Journal of Education and Science
Vol. 28, No.4, 2019, pp.48-69
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

Spectrophotometric Determination of Mesalazine, Carbamazepine and Diclofenac Sodium in Pharmaceutical Preparations by Using Nile Blue Dye

Abdussamed M. A. Saeed
Branch of Basic Science
College of Agriculture and Forestry
University of Mosul, Iraq
abdmas74@hotmail.com

Elham S. Salih
Department of Chemistry
College of Education for Pure Science
University of Mosul, Iraq
elhamsalih@gmail.com

DOI: 10.33899/edusj.1970.163325

Received **7/11/2018** **Accepted** **27/2/2019**

Abstract

A simple and accurate spectrophotometric method has been suggested for the determination of Mesalazine (MES), carbamazepine (CAM) and diclofenac sodium (DFS) in pure and pharmaceutical dosages. The method is based on the oxidation of drugs in acidic medium with known excess of N-bromosuccinimide (in case of MES), or bromate-bromide mixture (in case of CAM and DCF) and subsequent determination of unreacted oxidant by decolorization of nile blue dye (NB) and measure the absorbance of unoxidized dye at 640 nm. Calibration curves of the dye in the presence of studied drugs were rectilinear over the ranges 0.1-2.2, 0.4-2.4 and 0.6-2.8 µg ml^{-1} with molar absorptivity of 6.21×10^4, 1.05×10^5 and 1.21×10^5 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$ for MES, CAM and DCF respectively. The common excipients and additives didn't interfere in their determination. The suggested method was successfully applied for determination of the studied drugs in their pharmaceutical forms resulted in a good agreement with standard British pharmacopeia method and standard addition procedure.

Keywords: Spectrophotometric determination, Mesalazine, Diclofenac Sodium, Carbamazepine, Nile blue dye.

التقدير الطيفي غير المباشر للميزالازين والكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم في المستحضرات الصيدلانية باستعمال صبغة النيل الأزرق

عبد الصمد محمد علي سعيد
شعبة العلوم الأساسية
كلية الزراعة والغابات
جامعة الموصل
abdmas74@uomosul.edu.iq

إلهام سعد الله صالح
قسم الكيمياء
كلية التربية للعلوم الصرفة
جامعة الموصل
elhamsalih@gmail.com

DOI: 10.33899/edusj.1970.163325

الاستلام 2018/11/07

القبول 2019/02/27

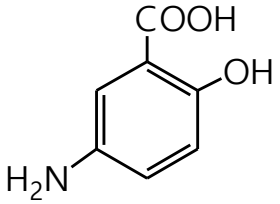
الخلاصة

تم اقتراح طريقة طيفية حساسة وبسيطة لتقدير الميزالازين والكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم بشكلها النقي وفي المستحضرات الصيدلانية. تعتمد الطريقة على أكسدة المركبات الدوائية في الوسط الحامضي بزيادة معلومة من N–بروموسكسينميد (للميزالازين) أو برومات–بروميد (للكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم) ثم تقدير المتبقي من العامل المؤكسد من خلال قصر لون صبغة النيل الأزرق وقياس امتصاص المتبقي من الصبغة عند طول موجي 640 نانوميتر. إذ أن امتصاص الصبغة يزداد خطياً مع زيادة تركيز المركبات الدوائية ضمن المدى 0.1-2.2 و0.4-2.4 و0.6-2.8 مايكروغرام/ مللتر مع امتصاصية مولارية 6.21×10^{4} و1.05×10^{5} و1.21×10^{5} لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ لكل من الميزالازين والكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم على التوالي. طبقت الطريقة بنجاح على المستحضرات الصيدلانية، وكانت الطريقة متفقة مع الطريقة القياسية المعتمدة في دستور الأدوية البريطاني وطريقة الإضافة القياسية.

الكلمات المفتاحية: تقدير طيفي وميزالازين وكاربامازيبين ودايكلوفيناك صوديوم وصبغة النيل الأزرق

المقدمة

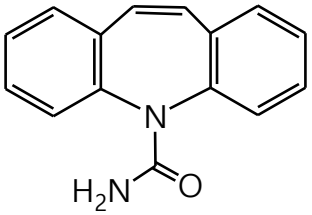
إن الميزالازين (أو الميزالامين mesalamine) عبارة عن دواء مضاد للالتهاب، يستعمل في علاج التهاب القناة الهضمية ومرض كرون وعلاج تقرحات القولون الحادة، إذ يقلل من الاندفاعات النزفية في نهاية القناة الهضمية [1]، ويعمل على تثبيط تكوين المركبات الايضية لحامض الاراكيدونيك (arachidonic acid) والتي تتفاقم في المرضى المصابين بالتهاب الامعاء المزمن فتقل التهابات القولون بشكل ملحوظ [2]، ويمتلك الميزالازين التركيب الكيميائي الآتي [3]:



Mesalazine ($C_7H_7NO_3$) 5-aminosalsylic acid
Molar mass = 153.1 g/mol

الكاربامازيبين Carbamazepine

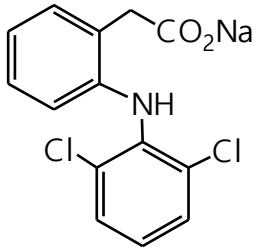
الكاربامازيبين أو ما يعرف تجارياً بالتيكريتول (Tegretol) عقار يستعمل لعلاج حالات الصرع ومسكن لآلام الأعصاب ويقلل من أعراض الهوس، ويستعمل كذلك بوصفه دواء مساعد في علاج حالات الفصام مع الأدوية الأخرى المستعملة لهذا الغرض [4]، وللكاربامازيبين التركيب الاتي [3]:



Carbamazepine ($C_{15}H_{12}N_2O$)
5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide
Molar mass = 236.3 g/mol

الدايكلوفيناك صوديوم Diclofenac Sodium

يعد الدايكلوفيناك من مضادات الالتهابات غير الستيرويدية، إذ يستخدم للحد من التهابات ما بعد الجراحة [5]، ويستعمل بوصفه مسكن فعّال للألم وخافض للحرارة [4]. يمتلك الدايكلوفيناك صوديوم التركيب الكيميائي الآتي [3]:



Diclofenac Sodium ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$)
Sodium 2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetate
Molar mass = 318.1 g/mol

استعملت طرائق تحليلية مختلفة لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة، وفيما يأتي مراجعة لبعض هذه الطرائق.

تم استحداث طرائق طيفية لتقدير الميزالازين في المستحضرات الصيدلانية وذلك إما بتفاعلات الاقتران التأكسدي باستعمال نظامي الثايمول–ميتابيريودات الصوديوم [6]، و6,2–زالينول–ميتابيريودات الصوديوم لتكوين صبغة الاندوفينول الزرقاء [7]، أو تكوين معقدات الشحنة المنتقلة مع الكواشف TCNE وDDQ [8]، وأورثو–كلورانيل [9]، أو تفاعله مع نيتربروسيد الصوديوم بوجود هيدروكسيل أمين هيدروكلوريد لتكوين ناتج ملون يقاس

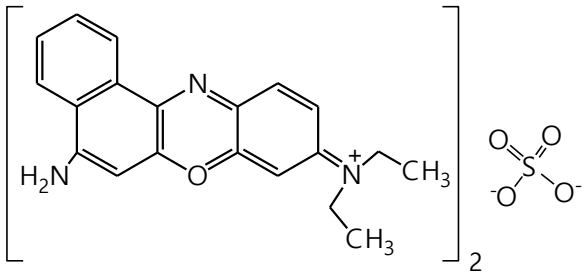
عند 703 نانوميتر [10]. كما وصفت طريقة طيفية وتفلورية في التقدير غير المباشر للعقار باستعمال نظام التفاعل كلورامين–T وصبغة الرودامين B [11]. وطبقت تقنيات البريق الكيميائي–الحقن الجرياني [12]، والفولتامتري [13]، والاستخلاص بالطور الصلب [14]، وHPLC ذو الطور العكوس المقترن بمكشاف UV لتحليل الميزالازين في المستحضرات الصيدلانية والنماذج الحيوية [16,15].

نشرت طرائق طيفية حساسة لتقدير الكاربامازيبين في المستحضرات الصيدلانية وذلك من خلال مفاعلته مع كاشف 4,2–ثنائي نيتروفنيل هيدرازين بوجود بيريودات الصوديوم في وسط قاعدي [17]، أو اقترانه مع حامض السلفانيلك المؤزوت [18]، أو تفاعله مع النتريت في الوسط الحامضي لتكوين الناتج الملون نيتروزأمين [19]، وأمكن استعمال صبغة الفلورسين وصبغة هيدروكلوريد روزانيلين بوجود العامل المؤكسد برومات–بروميد في التقدير الطيفي غير المباشر للمركب الدوائي [20]، وقُدر تفلورياً من خلال تفاعله مع الكاشف NBD-Cl لإعطاء ناتج متفلور [21]. كما حلل العقار في عينات مختلفة بتطبيق تقنيات الفولتامتري [22]، وHPLC ذو الطور العكوس المقترن بكشاف UV [24,23].

