Bezmialem Science 2017; 5: 50-5
DOI: 10.14235/bs.2016.500

Tolterodinin İnsan Plazması ve Farmasötik Preparatlarda Dansil Klorür İle Türevlendirilerek Spektrofluorimetrik Tayini

Spectrofluorimetric Method for the Determination of Tolterodine In Human Plasma and Pharmaceutical Preparations by Derivatization with Dansyl Chloride

Şerife Evrim TEKKELİ
Department of Analytical Chemistry, Bezmialem Vakıf University School of Pharmacy, İstanbul, Turkey

ÖZ

Amaç: Tolterodin (TOL) üriner inkontinans tedavisinde kullanılan antimuskarinik bir ilaç etken maddesidir. Literatürdeki metotlar ilgili ilaç maddesinin biyolojik sıvılarda analizi için yeterince hassas değildir. Bu açığı kapamak üzere TOL'un plazma ve farmasötik ürünlerde tayini için hassas, düşük maliyetli bir spektrofluorimetrik yöntem geliştirilmiştir.

Yöntemler: TOL dansil klorürle reaksiyona giren bir fenolik hidroksil grup içermektedir. Geliştirilen metot pH 9,5 bikarbonat çözeltisi varlığında, 360 nm ekzitasyonla 590 nm'de diklorometanda ölçülen yüksek fluoresanslı türevin oluştuğu bu reaksiyona dayanmaktadır. Fluoresans şiddetini etkileyen çeşitli deneysel parametreler optimize edilmiştir. Fluoresans şiddeti ve TOL konsantrasyonu arasındaki bağıntı incelenmiştir.

Bulgular: Geliştirilen yöntem 5-60 ng mL^{-1} aralığında doğrusaldır. Dedeksiyon limiti 0,136 ng mL^{-1} dir. Geri kazanım %100,48 dir.

Sonuç: İnsan plazması ve farmasötik preparatlarda TOL için dansil klorür kullanarak basit, düşük maliyetli ve hassas bir spektrofluorimetrik bir yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntem valide edilerek yüksek doğruluk ve kesinlikle ilacın rutin analizlerinde, biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılabileceği ortaya kondu.

Anahtar Kelimeler: Tolterodin, dansil klorür, farmasötik preparat, plazma, türevlendirme

ABSTRACT

Objective: Tolterodine (TOL) is an anti-muscarinic drug used for the symptomatic treatment of urinary incontinence. Analytical methods in the literature are not sensitive enough for the assay of drug substance biological fluids. To make up the deficit, we developed a sensitive, cost-reduced spectrofluorimetric method for the determination of TOL in plasma and pharmaceutical preparations.

Methods: TOL has a phenolic hydroxyl group that reacts with dansyl chloride. The spectrofluorimetric method is based on this reaction in the presence of a bicarbonate solution of pH 9.5 to give a highly fluorescent derivative, which can be measured at 590 nm with an excitation wavelength at 360 nm in dichloromethane. Different experimental parameters affecting fluorescence intensity were optimized. The relationship between fluorescence intensity and TOL concentration was investigated.

Results: The developed method is linear in the concentration range of 5–60 ng mL–1 with a minimum detectability of 0.136 ng mL–1. The recovery was 100.48%.

Conclusion: A simple, cost-effective, and sensitive spectrofluorimetric method was developed and validated for the determination of TOL in human plasma and pharmaceutical preparations using dansyl chloride. According to this validation study, it is possible to use this proposed method for the routine analysis of the drug and for conducting bioavailability and bioequivalence studies with good accuracy and precision.

Keywords: Tolterodine, dansyl chloride, pharmaceutical preparations, plasma, derivatization

Giriş

Tolterodin (TOL) tartarat, (R)-N,N-diisopropil-3-(2-hidroksi-5 metilfenil)-3-fenil propanamin L-hidrojen tartarat, üriner inkontinans tedavisinde kullanılan antimuskarinik bir ilaç etken maddesidir (1-3). TOL, kolinerjik muskarinik reseptörlere çok yüksek afinite gösterir (4). 2 mg'lık oral uygulamayı takiben maksimum plazma konsantrasyonu 2-3 ng mL^{-1}'dır (5).

