Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

التقدير الطيفي للتتراسايكلين في المستحضـــرات الصيدلانية بالاقتران التأكســـدي

لميـــاء فائـــق مرعـــي[1] ، محســـن حمـــــزة بكـــر[2] ، محمـد ســالم عبـد العزيز[3]

[1]شركة صلاح الدين – الدور

[2,3] قسم الكيمياء/كلية التربية للبنات–جامعة تكريت

[1]◊la.me55@yahoo.com

[2]dr_mohsin_analchem@yahoo.com

[3]salim_aziz30@yahoo.com

تاريخ استلام البحث:2015/2/19 تاريخ قبول البحث:2016/8/22

الملخص

تضمن هذا البحث تطوير طريقة طيفية لتقدير التتراسايكلين بالاقتران التأكسدي مع الكاشف N,N–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين بوجود العامل المؤكسد N–بروموسكسينيميد في الوسط القاعدي من بيكربونات الصوديوم و بزمن اكسدة 15 دقيقة لتكوين ناتج ذو لون بنفسجي ذائب في الماء، أظهر أعلى امتصاص لهُ عند الطول الموجي 552 نانوميتر، اطاعت الطريقة قانون بير في مدى من التراكيز تتراوح بين 10–32 مايكروغرام. مل$^{-1}$، وقد بلغت قيمة الامتصاصية المولارية 10579 لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$، وقيمة دلالة ساندل 0.0454 مايكروغرام. سم$^{-2}$، وحد الكشف 0.329 مايكروغرام. مل$^{-1}$، وقيمة معامل الارتباط 0.9942، والانحراف القياسي النسبي للطريقة لا يتجاوز 0.302% تم تطبيق الطريقة بنجاح على المستحضر الدوائي هيدروكلوريدالتتراسايكلين وبالطريقتين المباشرة والاضافة القياسية ولثلاثة تراكيز، وتراوحت الاسترجاعية بين 98.8–102.71%. ولقد تم اجراء معالجة احصائية للنتائج باستخدام

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

اختباري t و F وذلك بمقارنتها بنتائج الطريقة القياسية، واظهرت نتائج المعالجة الاحصائية عدم وجود فرق معنوي بين الطريقتين وبهذا تكون الطريقة المقترحة ذات صلاحية تطبيق جيدة على المستحضرات الدوائية .

الكلمات المفتاحية : التقدير الطيفي،التتراسايكلين، الاقتران التأكسدي.

Spectrophotometric Determination of Tetracycline, in pharmaceutical formulations by oxidative coupling

Lamia Faaq Mari[1] *Mohsin Hamza Bakir*[2] *Mohammed Salim Abdul Aziz*[3]

[1] slahaldin co. Dor [2,3]D. of Chemistry , Co.of Education for women , Uni. of Tikrit

[1]ola.me55@yahoo.com

[2] dr_mohsin_analchem@yahoo.com

[3] salim_aziz30@yahoo.com

Received date:19/2/2015 **Accepted date:22/8/2016**

Abstract

This research includes the development of spectrophotometric method for determination of Tetracycline via oxidative coupling with the N,N-Diethyl-p-phenylene diamine reagent in presence of oxidizing agentN-Bromosuccinimide in the alkaline medium oxidation time 15 min to form a colored-dye violet, which dissolved in water and showed the highest intensity of absorption at λ_{max} 552nm, the method has been obeyed Beer's Law in the concentration range (10-32µg. ml^{-1}), with molar absorptivity of 10579 L. mol^{-1}. Cm^{-1}, Sandel Index value 0.0454 µg. cm^{-2}, the detection limited 0.329 µg. ml^{-1}, with correlation coefficient 0.9942 , the relative standard deviation of the method does not exceed 0.302% the proposed method was applied successfully for the determination of Tetracycline Hydrochloride on pharmaceutical preparation by both the direct and standard addition methods for three concentrations, the recovery ranged between 98.8-102.71%. the evaluations of results of this method was a achieved applying t and F tests. The results showed that there is no significant difference between the proposed and standard method, and thus the proposed

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

method is of good validity for the determination Tetracycline in its pharmaceutical preparations.

Key Words **:** Spectrophotometric Determination , Tetracycline, oxidative coupling**.**

1.المقدمة : (Introduction)

توصف تفاعلات الازدواج التأكسدي بأنها تفاعلات بسيطة وعالية الحساسية [1]. استغلت تفاعلات الازدواج التأكسدي بشكل واسع في تقدير المركبات المهمة في مجال الزراعة والاغذية والبيئة والتحليلات السريرية والصيدلانية بتطبيق التقنيات التحليلية المختلفة مثل الطرائق الطيفية [2،3]،والتفلورية[4]،والكروماتوغرافيا[5]، وتقنية التحليل بالحقن الجرياني[6،7].

التتراسايكلينات هي مضادات حـــيوية لأنـــــواع عديدة من البكتريا الموجبة والسالبة الكرام (Gram negative, Gram positive)والبكتريا الهوائية واللاهوائية [8،9]. وتستخدم مركبات التتراسايكلين في علاج التهابات الجهاز التنفسي والجيوب الانفية والاذن الوسطى والمجاري البولية ويستخدم لمعالجة الالتهابات الجلدية وحب الشباب، والتتراسايكلين يبقى الاختيار الامثل لعلاج الالتهابات التي تسببها الكلاميديا التراخوما [10]. ويستخدم في امريكا واروبا علاجاً لمرض رصع النحل [11،12].

آلية عمل التتراسايكلين يعمل على تثبيط صناعة البروتين في خلية البكتريا وذلك بعرقلة وصول الاحماض الامينية إلى مناطق صناعة البروتين (الرايبوسومات) مما يؤدي إلى منع نمو سلسلة الببتيد . حيث يتركز الدواء داخل الخلايا الحساسة ليرتبط في الوحدة الثانية لرايبوسومات البكتريا بصورة انعكاسية ليمنع ارتباط امينو–اسيل (Amino–acyl–tRNA) مع الرايبوسوم[13] mRNA ، وهذه العملية ستمنع اضافة الحوامض الامينية إلى سلسلة الببتيد النامي وهذا ما يُفسر كون التتراسايكلين مثبطاً للنمو .