قُدرت كميات مايكروغرامية من الدايكلوفيناك صوديوم طيفياً في مستحضراته الصيدلانية اعتماداً على استعمال نظامي الاقتران التأكسدي Ce(IV)-MBTH [25]، و4,2–ثنائي نيتروفنيل هيدرازين–يودات البوتاسيوم [26]، أو مفاعلته مع كاشف 2,1–نفثوكوينون–4–سلفونات في وسط قاعدي [27]، أو تكوين معقد أخضر مع أيون النحاس (II) يستخلص الى طبقة الكلوروفورم [28]، وتم تطبيق الفصل الطيفي في منطقة UV لتحليل الدايكلوفيناك في عينات مختلفة باستعمال المشتقة الثانية وطريقة أقل المربعات الصغرى الانحداري والمشتقة الأولى لطيف UV [29]، ونجحت تقنية فولتامتري الموجة المربعة [30]، والفولتامتري الحلقي وفولتامتري النبضي المشتق [31]، وكروماتوغرافيا الغاز المقترنة بطيف الكتلة [32]، وتقنية HPLC في تحليل المركب الدوائي في العينات الحيوية والمستحضرات الصيدلانية [34,33].

صبغة النيل الأزرق Nile blue

صبغة النيل الأزرق أو زُرقة النيل تصنف من صبغات الفينوكسازين [35]. وتعد صبغة قاعدية [36]، وتستعمل في المجال البيولوجي لتلوين (تبقيع Staining) أجزاء الخلايا لتمييزها وتسهيل كشفها تحت المجهر، ورغم أنها لا تذوب بالدهون إلا أنها ترتبط مع الاحماض الدهنية، وتكمن فائدة هذه الصبغة في أنه يمكن بواسطتها التمييز بين الاحماض الدهنية الحرة والدهون المتعادلة [37]. تمتلك صبغة النيل الأزرق التركيب الكيميائي الآتي [35]:



Nile blue dye ($C_{40}H_{40}N_6O_6S$)
[9-(diethylamino)benzo[a]phenoxazin-5-ylidene]azanium sulfate
(Molar mass = 732.85 g/mol)

صبغة النيل الأزرق لها استعمالات أخرى متعددة في المجال البيولوجي، فقد استعملت كمجسات تفلورية للتبقيع والكشف عن القطرات الدهنية في ألياف العضلات الهيكلية الطبيعية والمريضة [38]، وللتبقيع التفلوري الانتقائي لمركب البولي–بيتا–هيدروكسي بيوتارات وتمييزها عن الكلايكوجين والبولي فوسفات [39]. لصبغة النيل الأزرق تطبيقات تحليلية متعددة، فقد استعمل بوليمر الصبغة مع أنابيب الكربون النانوية على سطح قطب الكربون الزجاجي في تقدير حامض الأسكوربيك بتقنية الأمبيرومتري الحلقي وأمبيرومتري الجهد الثابت [40]، وتقدير الباراسيتامول والترامادول والكافيين بتقنية الفولتامتري الحلقي [41]، وتشخيص مثبطات انزيم دوبا ديكاربوكسيليز وكاربيدوبا وبنزرآزايد بتقنية الفولتامتري الحلقي والنبضي المشتق [42]. واستعملت رغوة البولي يوريثان المطعمة بصبغة النيل الأزرق في فصل وتقدير الحديد والزنك والكادميوم والزئبق من مياه التصريف [43]. كذلك استخدمت الصبغة بوصفها دليلاً في التحليل الحجمي لتقدير دواء ديازيبام بشكله النقي وفي المستحضرات الدوائية بالتسحيح مع حامض البيركلوريك في الوسط اللامائي [44].

أمكن تقدير عقار أولانزابين طيفياً بتفاعله مع زيادة من اليودات بالوسط الحامضي ثم تقدير اليود المتحرر بتفاعله مع كمية ثابتة من صبغة النيل الأزرق عند طول موجي 400 نانوميتر [45]. وتم تقدير الألبومين في مصل الدم البقري من خلال تحسينه لتفلور صبغة النيل الأزرق عند طول موجي 670 نانوميتر [46].

الجزء العملي

الأجهزة المستعملة

تمت قياسات الامتصاص ورسم أطياف الامتصاص باستعمال المطياف الفوتومتري المزدوج الحزمة نوع PG T92+ UV-Visible Spectrophotometer، واستعملت خلايا مصنوعة من الكوارتز ذات سمك 1 سم. وتمت عمليات الوزن باستعمال ميزان حساس نوع AND GR-200. أجريت عمليات التسخين باستعمال حمام مائي نوع Lab. Companion BS-11. واستعمل جهاز Ultrasonic Cleaner للرج بالموجات فوق الصوتية نوع POWER SONIC 405. أما الدالة الحامضية للمحاليل فقد تم قياسها باستعمال جهاز قياس الدالة الحامضية OAKTON pH2100 مرتبط بقطب نوع CE 10-12.