TOL'un biyolojik sıvılarda ve farmasötik preparatlarda analizi için literatürde çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar spektrofotometri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi, kapiler elektroforez teknikleriyle geliştirilmiş yöntemlerdir (9-12). Bu teknikler sofistike enstrüman veya zorlu numune hazırlama prosedürleri gerektirmektedir. İlaveten belirtilen spektrofotometrik metot TOL'un biyolojik sıvılarda analizini sağlayacak hassasiyette değildir.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Şerife Evrim TEKKELİ; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye E-mail: evrimkepekci@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 09.06.2015
Kabul Tarihi / Accepted: 09.05.2016

©Telif Hakkı 2016 Bezmialem Vakif Üniversitesi - Makale metnine www.bezmialemscience.org web sayfasından ulaşılabilir.
©Copyright 2016 by Bezmialem Vakif University - Available online at www.bezmialemscience.org

Spektrofluorimetri ilaç maddelerinin biyolojik sıvılarda ve farmasötik preparatlarda uygun reaktiflerle türevlendirilmesiyle duyarlı, basit, ekonomik ve hızlı analizine imkan sağlar. Buna karşın literatürde TOL'un spektrofluorimetrik olarak analizini sağlayan bir yöntem bulunmamaktadır. Bu çalışmada üriner inkontinans tedavisinde kullanılan TOL ilaç etken maddesinin dansil klorür reaktifiyle türevlendirilmesine dayanan yeni bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Dansil klorür fenol, primer ve sekonder amin grubu içeren ilaçların türevlendirilmesinde yaygın kullanılan bir fluorejenik türevlendirme belirtecidir (13-17).

Bu reaktifin kendisi fluoresans özellik göstermez. Bu durum reaktif fazlasının analizde girişim yapma durumu ortaya çıkarmamasından dolayı önemli bir avantajdır. Geliştirilen bu yöntem doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusallık, sağlamlık gibi parametreler göz önüne alınarak valide edilmiştir. Ayrıca, geliştirilen yöntem TOL'un plasma ve farmasötik preparatlarına uygulanmış ve numune bileşenlerinden kaynaklanan bir girişim saptanmamıştır. Dansil klorür ve TOL arasındaki türevlendirme reaksiyonu Şekil 1'de gösterilmiştir.

Yöntemler

Cihazlar

Fluoresans ölçümler Hitachi spektrofluorimetre (Model U-2900) ile yapılmıştır. Ksenon lamba ve 1 cm ışın yollu hücreler kullanılmıştır. Ekzitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 360 ve 590 nm'dir. pH ölçümleri WTW pH 526 digital pH metre ile yapılmıştır.

Reaktifler ve çözeltiler

Tolterodin tartarat Teva Tech (Israil) firmasından temin edilmiştir. Farmasötik preparat TOLTEX Film Tablet ® (her film tablet 2 mg of Tolterodin tartarat içerir) eczaneden, dansil klorür Sigma-Aldrich (Almanya) den satın alınmıştır. Tüm kimyasallar ve reaktifler analitik saflıktadır.

TOL'un stok çözeltisi 1 µg mL-1 olacak şekilde metanolde hazırlanmıştır ve çalışma çözeltileri için de yine metanol kullanarak çeşitli seyreltmeler yapılmıştır.

Dansil klorür günlük taze olarak asetonda

2,0 mg mL^{-1} olacak şekilde hazırlanmıştır. Sodyum bikarbonat (0,1 M) suda hazırlanmıştır, sodyum hidroksitle pH sı 9,5'a tamamlanmıştır. Bu çözelti 4°C'de bir hafta bekleyebilmektedir.