ويؤخذ هيدروكلوريدالتتراسايكلين واوكسي التتراسايكلين بجرعة 250–500 ملغرام اربع مرات يومياً قبل تناول الطعام بساعة ونصف أو ساعتين بينما يؤخذ ديموسايكلين 150–300 ملغرام مرتين يومياً ، ويؤخذ مونوسايكلين 50–100 ملغرام

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

مرة واحدة يومياً . بالإضافة إلى الفوائد العلاجية للتتراسايكلين هناك اعراض جانبية تحدث عند اخذ التتراسايكلين منها مشاكل في المعدة والامعاء وغثيان وتقيأ وصداع قوي ويزيد من خطر التعرض لأشعة الشمس مما يسبب حروقاً في البشرة. لوحظ ان سوء استخدام التتراسايكلين والافراط فيه يؤدي إلى نشوء بكتريا مقاومة له وهذا يقلل من استخدامه ، كما ان التتراسايكلينات تكون معقدات مع الايونات ثنائية التكافؤ مثل: الحديد والمغنسيوم والكالسيوم وبالتالي يقلل من امتصاصها لذلك لا تعطى مع الادوية الحاوية على الحديد أو مع الحليب ويسبب في عرقلة بناء الكالسيوم في الاسنان والعظام ويسبب اصفرارها أو اسوداد الاسنان لذلك لا يعطى للنساء الحوامل أو الاطفال تحت عمر 8 سنوات[14] . يمتص التتراسايكلين في الاثني عشري بعد اخذه عن طريق الفم وينتشر بسرعة في انسجة وسوائل الجسم ويتركز في الصفراء ويتم طرحه عن طريق الكلية [15] .

2.الهدف من البحث: (Aim of Research)

يهدف هذا البحث إلى تطوير طرائق طيفية جديدة وحساسة وبسيطة لتقدير التتراســايكلين(Tetracycline) ،وباستخدام تفاعلات الاقتران التأكسدي وتضمن البحث:

- الكواشف العضوية واللاعضوية المناسبة والتي تعطي افضل النتائج لإتمام هذا النوع من التفاعلات .
- إمكانية تطبيق الطرائق المطورة في تحليل المستحضرات الصيدلانية المختلفة والمذكورة أعلاه .
- المتغيرات الكيميائية والفيزيائية التي تؤثر على التفاعل من اجل الوصول إلى افضل الظروف اللازمة لتطوير طرائق ذات حساسية ودقة عاليتين .

3.الجـزء العمــلي: (Experimental Part)

* **المواد الكيميائية المستخدمة: Chemical Used**

استعملت المواد الكيميائية المُجهزة من الشركاتSDI, BDH , Fluka.

* **الأجهزة المستخدمة: Apparatus Used**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

تم استخدام االجهاز التالي للقياسات:

جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئيةUltra Violet Visible Spectro Photometer المجهز من شركة Shimadzu UV-1800..

* **محاليل المواد المستخدمة: Solution of the materials used**

- **محلول هيدروكلوريدالتتراسايكلين 1000 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ($2.079x10^{-3}$مولاري):**

حضر المحلول بإذابة0.1000 غرام من مسحوق هيدروكلوريدالتتراسايكلين فيكمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل من نفس المذيب.

- **محلول هيدروكلوريدالتتراسايكلين500 مايكروغرام.مل-1 (3-10x1.039مولاري):**

حضر المحلول بتخفيف 50 مل من المحلول القياسي 1000 مايكروغرام. مل$^{-1}$ في قنينة حجمية سعة 100 مل واكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر.

- **محلول N,N-ثنائي اثيل-بارا فنيلين ثنائي امين (2-10x1مولاري):**

حضر بإذابة 0.2623 غرام من مسحوق *N,N*-ثنائي اثيل-بارا فنيلين ثنائي امين في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل بنفس المذيب.

- **محلول العامل المؤكسد (N-بروموسكسينيميد) (3-10x3مولاري):**

حضر هذا المحلول بإذابة 0.0539 غرام من مسحوق *N*-بروموسكسينيميد في 3 مل من الاسيتون لأنهُ لا يذوب في الماء ويذوب في الاسيتون ثم أكملَ الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل بالماء المقطر.

- **محلول بيكربونات الصوديوم بتركيز (0.5مولاري):**

حضر بإذابة4.1500 غرام من بيكربونات الصوديوم في كمية قليلة من الماء ثم أكملَ الحجم إلى 100 مل من الماء المقطر.

- **محلول المستحضر الصيدلاني 500 مايكروغرام.مل-1:**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

المستحضر الصيدلاني الحاوي على التتراسايكلين موجود بشكل كبسول من انتاج الشركة العامة لصناعة الادوية SDIسامراء–العراق وهو: Tetracycline 500 mg.

حُضر محلول المستحضر الصيدلاني المذكور بتركيز 1000 مايكروغرام. مل$^{-1}$ وذلك بوزن 10 كبسولات للحصول على وزن 0.1000 غم ثم اذابتها في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مل بالماء المقطر ثم أخذ منهُ 50 مل لتحضير محلول 500 مايكروغرام. مل$^{-1}$ في قنينة حجمية سعة 100 مل واكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر.

4. النتائج والمناقشة : (Result and Discussion)

* **المبدأ العام للطريقة: The General Principle of the Method**

مبدأ الطريقة هو اقتران التتراسايكلين بالكاشف N,N–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين بوجود العامل المؤكسد N–بروموسكسينيميد في وسط قاعدي ضعيف إذ يتكون محلول ذو لون بنفسجي يعطي أعلى امتصاص عند الطول الموجي 552 نانومتر مقابل المحلول الصوري.

* **الدراسة التمهيدية: Preliminary Study**

عند اضافة 1 مل من محلول *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين إلى 1 مل من محلول التتراسايكلين بوجود 0.5 مل من محلول *N*–بروموسكسينيميد يتكون ناتج ذي لون بنفسجي حال إكمال الاضافات وتزداد سرعة تكونهِ عند اضافة 1مل من محلول بيكاربونات الصوديوم بتركيز 0.5مولاري وتم قياس الامتصاص بعد تخفيفه في قنينة حجمية سعة 25 مل إلى حد العلامة بالماء المقطر مقابل المحلول الصوري، وجد انه يعطي اعلى امتصاص عند الطول الموجي 552 نانوميتر في حين أن المحلول الصوري لم يعطي اي امتصاص في هذه المنطقة.