الكواشف والمواد الكيميائية المستخدمة

محاليل المواد المستعملة

- محلولا الميزالازين والديكلوفيناك صوديوم تم تحضيرهما بتركيز 100 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.0100 غرام من كل مركب الدوائي بصيغته النقية في 5 مللتر من الايثانول المطلق وأكمل الحجم بالماء المقطر الى العلامة في قنينة حجمية سعة 100 مللتر، ومنه يحضر بالتخفيف محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر.
- محلول الكاربامازيبين حضر بتركيز 100 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.0100 غرام من المركب الدوائي بصيغته النقية في 100 مللتر من الماء المقطر مع التسخين في حمام مائي لزيادة الذوبانية، ومنه يحضر محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر.
- محلول حامض الهيدروكلوريك حُضر بتركيز 2 مولاري بتخفيف 50 مللتر من الحامض المركز (10 مولاري) الى 250 مللتر من الماء المقطر.

- محلول كلورامين–T حُضر بتركيز 250 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.0250 غرام من مركب الكلورامين–T في 100 مللتر من الماء المقطر، يحفظ في الثلاجة، ويبقى مستقراً لمدة أسبوع واحد.
- محلول N–بروموسكسينميد (NBS) حضر بتركيز 100 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.0100 غرام من المركب في 100 مللتر من الماء المقطر، ويبقى مستقراً لمدة أسبوع واحد في الثلاجة.
- محلول برومات–بروميد، حُضر محلول أولي بتركيز 0.002 مولاري من برومات البوتاسيوم مع 0.02 مولاري من بروميد البوتاسيوم بإذابة 0.0334 غرام من برومات البوتاسيوم و0.2380 غرام من بروميد البوتاسيوم في 100 مللتر من الماء المقطر ليكون التركيز 334 مايكروغرام/ مللتر، ومنه يحضر محلول بتركيز 25 مايكروغرام/ مللتر، ويبقى مستقراً لمدة أسبوع واحد.
- محلول صبغة النيل الأزرق تم تحضيره بتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.0100 غرام من الصبغة في 200 مللتر من الإيثانول المطلق في قنينة حجمية تُرج في جهاز الرج فوق الصوتي لمدة 30 دقيقة، ويبقى مستقراً لمدة شهر.
- محاليل المتداخلات حُضرت بتركيز 1000 مايكروغرام/ مللتر بإذابة 0.1000 غرام منها في 100 مللتر من الماء المقطر.

طريقة العمل والمنحنيات القياسية

تضاف إلى مجموعة من قنانٍ حجمية سعة 10 مللتر حجوم متزايدة (مللترات) من محاليل المركبات الدوائية المدروسة بهيئتها النقية (بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر) لتغطية مديات التراكيز 0.1-2.2 و0.4-2.4 و0.6-2.8 مايكروغرام/ مللتر لكل من الميزالازين والكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم على التوالي، يضاف إليها 1 مللتر من حامض الهيدروكلوريك (بتركيز 2 مولاري) يليه إضافة 1.4 مللتر من N–بروموسكسينميد (100 مايكروغرام/ مللتر) لتقدير الميزلازين، و1.4 مللتر من محلول برومات–بروميد (25 مايكروغرام/ مللتر) لتقدير الكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم، يرج خليط التفاعل ويترك 10 دقائق، ثم يضاف 2 مللتر من محلول صبغة النيل الأزرق (50 مايكروغرام/ مللتر)، وأكمل الحجم إلى حد العلامة بالماء المقطر، وقيست امتصاصات المحاليل عند 640 نانوميتر مقابل محاليلها الصورية في درجة حرارة الغرفة بعد 5 دقائق.

تحليل أقراص ميزاكول وبنتاسا

وزنت بدقة 10 أقراص من الأنموذجين الدوائيين (Mesacol (400 mg mesalazine من انتاج شركة UNIPHARMA-Syria، و (Pentasa (500 mg mesalazine من شركة FERRING-Turkey، ثم طحنت ومزجت جيداً، وتم وزن من المسحوق ما يكافئ قرصاً واحداً (400 أو 500 ملغرام من الميزالازين) واذيب في كمية من الايثانول المطلق (5 مللتر) وأكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر، ثم رُشح المحلول (تركيزه 4000 أو 5000 مايكروغرام/ مللتر) وحُضر منه محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر وأخذت من المحلول كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة للمحاليل القياسية، وتم إيجاد تركيز كل قرص من المنحني القياسي للميزالازين بصيغته النقية.