Genel prosedür

0,025-0,300 mL arasında uygun hacimlerde TOL stok çözeltisinden (1 µg mL^{-1}) deney tüplerine aktarılmış ve hacim metanolle 0,3 mL'ye tamamlanmıştır. Herbir tüpün üzerine 200 µL pH 9,5 bikarbonat çözeltisi ve 200 µL of dansil klorür çözeltisi ilave edilmiştir. Her reaksiyon karışımı 40°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Ardından oluşan türevler 5 mL diklorometana ekstre edilmiştir. Organik tabaka ayrılmış ve azot akımında uçurulmuştur. Aynı şekilde eş zamanlı şahit denemede yapılmıştır. 360 nm ekzitasyonla 590 nm deki fluoresans şiddeti ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı fluoresans şiddeti olacak şekilde kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi

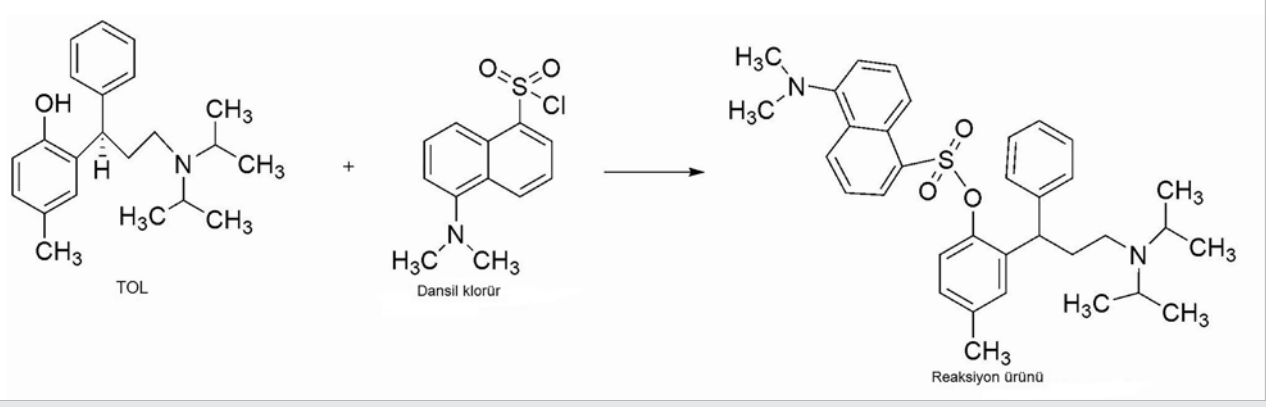
Kalibrasyon eğrisi TOL'un stok çözeltisi (1 µg mL^{-1}) seyreltilerek bir seri standart çözelti hazırlanmıştır. Genel prosedür bölümünde belirtilen proses uygulanmıştır (n=5). En küçük kareler yöntemi kullanılarak konsantrasyona karşı fluoresans şiddetine göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin denklemi I_f=aC + b, C ng mL^{-1} düzeyinde ilaç konsantrasyonu ve I_f ise fluoresans şiddetinin gösterir.

Tablet formülasyonu için analitik prosedür

2 mg of TOL içeren tablet tozu tartılmış ve 50 mL'lik bir balonjojeye aktarılmıştır. 15 mL metanol ilave edilmiş ve ultrasonik banyoda 20 dakika karıştırılarak ekstre edilmiştir. Hacim metanolle 50 mL'ye tamamlanmış ve son karışım süzülmüştür. Uygun miktarda süzüntü ile kalibrasyon eğrisi hazırlama bölümündeki gibi çalışılmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrisi denkleminden tablet içindeki madde miktarı hesaplanmıştır.

Plazma numunesi için analitik prosedür

100 µL'ler plazma numuneleri deney tüplerine alınmış ve değişik miktarlarda TOL çözeltileri ilave edilmiştir, üzerlerine 250 µL 0,1 N NaOH eklenmiştir. 3 mL of t-butylmethylether



Şekil 1. TOL ve dansil klorür arasındaki reaksiyon
TOL: tolterodin

ile vortex karıştırıcıda 5 dakika karıştırılarak ve 2000 rpm'de 6 dakika santrifüj ederek plazma numunesine TOL ekstre edilmiştir. Organik faz azot akımında kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kalıntı 0,2 mL metanolde çözünmüştür. Analizler 'Genel prosedür' bölümünde belirtildiği gibi yapılmıştır. Şahit denemelerde aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Plazmadan geri kazanım kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır. Plazma numuneleri temini için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay, gönüllülerden de yazılı onam formları alınmıştır.