* **دراسة ظروف التفاعل المثلى: Study the Optimal Reaction Conditions**

تم اجراء التجارب اللاحقة باستخدام 1 مل من محلول التتراسايكلين ذي التركيز 500 مايكروغرام.مل$^{-1}$ في حجم نهائي 25 مل وقياس امتصاص المحاليل عند الطول الموجي 552 نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

* **اختيار أفضل عامل مؤكسد: Choose the best Oxidizing Agent**

أخذ 0.5 مل من كل من العوامل المؤكسدة المستخدمة ذي تركيز $3x10^{-2}$مولاري و 1مل من محلول الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$ مولاري والنتائج مبينة في الجدول (1).

الجدول(1): تأثير أفضل عامل مؤكسد في الامتصاص

Oxidizing agent $3x10^{-2}$ *M*	*Absorbance*		λ_{max}*(nm)*
	Blank	**Sample**	
N-Bromosuccinimide	0.054	0.327	552
Sodium nitroprusside	0.032	0.145	349
Potassium Iodate	0.004	0.182	413
Potassium dichromate	0.156	0.352	397

لُوحظَ من الجدول أعلاه أن *N*–بروموسكسينيميد يعطي أعلى امتصاص للناتج الملون عند الطول الموجي 552 نانوميتر مقارنة ببقية العوامل المؤكسدة المستخدمة، لذا تم استخدامهُ كأفضل عامل مؤكسد في التجارب اللاحقة.

* **تأثير كمية العامل المؤكسد: Effect of the Amount of oxidizing Agent**

تمت دراسة تأثير كمية العامل المؤكسد بمحلول *N*–بروموسكسينيميد ذي التركيز $3x10^{-2}$مولاري من خلال اضافة حجوم 0.1–3.5 مل منهُ إلى قنانٍ حجمية سعة 25 مل تحتوي على 1 مل من محلول التتراسايكلين ذي التركيز 500 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ومن ثم اضافة 1 مل من محلول الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$ مولاري ومن ثم اضافة 1 مل من 0.5 مولاري بيكاربونات الصوديوم وإكمال الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر والنتائج مدونة في الجدول(2).

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

الجدول(2): تأثير كمية العامل المؤكسد

ml of $3x10^{-2}M$ NBS	*Absorbance*	
	BW	*SB*
0.1	0.049	0.194
0.3	0.065	0.230
0.5	0.070	0.300
0.7	0.073	0.365
1	0.040	0.372
1.5	0.041	0.345
2	0.038	0.334
2.5	0.034	0.329
3	0.031	0.320
3.5	0.027	0.311

لوحظ من خلال النتائج المبينة في الجدول أعلاه أن أفضل حجم يعطي أعلى امتصاص للناتج الملون هو 1 مل وتم اعتماده في التجارب اللاحقة.

* **اختيار أفضل كاشف اقتران: Choose the best Detector Coupling**

تم أخذ 1 مل من كل من محاليل الكواشف المستخدمة ذي التركيز $1x10^{-2}$مولاري وحجم 0.5 مل من محلول العامل المؤكسد*N*–بروموسكسينيميد ذي التركيز $3x10^{-2}$مولاري. اتضح من النتائج أن الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين أعطى اعلى امتصاص للناتج الملون المتكون مقابل المحلول الصوري عند الطول الموجي 552 نانوميتر في حين أن المحلول الصوري لم يظهر له أي امتصاص عند الطول الموجي أعلاه، واعطى اعلى قيمة للامتصاصية المولارية. لذا تم اختيار هذا الكاشف في التجارب اللاحقة.

* **تأثير كميـــة كاشـــف الاقتران: Effect of the Amount of Coupling Reagint**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

تمت دراسة تأثير كمية كاشف الاقتران بأخذ حجوم مختلفة من محلول *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$مولاري تتراوح بين 0.5–2.5 مل مع حجوم مختلفة 0.5–4 مل من محلول التتراسايكلين ذي التركيز 500 مايكروغرام.مل$^{-1}$ تتراوح بين10و80 مايكروغرام.مل$^{-1}$ بوجود1مل من محلول *N*–بروموسكسينيميد ذي التركيز $3x10^{-2}$مولاري و1 مل من محلول 0.5 مولاري من بيكربونات الصوديوم في حجم نهائي 25 مل والنتائج مدونة في الجدول(3)

جدول(3): تأثير كمية كاشف الاقتران

ml of Reagent $1x10^{-2}$ M	*Abs/ml of Tetracycline.HCl 500 µg/ml*						R^2	$\varepsilon.L.mol^{-1}.cm^{-1}$
	BW	*0.5*	*1*	*2*	*3*	*4*		
0.5	0.000	0.181	0.199	0.203	0.257	0.291	0.9393	769
1	0.001	0.273	0.296	0.310	0.364	0.398	0.9731	865
1.5	0.041	0.399	0.425	0.483	0.566	0.681	0.9759	1923
2	0.090	0.463	0.463	0.463	0.463	0.463	0.9483	1731
2.5	0.139	0.621	0.652	0.733	0.795	0.835	0.9857	1538

لوحظ من النتائج المبينة في الجدول أعلاه أن حجم 1.5 مل من محلول *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$مولاري أعطى أعلى قيمة للامتصاصية المولارية وهي1923 لتر.مول$^{-1}$. سم$^{-1}$ لذا تم اعتمادهُ في التجارب اللاحقة.

* **تـأثيـر الدالـــــة الحامضية : Effect of pH**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

بعد أن تم تثبيت كمية بيكربونات الصوديوم 0.5 مولاري كأفضل قاعدة ومن ثم دراسة تأثير الدالة الحامضية بإضافة أحجام 0.2–2.5 مل منه، وقد وجد أن أفضل دالة حامضية هي 8.4 باستخدام 2 مل من بيكربونات الصوديوم لذا تم اعتمادهُ في التجارب اللاحقة والنتائج مبينة في الجدول (4).

الجدول(4): تأثير الدالة الحامضية

ml of 0.5 M Base	*Absorbance*		*pH*
	BW	*SB*	
0.2	0.045	0.348	7.3
0.5	0.044	0.400	7.9
0.7	0.046	0.408	8.1
1	0.045	0.418	8.2
1.5	0.042	0.421	8.2
2	0.043	0.431	8.4
2.5	0.040	0.428	8.4

* **تأثير درجة الحرارة مع الزمن:** **Effect of Temperature with Time**

تمت دراسة تأثير درجة الحرارة مع الزمن على امتصاص الناتج الملون المتكون واستقراريته باستخدام درجات حرارية 15–50 درجة مئوية مع مدة زمنية 5–60 دقيقة والنتائج مدونة في الجدول(5).