تحليل الحقنة الشرجية بنتاسا

أفرغ محتوى الحقنة الشرجية Pentasa enema (1g mesalazine) من شركة FERRING-Czech في قنينة حجمية سعة 1000 مللتر وتم غسل العبوة وافراغها في القنينة، وأكمل الحجم الى 1000 مللتر،

ووضعت القنينة في جهاز الرج بالموجات فوق الصوتية لمدة خمس دقائق لغرض تجانس المحلول، ثم رُشح المحلول، وبذلك تم الحصول على محلول بتركيز 1000 مايكروغرام/ مللتر، وحُضر منه محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر وأخذت من المحلول كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل المقترحة. وتم إيجاد تركيز الميزالازين في الحقنة من المنحني القياسي للميزالازين بصيغته النقية.

تحليل أقراص الكاربامازيبين

وزنت بدقة 10 أقراص من كل مستحضر الدوائي (Tegretol 200 mg, NOVARTIS-Egypt و Carbatol 200 mg, Dar Al Dawa-Jordan و Carbamazepine 200 mg ARISTO-Germany)، ثم طحنت ومزجت جيداً، ووزن ما يكافئ قرصاً واحداً من المسحوق (200 ملغرام) واذيب في بيكر مع القليل من الماء المقطر والتسخين في حمام مائي، وترك المحلول ليبرد، ثم نُقل الى قنينة حجمية سعة 100 مللتر، وأكمل الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر، ثم رُشح المحلول (2000 مايكروغرام/ مللتر) وحُضر منه محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر لكل مستحضر وأخذت منه كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة. وتم إيجاد تركيز الكاربامازيبين في قرص كل مستحضر دوائي من المنحني القياسي للكاربامازيبين بصيغته النقية.

تحليل أقراص الدايكلوفيناك صوديوم

وزنت بدقة 10 أقراص من كل مستحضر دوائي (Divon SR 100 mg, MICRO LABS-India و Diclofenac SR 100 mg, Awamedica-Iraq و Refen retard 100 mg, Hemofarm-Serbia)، ثم طحنت ومزجت جيداً، ووزن من المسحوق ما يكافئ قرصاً واحداً (100 ملغرام) واذيب في كمية من الايثانول المطلق (5 مللتر) وأكمل الحجم الى 100 مللتر بالماء المقطر، ثم رُشح المحلول (1000 مايكروغرام/ مللتر) وحُضر منه محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر لكل مستحضر، وأخذت منه كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل الموصوفة. وتم إيجاد تركيز الدايكلوفيناك صوديوم في قرص كل مستحضر دوائي من المنحني القياسي للدايكلوفيناك بصيغته النقية.

تحليل حقنة الدايكلوفيناك صوديوم

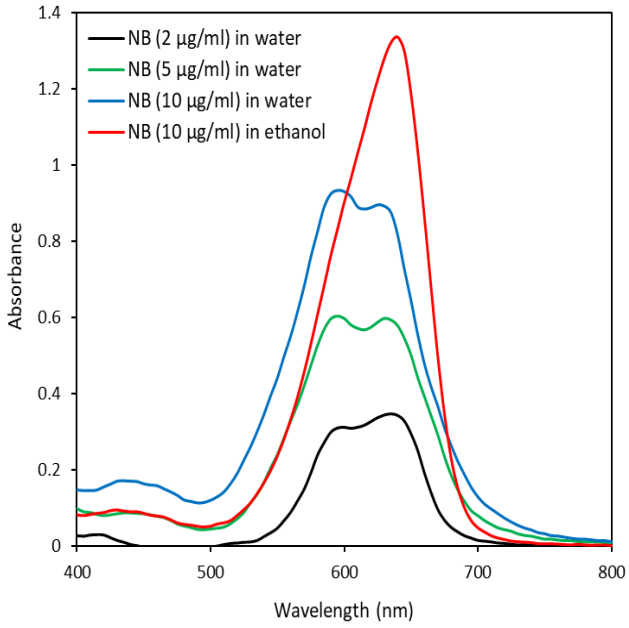
مزج محتوى ثلاث حقن (Diclobrawn ampule 75 mg/ 3 ml, BRAWN-India)، وخفف 2 مللتر من المزيج إلى 100 مللتر بالماء المقطر للحصول على محلول بتركيز 500 مايكروغرام/ مللتر. ثم حضر منه محلول بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر، وأخذت منه كميات مايكروغرامية من المركب الدوائي وعوملت على وفق طريقة العمل المقترحة. وتم إيجاد تركيز الدايكلوفيناك صوديوم في الحقنة من المنحني القياسي للدايكلوفيناك بصيغته النقية.