Bulgular

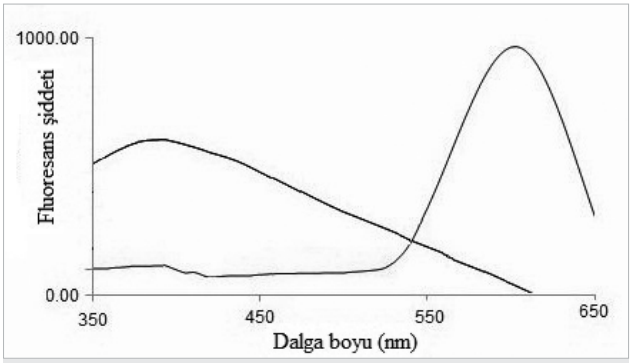
Fluorimetri oldukça hassas analiz sağlayan bir analitik yöntem olduğundan TOL'un plazma ve farmasötik preparatlarındaki analizleri için seçilmiştir. TOL kimyasal yapısında fenolik hidroksil grup içermektedir. Bu da onu dansil klorürle türevlendirilmeye elverişli hale getiren bir unsurdur.

Dansil klorür fluorimetrik türevlendirme için oldukça uygun ve yaygın kullanılan bir belirteçtir (13-17). Geliştirilen bu yeni yöntem, ilaç maddesinin dansil klorür ile türevlendirilmesine dayanmaktadır. Türevlendirme reaksiyonu pH 9,5 olan ortamda gerçekleşmiş ve oluşan türevin fluoresans şiddeti diklorometanda 360 nm ekzitasyonla 590 nm'de ölçülmüştür. İlgili spektrum Şekil 2'de gösterilmektedir.

Deneysel parametrelerin optimizasyonu

Türevlendirme reaksiyonunu etkileyen parametrelerin optimum değerlerini bulmak üzere çeşitli denemeler yapılmıştır. Bazı parametreler için farklı değerler denenirken diğerleri sabit tutulmuştur. Ekstraksiyon çözücüsü için de kloroform, diklorometan, dietil eter, benzen gibi farklı çözücülerle denemeler yapılmıştır. En yüksek verimle ekstraksiyonun diklorometan kullanılarak elde edildiği saptanmıştır. Optimum koşullarda oluşturulan türevin oda sıcaklığında 3 saat dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Öncelikle en yüksek verim sağlayan dansil klorür konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla 50 -300 µL arasında değişik hacimlerde % 0.02'lik dansil klorür çözeltileri ile denemeler yapılmıştır. 200 µL %0,02 lik dansil klorürün en uygun konsantrasyon olduğu saptanmıştır (Şekil 3).



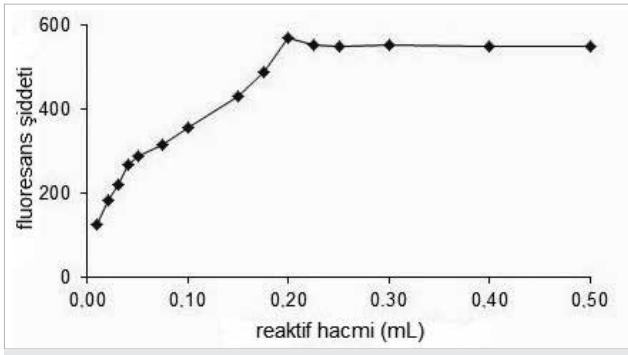
Şekil 2. Türeve ait spektrumlar

Ardından değişik pH'larda türevler oluşturularak optimum reaksiyon pH'sı belirlenmiştir. Dansil klorürün alkali alanda reaksiyon verdiği ön bilgisiyle denemeler pH 9-11 aralığındaki tampon çözeltilerle yapılmıştır. En yüksek fluoresans şiddeti pH 9,5 de, 200 µL tampon ilavesiyle sağlanmıştır (Şekil 4).