الجدول(5): تأثير درجة الحرارة مع الزمن

Temp C°	*BW*	*Absorbance/min. Standing time*								
		5	*10*	*15*	*20*	*25*	30	40	50	60
15	0.056	0.409	0.402	0.400	0.391	0.387	0.379	0.374	0.365	0.353
20	0.051	0.420	0.415	0.416	0.414	0.412	0.411	0.400	0.395	0.380
25	0.045	0.458	0.457	0.458	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459
30	0.037	0.412	0.400	0.404	0.374	0.371	0.371	0.370	0.358	0.358

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

40	0.120	0.326	0.325	0.321	0.319	0.319	0.290	0.276	0.255	0.232
50	0.109	0.320	0.315	0.314	0.309	0.307	0.281	0.277	0.259	0.241

لوحظ من الجدول أعلاه ان درجة الحرارة الامثل هي 25 م° إذ تكون قيمة امتصاص الناتج المتكون البنفسجي اللون مستقرة لمدة 60 دقيقة وهذا يعد ميزة في التفاعل، أما عند الدرجات الحرارية 50,40,30م°فأن لون الناتج يتغير ويقل امتصاصه في المدة الزمنية (30، 10، 5 دقيقة) على التوالي لذا تم الاعتماد على درجة حرارة الغرفة في التجارب اللاحقة.

* **استقراريه ناتج التفاعل : stability of reaction product**

تمت هذهِ الدراسة بأخذ ثلاثة حجوم مختلفة وهي 0.5،1.0،1.5 مل من محلول التتراسايكلين ذي التركيز 500 مايكروغرام.مل$^{-1}$ يمثل تراكيز 10، 20، 30 مايكروغرام.مل$^{-1}$ واضافة 1 مل من محلول*N*–بروموسكسينيميد ذي التركيز $3x10^{-2}$مولاري واضافة 1.5 مل من محلول الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$ مولاري و2 مل من بيكربونات الصوديوم ذي التركيز 0.5مولاري في قنينة حجمية سعة 25 مل وإكمال الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر، أن قيمة امتصاص الناتج الملون تبقى مستقرة لمدة لا تقل عن 60 دقيقة وتعد مدة مناسبة لإتمام العديد من القياسات والنتائج مدونة في الجدول (6) .

الجدول (6) : استقرارية ناتج التفاعل

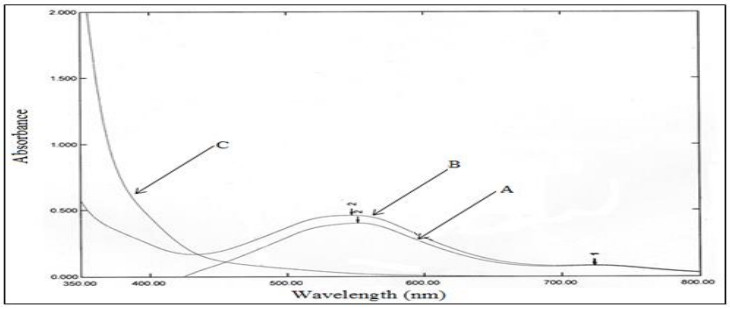
µg.ml^{-1} of Tetrac-ycline .HCl	*BW*	*Absorbance/min. Standing time*									
		5	*10*	*15*	*20*	*25*	30	35	40	50	60
10	0.075	0.354	0.397	0.390	0.390	0.391	0.391	0.390	0.390	0.390	0.390
20	0.077	0.462	0.463	0.463	0.462	0.462	0.462	0.460	0.460	0.462	0.460

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

30	0.077	0.548	0.542	0.542	0.543	0.543	0.542	0.542	0.543	0.542	0.542

* **طيف الامتصاص النهائـي: Final Absorption Spectrum**

تم قياس طيف الامتصاص النهائي بعد الوصول إلى الظروف المثلى وهي استخدام 1 مل من محلول التتراسايكلين ذي التركيز 500 مايكروغرام.مل$^{-1}$ و1.5 مل من الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$ مولاري و 1مل من العامل المؤكسد *N*–بروموسكسينيميد ذي التركيز $3x10^{-2}$مولاري و 2 مل من بيكربونات الصوديوم ذي التركيز 0.5 مولاري وبعد اتمام الاضافات وفق الظروف المثلى للتفاعل وإكمال الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 25 مل بالماء المقطر، ثم قياس امتصاص الناتج البنفسجي اللون مقابل محلوله الصوري وجد أنهُ يعطي أعلى امتصاص عند الطول 552 نانومتر في حين أن محلوله الصوري لم يُعطي أي امتصاص في هذه المنطقة، وكما هو مبين في الشكل(1) الذي يبين الامتصاص النهائي لتقدير التتراسايكلين.



الشكل(1): طيف الامتصاص النهائي لتقدير التتراسايكلين

أذ أن A: يمثل طيف امتصاص محلول التتراسايكلين مقابل المحلول الصوري، وB:يمثل طيف امتصاص محلول التتراسايكلين مقابل الماء المقطر، وC: يمثل طيف امتصاص المحلول الصوري مقابل الماء المقطر.

* **طريقة العمل المعتمدة ومنحني المعايرة: Procedure Construction of Calibration Curve**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

بعد تثبيت الظروف المثلى لتقدير التتراسايكلين حضر المنحني القياسي وحسب الآتي:

أضيفت حجوم متزايدة 0.5–1.6 مل من محلول التتراسايكلين ذي التركيز 500 مايكروغرام. مل$^{-1}$ إلى سلسلة قنانٍ حجمية سعة 25 مل وأضيف اليها 1 مل من محلول العامل المؤكسد *N*–بروموسكسينيميد ذي التركيز $3x10^{-2}$مولاري وأضيف اليها 1.5 مل من محلول الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين ذي التركيز $1x10^{-2}$ مولاري ثم أضيف 2 مل من المحلول القاعدي بيكربونات الصوديوم ذي التركيز 0.5 مولاري ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر ومن ثم قياس الامتصاص لجميع المحاليل مقابل المحلول الصوري عند الطول الموجي 552 نانومتر والشكل (2)