النتائج والمناقشة

الدراسة التمهيدية وطيف امتصاص صبغة النيل الأزرق

وجد أن صبغة النيل الأزرق (NB) لها ذوبانية جيدة في الماء وتعطي قمتي امتصاص عند 595 و635 نانوميتر، وأن قيمة أقصى إمتصاص للصبغة تتبدل من 635 إلى 595 نانوميتر مع زيادة تركيز الصبغة، لكن

عند إذابة الصبغة بالإيثانول المطلق، فإن طيف الامتصاص يعطي قمة واحدة عند طول موجي 640 نانوميتر مع زيادة في الامتصاص (شكل 1)، لذلك أعتمد الإيثانول كمذيب للصبغة في هذه الدراسة.



شكل 1: أطياف امتصاص صبغة النيل الأزرق مذابة بالماء المقطر أو بالإيثانول مقابل المحاليل الصورية

تم الاستدلال تجريبياً حدوث أكسدة كمية لصبغة NB بوساطة كميات مايكروغرامية من محاليل العوامل المؤكسدة المتمثلة بكلورامين–T وN–بروموسكسينميد وبرومات–بروميد في وسط حامض الهيدروكلوريك إذ انخفضت الامتصاصية للصبغة بزيادة تركيز العامل المؤكسد وذلك من خلال قصر لونها. كما تبين عملياً أن إضافة كميات مايكروغرامية متزايدة من الأدوية قيد الدراسة في قنان حجمية سعة 10 مللتر واضافة كميات محسوبة من العوامل المؤكسدة (N–بروموسكسينميد أو برومات–بروميد) التي تقصر الصبغة في وسط حامض الهيدروكلوريك أدى إلى حدوث زيادة خطية في امتصاص الصبغة عند الطول الموجي 640 نانوميتر مع زيادة تركيز المركب الدوائي، أي أن تركيز العامل المؤكسد المتبقي من أكسدة الدواء يقل بزيادة تركيز الدواء مما يؤدي إلى تناقص في قصر لون الصبغة فيزداد الامتصاص، مما يعطي إمكانية تطبيق هذه الطريقة في التقدير الطيفي غير المباشر للمركبات الدوائية قيد الدراسة، سواء بهيئتها النقية في المحلول المائي أو بتطبيقها على المستحضرات الصيدلانية.

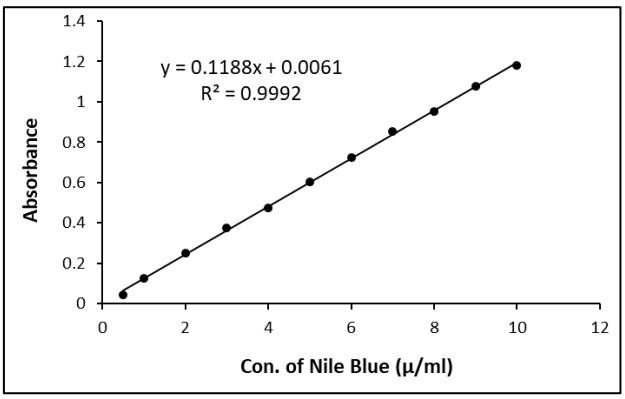
ضبط الظروف المثلى لتقدير المركبات الدوائية

أجريت التجارب التالية في قنانٍ حجمية سعة 10 مللتر بوجود 1.6 مايكروغرام/ مللتر لكل من الميزالازين والكاربامازيبين و1.8 مايكروغرام/ مللتر من الدايكلوفيناك صوديوم وقياس إمتصاص صبغة النيل الازرق عند الطول الموجي 640 نانوميتر مقابل المحلول الصوري.

دراسة كمية صبغة النيل الأزرق

لإيجاد أكبر كمية من صبغة النيل الأزرق التي يمكن استعمالها في تقدير المركبات الدوائية والتي تتبع قانون بير، تمت إضافة حجوم متزايدة (0.1-2.0 مللتر) من محلول صبغة NB بتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر إلى قنانٍ حجمية سعة 10 مللتر تحتوي على 1 مللتر من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1 مولاري وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى حد العلامة، وقيست الامتصاصية عند الطول الموجي 640 نانوميتر، وبينت الدراسة أن التراكيز التي تخضع لقانون بير تقع ضمن المدى 0.5-10 مايكروغرام/ مللتر. وبناءً عليه فإن أعلى كمية من