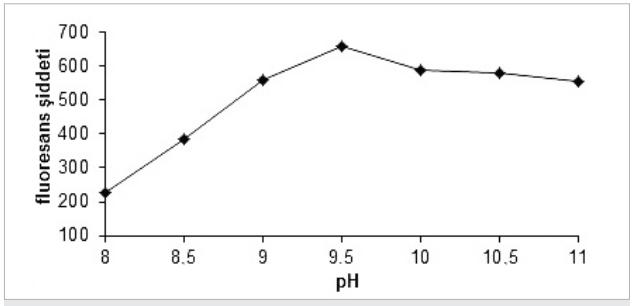
Reaksiyon ortamı sıcaklığı denemeleri ise 40, 50 ve 60°C'ler için yapılmıştır. Optimum 40°C ve bekleme süresi 10 dakika olarak saptanmıştır. Şekil 5 sıcaklık ve bekleme süresinin türevlendirme reaksiyonuna etkisini göstermektedir. Dansil klorürün TOL'e mol oranı da incelene bir parametredir. Bunun için Job'un sürekli değişken yöntemi kullanılmıştır. Dansil kloürürün TOL'e mol oranı 1 olduğu durumda reaksiyonun en yüksek verimle gerçekleştiği belirlenmiştir (18).

Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

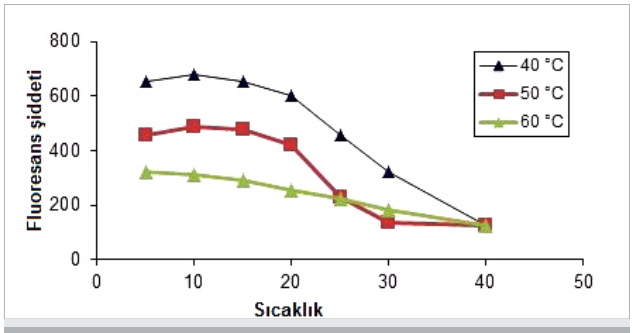
Validasyon prosedürü Uluslararası Harmonizasyon Konferansında belirlenen kriterler doğrultusunda yapılmıştır (19).



Şekil 3. Dansil klorür hacminin reaksiyon verimine etkisi (0,5 mg mL^{-1})



Şekil 4. pH'nın reaksiyon verimine etkisi



Şekil 5. Sıcaklık ve bekleme süresinin reaksiyon verimine etkisi

Kalibrasyon ve Hassasiyet: Yöntem 30-60 ng mL^{-1} konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Konsantrasyon ve fluoresans şiddeti arasındaki bağıntının denklemi I_f=14,975 *C*-108,43 şeklindedir. Dedeksiyon limiti (LOD) ve kanditasyon limiti (LOQ) şu eşitlikle hesaplanmıştır: LOD ve LOQ=κSSa/b, LOD için κ= 3 ve LOQ için κ=10 dur, SSa kesim noktasının ve b ise eğimin standart sapmasını göstermektedir. Yönteme ait analitik parametreler Tablo 1'de listelenmiştir.

Doğruluk, kesinlik ve seçicilik: Yöntemin doğruluğunu belirlemek için standart ekleme tekniği kullanıldı. Çeşitli miktarlarda saf TOL çözeltisi düşük, orta, yüksek diye nitelendirilebilecek üç farklı seviyede TOL içeren plazma numunelerine ilave edildi. Aşağıdaki eşitlikten geri kazanım hesaplandı.

Geri kazanım % = $[(C_t-C_u) / C_a]$ x 100 Eqs

C_t total analit konsantrasyonu; C_u ilaveden önce numunede bulunan analit konsantrasyonunu; ve C_a ise eklenen saf analit konsantrasyonunu temsil etmektedir. Sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. %100,40'lük geri kazanım yöntemin yüksek doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

Yöntemin seçiciliği numune bileşenlerinin analizde girişim yapmama durumunun bir ölçüsüdür. Tablet analizlerin yardımcı maddelerden herhangi biriyle girişim söz konusu olmamıştır, plasebo ile yapılan analizlerden bu sonuç ortaya çıkmıştır.