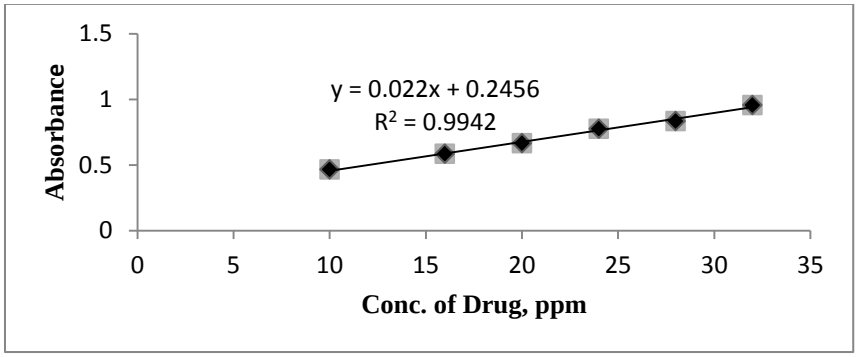
يمثل المنحني القياسي الذي يتبع قانون بير في حدود التراكيز من 10–32 مايكروغرام.مل$^{-1}$ من محلول التتراسايكلين كما مبين في الشكل (3)، وتم حساب قيمة الامتصاصية المولارية من القانون الآتي:

$$\varepsilon = a \times 1000 \times M \quad \text{.....(1)}$$

إذ إن ε: يمثل الامتصاصية المولارية(لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$)، و a: ميل المنحني (مل. مايكروغرام$^{-1}$. سم$^{-1}$)، و M: الوزن الجزيئي الغرامي للمادة المراد تقديرها (غم. مول$^{-1}$). وبلغت قيمة الامتصاصية المولارية للطريقة 10579 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$، وتم حساب دلالة ساندل من القانون الآتي:

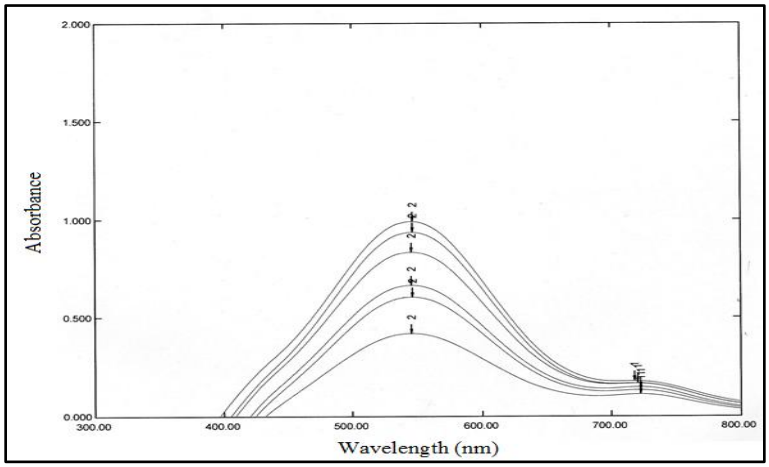
$$S = M / \varepsilon \quad \text{.....(2)}$$

حيث إن S: تمثل دلالة ساندل (مايكروغرام.سم$^{-2}$)، وبلغت دلالة ساندل 0.0454 مايكروغرام.سم$^{-2}$، وقيمة معامل الارتباط 0.9942 وهذا يدل على أن المنحني القياسي ذو مواصفات خطية عالية.



Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

الشكل(2): منحني المعايرة لتقدير التتراسايكلين بطريقة الاقتران التأكسدي بوجود *N*–بروموسكسينيميد وباستخدام الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين



الشكل(3): طيف الامتصاص لتراكيز بين10–32 مايكروغرام. مل$^{-1}$ من التتراسايكلين

* **الدقة والتوافقية : Precision and Harmonic**

تم حساب دقة الطريقة المقترحة لتقدير التتراسايكلين وتوافقيتها تحت الظروف المثلى المبينة في طريقة العمل وذلك من خلال حساب الاسترجاعية والانحراف القياسي النسبي (RSD) لثلاث تراكيز مختلفة من 16، 24، 32 مايكروغرام. مل$^{-1}$ بأخذ خمسة قراءات لكل منها، وكان معدل الاسترجاعية 98.883% والانحراف القياسي النسبي لا يتجاوز 0.302%، أي أن الطريقة ذات دقة عالية وذات توافق جيد وتم حساب كلاً من الاسترجاعية ومعدلها والانحراف القياسي النسبي رياضياً وكما يأتي:

$$RE,\% = O - T / T \times 100 \quad .....(3)$$

إذ إن RE: الخطأ النسبي.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

O : القيمة العملية.

T: القيمة الحقيقية.

وتحسب قيمة الاسترجاعية (Recovery)من القانون الآتي:

Recovery,% = RE% + 100 .....(4)

أما بالنسبة لحساب قيمة الانحراف القياسي النسبي فيتم تطبيق القانون الآتي [16]:

RSD,% = S/ $\overline{X}$ x 100 .....(5)

حيثُ إن S: الانحراف القياسي.

$\overline{X}$: معدل القراءات.

والنتائج مدونة في الجدول (7) التي تُبين الدقة والتوافقية.

الجدول(7): دقة الطريقة وتوافقيتها

Conc. Of Tetracycline .HCl µg/ml	*RE,%*	*Recovery,%*	*Average of Recovery,%*	*RSD,%*
16	-0.060	99.93	98.8	0.226
24	-2.575	97.41		0.033
32	-0.696	99.30		0.302

* **حد الكـشف: Detection Limit**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

تم حساب حد الكشف لتقدير التتراسايكلين عند الطول الموجي 552 نانوميتر، وذلك بقياس الامتصاص لأدنى تركيز مأخوذ من منحني المعايرة 10 مايكروغرام.مل$^{-1}$ ولخمسة قراءات وعند الظروف نفسها، ويمكن التعبير عن حد الكشف من العلاقة الرياضية الآتية [17]:

$$D.L = 3 \times S \times Conc. / \overline{X} \quad .....(6)$$

إذ إن D.L : حد الكشف.

S: الانحراف القياسي.

Conc.: أدنى تركيز لهدروكلوريدالتتراسايكلين في منحني المعايرة.

$\overline{X}$: معدل الامتصاص لسلسلة من القياسات لا تقل عن خمسة قراءات.