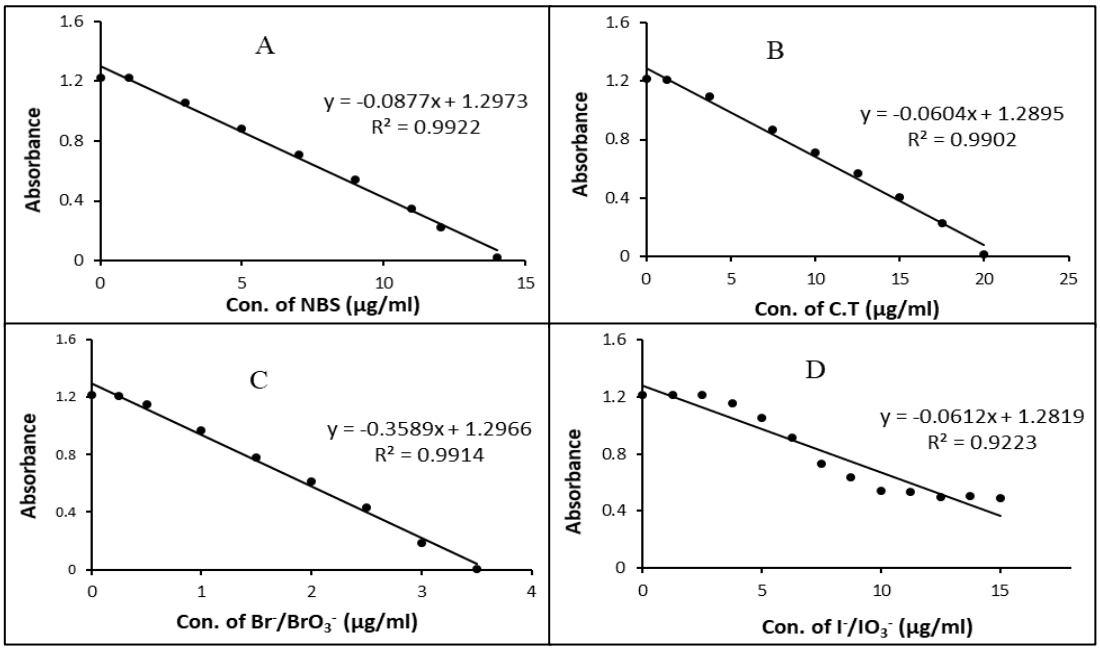
الصبغة يمكن استعمالها في التقدير هي 10 مايكروغرام/ مللتر (2.0 مللتر من 50 مايكروغرام/ مللتر) لذا اعتمدت في الدراسات اللاحقة (الشكل 2).



شكل 2: المنحنى القياسي لصبغة النيل الأزرق

تأثير كمية العامل المؤكسد في قصر لون صبغة النيل الأزرق

لغرض تحديد الكمية المثلى من العوامل المؤكسدة التي تؤدي الى قصر لون صبغة النيل الأزرق بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر وذلك بمفاعلتها مع كميات مايكروغرامية من محاليل N–بروموسكسينميد (100 مايكروغرام/ مللتر) وكلورامين–T (250 مايكروغرام/ مللتر) وبرومات–بروميد (25 مايكروغرام/ مللتر) ويودات–يوديد (50 مايكروغرام/ مللتر) في وسط حامض الهيدروكلوريك وقياس الامتصاص بعد 5 دقائق من التخفيف إلى حد العلامة بالماء المقطر، ويتضح من المنحنيات القياسية في الشكل 3 (C,B,A) أن الكميات المثلى التي تطيع قانون بير واللازمة لقصر لون صبغة النيل الأزرق لكل من محاليل N–بروموسكسينميد وكلورامين–T وبرومات–بروميد كانت 14 و20 و3.5 مايكروغرام/ مللتر على التوالي وعليه اعتمدت في الدراسات اللاحقة, في حين لم يظهر محلول اليودات–يوديد علاقة خطية لقصر لون الصبغة لذلك تم استبعاده (الشكل 3,D).



شكل 3: المنحنيات القياسية للعوامل المؤكسدة لقصر 10 مايكروغرام/ مللتر من الصبغة

A: N–بروموسكسينميد، B: كلورامين–T، C: برومات–بروميد، D: يودات–يوديد

اختيار العامل المؤكسد

تم اختبار العوامل المؤكسدة بكمياتها المحسوبة على محاليل المركبات الدوائية المدروسة والمتمثلة بـ N–برموسكسينميد وكلورامين–T وبرومات–بروميد على كميات مايكروغرامية متزايدة من المركبات الدوائية المدروسة في وسط حامض الهيدروكلوريك. واعتماداً على القيم الإحصائية المستحصل عليها من الجدول 1 فإن N–برموسكسينميد كان الأفضل في تقدير الميزالازين، وبرومات–بروميد الأمثل في تقدير الكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم، وعليه اعتمدا في التجارب اللاحقة.