Gün içi ve günler arası olmak üzere iki tip kesinlik incelenmiştir. Üç farklı seviyede TOL konsantrasyonları aynı günde ve ardışık yedi günde aynı şekilde analiz edilmiştir (n=5). Relatif standart sapma (BSS) gün için için %0,53 and günler arası için %1,02 olarak bulunmuştur ve sonuçlar Tablo 2'de gösterilmektedir.

Sağlamlık: Analitik koşullrda yapılan küçük modifikasyonların yöntemi etkilemediği belirlenmiştir. Örneğin dansil klorür konsantrasyonunda % a/h ± 0,5, sıcaklıkta (optimum değer ± 2°C), ve bekleme süresinde (optimum değer ± 0,25 dak.) değişiklikler yapılmış ve BSS değerlerinin % 2 den fazla değişmediği saptanmıştır. Sonuçları en çok etkileyen parametre pH olarak belirlenmiştir. pH'nın 9,5±0,2 aralığında reaksiyonun gerçekleşebildiği gözlenmiştir.

Tabletlerde TOL analizi

Yeni geliştirilen yöntem TOLTEX *Film Tablet*® adlı farmasötik ürünlere uygulanmıştır. Tablo 3'de belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır, buna göre yöntemin tabletlere uygulanabilir olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan denemeler tablet yardımcı maddeleriyle girişim olmadığını ortaya koymuştur.

Plazma numunelerinde TOL analizi

Literatürde belirtilen bir çalışmada 20 gönüllüye oral yoldan 4 mg tek doz TOL uygulanmış ve farmakokinetik parametreleri hesaplanmıştır. C_{max} of 6,08±3,07 ng mL^{-1} olarak hesaplanmış ve bu değere ≈ 5,4 saatte ulaşıldığı belirlenmiştir (10). TOL'un geliştirilen yeni yöntemle TOL'a ait farmakokinetik değerleri de kapsayacak şekilde analiz yapılabilmektedir. Plazma analiz sonuçları Tablo 4'de görülmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak, geliştirilen yeni spektrofluorimetrik metot oldukça pratik ve uygulanabilirdir. Öncesinde komplike nu-

Tablo 1. Yönteme ait analitik parametrelerin sonuçları

Parametre	Değeri
Dalga boyu (nm)	λex: 360, λem:590
Konsantrasyon aralığı[a] (ng mL–1)	5,0-60,0
Regresyon denklemi[b]	
Kesim±ss	108,43±0,68
Eğim±ss	14,975±0,054
Belirtme katsayısı (r^2)	0,9981
Kesinlik	
Gün içi c, BSS %	0,53
Günler arasıd, BSS %	1,02
LOD (ng mL^{-1})	0,136
LOQ (ng mL^{-1})	0,434

[a]5 analizin ortalaması
[b]TOL konsantrasyonu ve fluoresans şiddeti arasında bağıntıyı saptamak için regresyon analizi yapılmıştır.
If=m *C* +b *C* ng mL^{-1} olarak TOL konsantrasyonu (bağımsız değişken) ve If fluoresans şiddeti (bağımlı değişken)
[c]n=5 her seviye için yapılan tekrar
[d]7 farklı gün sonuçları
TOL: tolterodin; LOD: dedeksiyon limiti; LOQ: kanditasyon limiti

Tablo 2. Standart ekleme yöntemi ile geri kazanım sonuçları

Sunulan Yöntem	Var olan miktar (ng mL^{-1})[a]	Eklenen miktar (ng mL^{-1})	Bulunan toplam miktar[b]	Geri kazanım (%) (ng mL^{-1}) (ortalama±ssc)	BSS (%)
	10	5	15,020±0,053	100,40	0,35
		30	40,120±0,230	100,40	0,57
		50	60,320±0,587	100,64	0,59

[a]TOLTEX *Film Tablet*® (2 mg)
[b]5 bağımsız analiz
[c]Standart sapma

Tablo 3. Tablette TOL analizi sonuçları (n=5)

Sunulan yöntem	Miktar[a] (mg tablet-1)	Ortalama[b]±SS	Geri kazanım (%)	BSS (%)
	2	2,01±0,015	100,5	0,76