الجدول (8): حد الكشف

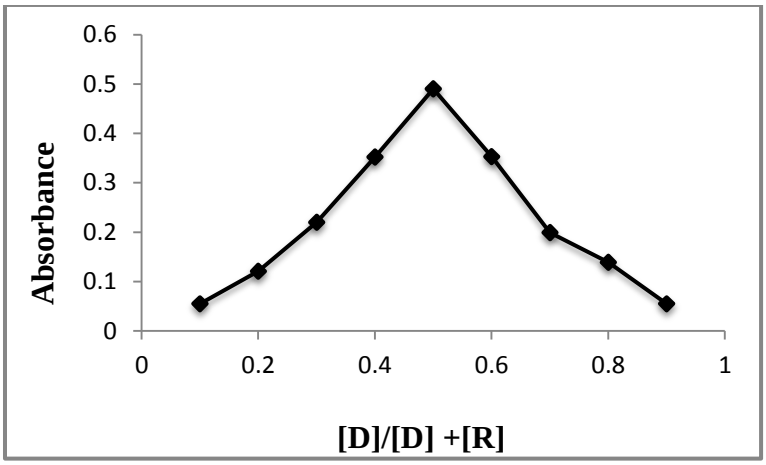
Concentration µg/ml	$\overline{X}$	*S*	*D.L µg/ml*
10	0.465	0.0051	0.329

* **طبيعة الناتج المتكون:** **The Nature of the Product Formed**

لمعرفة طبيعة الناتج المتكون ونسبة ارتباط العقار مع الكاشف تم تطبيق طريقتي التغيرات المستمرة (طريقة جوب) وطريقة النسبة المولية[18]، وفي كلا الطريقتين يكون تركيز كلٌ من محلول التتراسايكلين ومحلول الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين في نفس التركيز وهو $1x10^{-2}$مولاري، ففي طريقة جوب تم وضع سلسلة من قنانٍ حجمية سعة 25 مل بأضافة احجام مختلفة من محلول العقار تتراوح بين 1–9 مل وأضيفت مكملات هذهِ الاحجام إلى حجم 10 مل من محلول الكاشف ثم أكملت بقية الاضافات بالأحجام المثلى حسب طريقة العمل، ثم تم التخفيف إلى حد العلامة بالماء

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

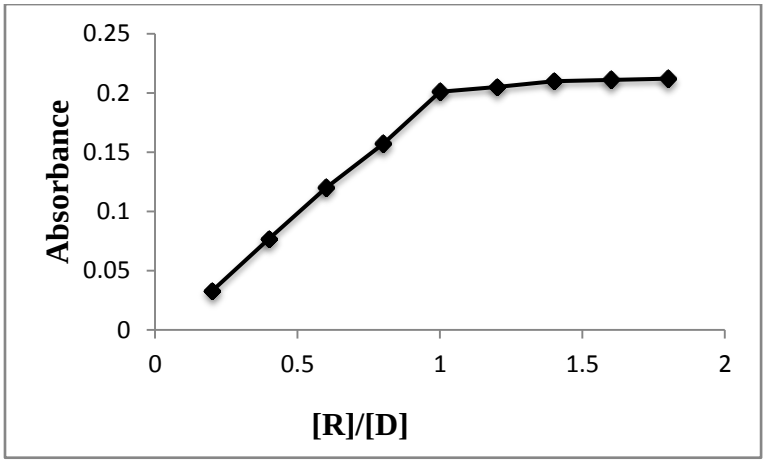
المقطر ومن ثم قياس الامتصاص لهذهِ المحاليل عند الطول الموجي 552 نانومتر مقابل محاليلها الصورية ويوضح الشكل (4) أن النسبة هي 1:1.



الشكل(4): طريقة جوب لتقدير التتراسايكلين مع الكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين

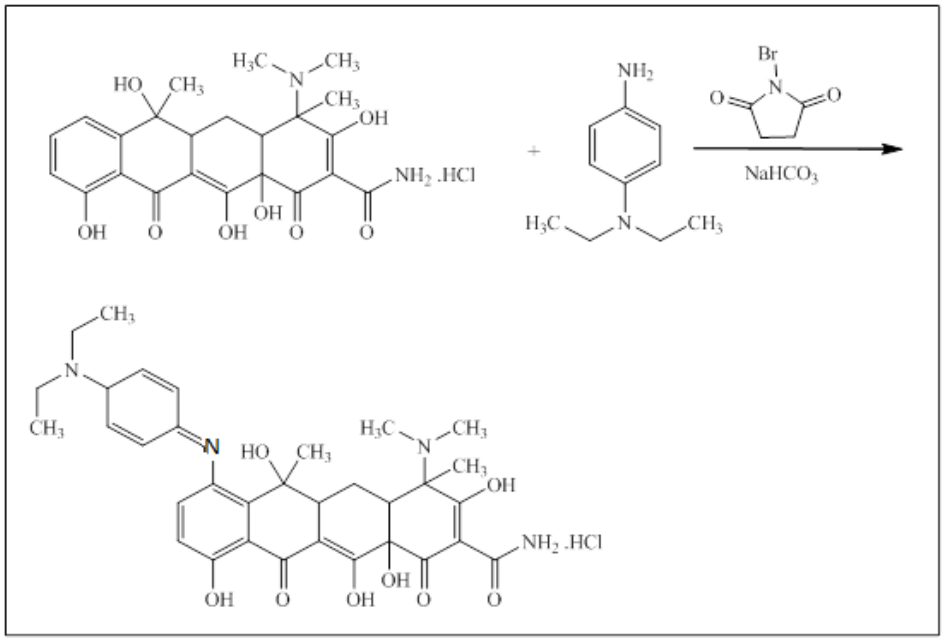
وللتأكد من أن نسبة التفاعل بين التتراسايكلين والكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين هي 1:1 استخدمت طريقة النسبة المولية تم وضع 1 مل من محلول العقار في سلسلة قنانٍ حجمية سعة 25 مل وأضيف اليها محلول الكاشف بأحجام مختلفة 0.2–1.8 مل ثم أكملت بقية الاضافات بالأحجام المثلى، وتم التخفيف بالماء المقطر إلى حد العلامة، وتم قياس الامتصاص لهذهِ المحاليل عند الطول الموجي 552 نانوميتر مقابل المحلول الصوري لكل منها، وجد أن النسبة المولية تتفق مع طريقة التغيرات المستمرة يبين الشكل (5) أن النسبة هي 1:1 بين التتراسايكلين والكاشف *N,N*–ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849



الشكل(5): طريقة النسبة المولية لتقدير التتراسايكلين بطريقة الاقتران التأكسدي

وعليه تكون معادلة التفاعل المقترحة كالآتي:



5.التطبيقات : (Application)

* الطريقة المباشرة : **Direct Method**

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

أخذت ثلاثة تراكيز مختلفة من محلول الدواء التجاري مبين تحضيرهُ سابقاً وهي 20، 28، 32 مايكروغرام.مل$^{-1}$ وعوملت المحاليل بنفس الخطوات المتبعة عند تحضير منحني المعايرة ومن ثم قياس الامتصاص لها عند الطول الموجي 552 نانومتر مقابل المحلول الصوري ولقد تم حساب معدل خمسة قراءات لكل تركيز بالإضافة إلى حساب الاسترجاعية وRSD كما في النتائج المبينة في الجدول (9).

