W.G. (1974), "Spectrophotofluorometric Analysis of Procainamide and Sulfadiazine in Presence of Primary Aliphatic Amines Based on Reaction with Fluorescamine." *J.Pharm.Sci.* 63(9), 1448-1450.
12. Imai, K. (1975), "Fluorimetric Assay of Dopamine, Norepinephrine, and Their-O-Methyl Metabolites by Using Fluorescamine." *J.Chromatography.* 105(1), 134-140.
13. Ranieri, R.L. and McLaughlin, J.L. (1975), "Cactus Alkaloids XXVII. Use of Fluorescamine as a Thin-Layer Chromatographic Visualization Reagent for Alkaloids." *J.Chromatography*, 111, 234-237.
14. Imai, K., Böhlen, P., Stein, S. and Udenfriend, S. (1974), "Detection of Fluorescamine-Labeled Amino Acids, Peptides, and Other Primary Amines on Thin-Layer Chromatograms." *Arch. Biochem.Biophys.* 161(1), 161-163.
15. Nakamura, H. (1978), "Sensitive and Specific Detection of Tryptophan, Tryptamine and N-Terminal Tryptophan Peptides on Thin-Layer Plates Using a Unique Fluorogenic Reaction with Fluorescamine." *J.Chromatography.* 152, 153-165.
16. Stein, S., Böhlen, P. and Udenfriend, S. (1974), "Studies on the Kinetics of Reaction and Hydrolysis of Fluorescamine." *Arch.Biochem.Biophys.* 163(1), 400-403.
17. DeBernardo, S., Weigele, M., Toome, V., Manhart, K. and Leimgruber, W. (1974), "Studies on the Reaction of Fluorescamine with Primary Amines." *Arch.Biochem.Biophys.* 163(1), 390-399.
18. Nakamura, H. and Tamura, Z. (1980), "Fluorometric Determination of Secondary Amines Based on Their Reaction with Fluorescamine." *Anal.Chem.* 53, 2087-2092.
19. Weigele, M., DeBernardo, S. and Leimgruber, W. (1973), "Fluorometric Assay of Secondary Amino Acids." *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 50(2), 352-356.
20. Felix, A.M., Toome, V., DeBernardo, S. and Weigele, M. (1975), "Colorimetric Amino Acid Analysis Using Fluorescamine." *Arch.Biochem.Biophys.* 168(2), 601-608.

# Determination of Propranolol Using Fluorescamine

*Jintana Wangboonskul, M.S. (Pharm.) \**

*Darawan Thanyavuthi, M.S. (Pharm.) \*\**

*Sunibhond Pummangura, Ph.D. \*\**

## Abstract

Fluorescamine reacts with primary and secondary amines to form fluorescent pyrrolinones and nonfluorescent aminoenone type chromophores, respectively. A UV spectrophotometric method has been developed for the quantitative determination of propranolol which is a secondary amine drug. This experiment deals with studies on the reaction under various experimental conditions. It was shown that propranolol can be assayed with a very simple procedure using fluorescamine comparable to the official USP method. (Th.J.Pharm. Sci., Vol.12, No.2, 83-95 (1987)).

---

\* Siam Pharmaceutical Co., Ltd.

\*\* Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.