[a]TOLTEX *Film Tablet*® (2 mg)
[b]5 Bağımsız analiz sonucu

Tablo 4. Plazmada TOL analizi sonuçları (n=5)

Sunulan yöntem	Eklenen (ng mL^{-1})	Bulunan±SD (ng mL^{-1})	Geri kazanım (%)	BSS (%)[a]
	5,0	3,76±0,25	75,23	6,65
	30,0	23,65±0,98	78,84	4,14
	60,0	48,01±1,54	80,01	3,21

[a]5 bağımsız analiz

mune hazırlama işlemlerine gereksinim duyulmamaktadır. TOL'un plazmada ve tabletlerinde yüksek doğruluk ve kesinlikle, oldukça hassas düzeyde analizine imkan sağlamaktadır. Bu yöntem biyoeşdeğerlik çalışmalarında, ilaca ait rutin analizlerde kullanılabilir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı alınmıştır.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadığını belirtmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study.

Informed Consent: Written informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

1. Hu T, Wagner TH, Bentkover JD, Leblanc K, Zhou SZ, Hunt T. Costs of urinary incontinence and overactive bladder in the United States: A comparative study. Urology 2004; 63: 461-5. [CrossRef]
2. Andersson KE. Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. Lancet Neurology 2004; 3: 46-53. [CrossRef]
3. Rovner ES. Trospium chloride in the management of overactive bladder. Drugs 2004; 64: 2433-46. [CrossRef]
4. Martindale, The Extra Pharmacopeia, 30th ed., UK: Pharmaceutical Press; 1993.
5. Hills CJ, Winter S´, Balfour JA. Tolterodine. Drugs 1998; 55: 813-6. [CrossRef]
6. Fraihat S. Spectrophotometric determination of tolterodine tartrate via charge-transfer complexation reactions. Journal of Chemical Society of Pakistan 2013; 35: 333-7.
7. Fraihat SM, Khatib HS. Indirect spectrophotometric determination of tolterodine tartrate in pure and pharmaceutical preparations. Asian Journal of Chemistry 2013; 25: 1887-90.
8. Sankar DG, Rao BD, Latha PVM, Krishna MV. Spectrophotometric determination of tolterodine tartarate and repaglinide. Asian Journal of Chemistry 2007; 19: 1616-18.
9. Macek J, Ptacek P, Klima J. Determination of tolterodine and its 5-hydroxymethyl metabolite in human plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2009; 877: 968-74. [CrossRef]
10. Zhang B, Zhang Z, Tian Y, Xu F. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of tolterodine tartrate in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005; 824: 92-8. [CrossRef]
11. Palmor L, Andersson L, Andersson T, Stenberg U. Determination of tolterodine and the 5-hydroxymethyl metabolite in plasma, plasma and urine using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1997; 16: 155-65. [CrossRef]
12. Zhou L, Thompson R, Song S, Ellison D, Wyvratt MJ. A strategic approach to the development of capillary electrophoresis chiral methods for pharmaceutical basic compounds using sulfated cyclodextrins. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2002; 27: 541-53. [CrossRef]
13. Hermes LP, Sherry W, Chester LB, Eric Y. A semi automated 96 well plate method for the simultaneous determination of oral contraceptives concentrations in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 2007; 852: 541-53.
14. Beaudry F, Guénette SA, Winterborn A, Marier JF, Vachon P. Development of a rapid and sensitive LC-ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. J Pharm Biomed Anal 2005; 39: 411-7. [CrossRef]
15. El-Enany N, Belal F, Rizk M. Spectrofluorimetric determination of oxamniquine in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 1 dimethylaminonaphthalene-5sulphonyl chloride. Journal of Fluorescence 2008; 18: 349-55. [CrossRef]
16. Cruces BC, Segura CA, Merino BE, Fernández GA. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic an-

tioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs. Talanta 1999; 50: 1099-108. [CrossRef]
17. Garcia SF, Cruces BC. Determination of the insecticide promecarb by fluorogenic labeling with dansyl chloride. Analyst 1991; 116: 851-8. [CrossRef]
18. Job P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. Analytical Chemistry 1928; 9: 113-203.
19. ICH, In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.