الجدول(9): الطريقة المباشرة

Conc. Of Tetracycline.HCl µg/ml	*RE,%*	*Recovery,%*	*Average Recovery,%*	*RSD,%*
20	+2.718	102.71	100.4	0.261
28	-1.687	98.313		0.117
32	+0.307	100.30		1.174

تبين من نتائج الجدول أعلاه نجاح الطريقة المقترحة في تقدير التتراسايكلين في المستحضر الصيدلاني الحاوي عليه فقد بلغت قيمة معدل الاسترجاعية 100.4%.

* **طريقـــــة الاضافات القياسية : Multiple Standard addition method**

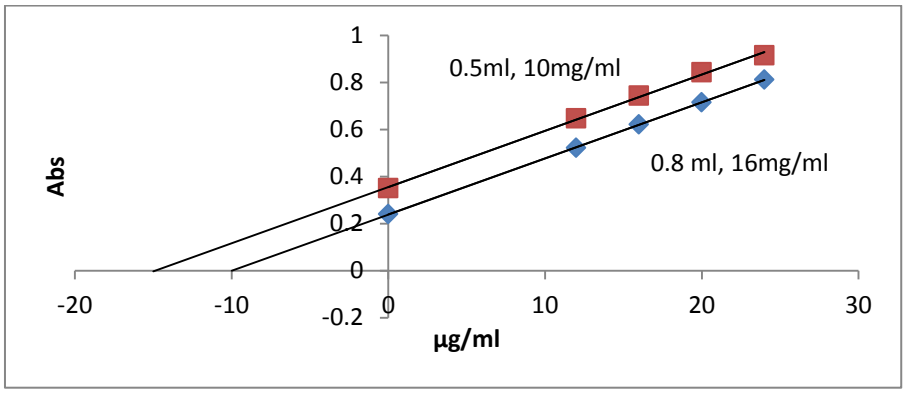
لمعرفة مدى كفاءة الطريقة المقترحة ودقتها طبقت طريقة الاضافات القياسية في تقدير التتراسايكلين في المستحضر الصيدلاني، فتضمنت الطريقة اضافة حجوم ثابتة 0.5، 0.8 مل من محلول كبسول التتراسايكلين 500 ملغم المحضر بتركيز 500 مايكروغرام. مل$^{-1}$في سلسلة قنانٍ حجمية سعة 25 مل واضافة حجوم متزايدة من 0.5، 1، 1.2، 1.4مل من المحلول القياسي النقي (pure) ذي التركيز 500 مايكروغرام. مل$^{-1}$وتركت إحدى القنانٍ بدون اضافة، وتم معاملة المحاليل السابقة بنفس طريقة العمل المستخدمة عند تحضير منحني المعايرة، ثم تم قياس الامتصاص (معدل خمسة قراءات) لكل محلول مقابل محلولهُ الصوري عند الطول الموجي 552 نانوميتر والنتائج مبينة في الجدول (10) والشكل(6).

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

الجدول(10): طريقة الاضافات القياسية

Type of Drug	*Tetracycline.HCl Present µg/ml*	*Tetracycline.HCl measured µg/ml*	*Recovery%*
Tetracycline.HCl 500mg/Capsule (S.D.I Iraq	10	9.81	98.1
	16	16.4	102.5

تبين من نتائج الجدول (10) أن طريقة الاضافات القياسية متفقة وبشكل جيد مع الطريقة المباشرة ضمن المدى المقبول للخطأ مما يدل على أن الطريقة مرضية.



الشكل(6): منحني الاضافات القياسية لتقدير التتراسايكلين في كبسول 500 ملغرام

* **تقييم النتائج Evaluation of Results**

أجريت مقارنة بين الطريقة التحليلية المقترحة والطريقة القياسية لمعرفة مدى دقة وصلاحية التطبيق التحليلي للطريقة المقترحة من خلال تطبيق الاختبارين الآتيين .

1. اختبار t: يستخدم هذا الاختبار للمقارنة بين مصداقية الطريقتين إذ تُحسب قيمة t التجريبية من المعادلة الآتية:

$$\pm t = (\overline{X}_1 - \overline{X}_2)/S_{pooled}\sqrt{\frac{N_1N_2}{N_1+N_2}} \quad \text{.....(7)}$$

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

إذ أن N_2,N_1: يمثل عدد القراءات للطريقة القياسية والطريقة المقترحة على التوالي.

$\overline{X}_1 , \overline{X}_2$: يمثل معدل الاسترجاعية للطريقة المقترحة والطريقة القياسية على التوالي.

Spooled : يمثل الانحراف القياسي المشترك للطريقتين ويمكن ايجاده باستخدام المعادلة الآتية:

$$S_{pooled} = \sqrt{\frac{\sum(X_1 - \bar{X}_1)^2 + \sum(X_2 - \bar{X}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}} \quad \text{.....(8)}$$

إذ وجد أن قيمة t التجريبية 0.285± أقل من قيمة t الجدولية البالغة 2.776 عند مستوى ثقة 95% ولأربع درجات حرية، وهذا يشير إلى أن الطريقتين لا تختلفان من حيث الدقة.

2. اختبار F: يستخدم هذا الاختبار لمعرفة فيما إذا كان هناك فرق معنوي بين دقة نتائج الطريقة المقترحة والطريقة القياسية إذ تستخدم المعادلة الآتية لإيجاد قيمة F:

$$\mathbf{F = S_1^2 / S_2^2 \text{.....(9)}}$$

إذ إن $S_1^2 > S_2^2$.

S_1^2 و S_2^2: يمثل التباين للطريقتين الاولى والثانية على التوالي وأن S^2 هي:

$$S^2 = \sum(X_i - \bar{X}_i)^2 / N - 1 \quad \text{.....(10)}$$

X_i: تمثل قراءة تحليلية معينة.

$\overline{X}_i$: معدل قراءات القيم.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

N-1: تمثل درجات الحرية.

وبتطبيق المعادلة الاحصائية في أعلاه وجد أن قيمة Fالتجريبية 1.142 أقل من قيمة F الجدولية البالغة 6.39 عند مستوى ثقة95% ولأربع درجات حرية، لذا يمكن أن نحكم بأنه لا يوجد فرق معنوي بين الطريقتين، وأن الانحراف القياسي لكلتا الطريقتين ناتج عن اخطاء عشوائية، وبهذا تكون طريقة الاقتران التأكسدي المقترحة ذات صلاحية تطبيق جيدة على المستحضر الدوائي.

* **مقارنة الطريقة: Comparsion of method**

تَمَّ مقارنة المتغيرات التحليلية للطريقة الحالية لتقديرالتتراسايكلين مع طـــرائق طيفية أخــرى والنتائج مدونة في الجدول(11) .

الجدول(11) مقارنة الطريقة مع طرائق طيفية اخرى

Analytical Parameters	***Literature Method***	***Literature Method***	***Present Method***
λ_{max}(nm)	750	420	552
Temperature ($^{\circ}$C)	R.T	---------	25
Medium of reaction	Acidic	---------	Alkaline
Solvent	---------	---------	Water
Reagent	*p*- nitro aniline	4-Aminoantipyrine	*N*,*N*-Diethyl-*p*-Phenylene di Amine
Beer's Law rang (ppm)	0.4-32	---------	10-32
Molar absorptivity 1 mol^{-1}. cm^{-1}	$2.59x10^{4}$	---------	10579
RSD%	≤0.72	---------	0.302
Colour	Yellow	Red	Violet
Nature of the Dye	1:1	1:1	1:1

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

6.الاستنتاجات (Conclusions)

تم تطوير طريقة طيفية لتقديرالتتراسايكلين سهلة وذات حساسية عالية تعتمد على تفاعل الاقتران التأكسدي باستخدام *N*-بروموسكسينيميد مع محلول الكاشف *N,N*-ثنائي اثيل بارا فنيلين ثنائي امين في وسط قاعدي من بيكربونات الصوديوم بتركيز 0.5 مولاري، بعد إكمال الاضافات يتكون الناتج النهائي للتفاعل البنفسجي اللون ومستقر ويعطي أعلى امتصاص عند الطول الموجي 552 نانوميتر وتتبع قانون بير في مدى 10-32 مايكروغرام.مل$^{-1}$ بمعامل ارتباط 0.9942 وبلغت الامتصاصية المولارية 10579 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ ودلالة ساندل 0.0454 مايكروغرام.سم$^{-2}$، والانحراف القياسي النسبي لا يتجاوز 0.302% طبقت الطريقة بنجاح في تقدير التتراسايكلين في المستحضر الصيدلاني (الكبسول)، وقد تراوحت الاسترجاعية ما بين 98.8- 102.71%.

7.المصـــادر: (References)

[1] M.T.K. Hammasur, *"Physical and analyticalstudies on some chemiluminescence and oxidative coupling organic reactions"* ,***Ph. D. Thesis,*** Baghdad University, (2000), 86-87.

[2] C.S.P. Sastry, & D.M. Krishina, *"Spectrophotometric methods for the determination of labetalol in pure and dosage forms"* ,***Mikrochim. Acta.***, (1996), 122, 87-93.

[3] E. S. Salih, ***J. Educ. Sci.*** , 23, 32-41 (1995).

[4] P.Husek, J. Malikova, & G. Herzogova,*"Determination of plasma catecholaminesvia condensation with di phenylethylenediamine: simplification of the procedure"* ,***J. Chromatogr. Biomed. Appl.*** , (1990), 533, 166-170.

[5] M.C. Pietrogrande, G. Blo, & C. Bighi, *"Highi-performance liquid chromatographic determination ofnaphthols as 4-aminoantipyrine derivatives :Application tocarbary"* ,***J.Chromatogr.*** (1985), 349(1), 63-68.

[6] S. S. A. Al-Dilaimi, ***M. Sc. Thesis.*** , Baghdad University, (1999).

[7] M.Q. Al-Abachi, & S.I. Al-Najafi,*"Flow injection analysis of 4-aminoantipyrinein aqueous solution via oxidative coupling reaction with aniline and N-bromosuccinamide"* , ***J. Educ. Sci.*** ,(2001), 49, 13-28.

[8] S. Sczesny, H. Nau& G. Hamscher, *"Residue analysis of tetracycline their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with amicrobiological assay and tandem mass-spectrometry"*, ***J. Agric. Food. Chem.*** ,(2003), 51(3), 697-701.

[9] D. F. William, L. Thomas, *"Principles of medicinal chemistry"* , 5thEdn. , Lippincott Williams and wilkins, Philadelphia., USA. ,(2002), p.1114.

[10] SK. Bhattacharya,*"An evolutionofcurrent cholera treatment"* , ***Expert OpinPharmacother.*** , (2003), 4(2), 141-146.

[11] W. Reybroeck, S. Ooghe, H. D. Brabander, & E. Daeseleire, ***"Validation of the tetrasensorhonytest kit for the screening of tetracycline in honey"*** , ***J. Agric. Food Chem.*** , (2007), 55, 8359-8364.

[12] M. Jeon, I.R. Paeng,*"Quantitative detectionof tetracycline residues in honey by a simple seasitive immunoassay"* , ***Anal. Chem. Acta.***,(2008), 626, 180-185.

[13] S. Navigation, ***"Martin dell complete drug reference"*** , 34thEdn., ***Pharmaceutical Press***,London, (2005), p.266-269. 66. DE. Amacher,& BA. Martin, *"Tetracycline induced steatosis in primary canine hepunatocyte cultures"*,***Fundamental and Applied Toxicology.*** ,(1997), 40(2), 256-263.

[14] C. L. Bare, B. R. Williams,***Clinicalpharmacology and nursing.*** , 3rd End. , Springhouse corporation Pennsylvania, (1996), p. 1025.

[15] G. D. Christian, *"Analytical Chemistry"*, 6thEdn, John Wiley and Sons, Inc.,New York, 2004, p 90.

[16] ثابت سعيد الغبشة، مؤيد قاسم العبايجي، "التحليل الوصفي والحجمي"، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، 1989، ص 413 – 421.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 11, Issue 4, December 2016 , p.p(159-183)
ISSN 1992 – 0849

[17]G.D.Christian, *"Analytical Chemistry"*, 6thEdn, John Wiley and Sons, Inc., New York, 2004, p 90. عبد المحسن عبد الحمـــيد الحيدري،"التحليل الكيميائي الآلي" ، المكتبة الوطنية، دار الكتب والوثائق، جامعة بغداد ، 1999،[18] ص 174–177.