جدول 1: اختيار العامل المؤكسد في تقدير المركبات الدوائية المدروسة

Drug	parameter	Oxidizing agent (µg/ml)		
		N-bromo-succinimide (14 µg/ml)	Bromate-bromide (3.5 µg/ml)	Chloramine-T (20 µg/ml)
Mesalazine	Linearity range (µg/ml)	0.1-2.0	0.25-1.05	0.6-1.8
	ε_{max} ($1.mol^{-1}.\ cm^{-1}$)	5.77×10^4	5.61×10^4	5.7×10^4
	R^2	0.999	0.9963	0.9899
Carbamazepine	Linearity range (µg/ml)	0.4-1.8	0.6-2.4	0.4-1.6
	ε_{max} ($1.mol^{-1}.\ cm^{-1}$)	9.86×10^4	1.03×10^5	$8.95x10^4$
	R^2	0.9974	0.9984	0.9927
Diclofenac sodium	Linearity range (µg/ml)	0.4-1.8	0.6-2.8	0.5-2
	ε_{max} ($1.mol^{-1}.\ cm^{-1}$)	1.15×10^5	1.16×10^5	1.15×10^5
	R^2	0.9971	0.9971	0.9979

اختيار الحامض المناسب

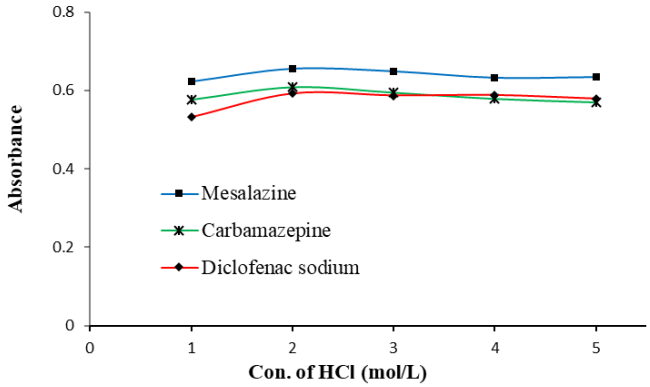
تمت دراسة تأثير حوامض مختلفة، ويشير الجدول 2 أن حامض الهيدروكلوريك الأفضل ولذلك استعمل في التجارب اللاحقة.

جدول 2: اختيار الحامض المناسب بوصفه وسطاً في تقدير المركبات الدوائية المدروسة

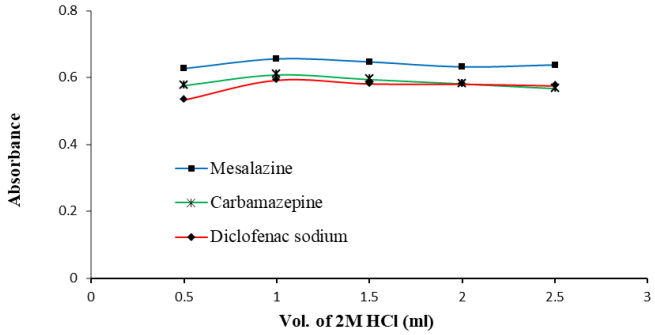
1 ml of 1M Acid	Absorbance/ Drug used		
	Mesalazine	Carbamazepine	Diclofenac sodium
HCl	0.622	0.576	0.533
H_2SO_4	0.437	0.529	0.452
HNO_3	0.442	0.521	0.494
H_3PO_4	0.378	0.356	0.403
CH_3COOH	0.413	0.433	0.386

تأثير كمية حامض الهيدروكلوريك

أجريت دراسة لتثبيت تركيز حامض الهيدروكلوريك المناسب بإضافة 1 مللتر من الحامض ضمن مدى التراكيز 1-5 مولاري، إذ أظهرت النتائج في الشكل 4 أن 2 مولاري هو الأنسب في التقدير. وتمت دراسة تأثير حجوم متزايدة (0.5-2.5 مللتر) من محلول حامض الهيدروكلوريك (2 مولاري) ووجد من النتائج الموضحة في الشكل 5 أن الحجم 1 مللتر الأمثل لتقدير المركبات الدوائية.



شكل 4: تركيز حامض الهيدروكلوريك المناسب بوجود 1.6 مايكروغرام/ مللتر لكل من الميزالازين والكاربامازيبين و1.8 مايكروغرام/ مللتر من الدايكلوفيناك صوديوم



شكل 5: حجم حامض الهيدروكلوريك المناسب لتقدير 1.6 مايكروغرام/ مللتر لكل من الميزالازين والكاربامازيبين و1.8 مايكروغرام/ مللتر من الدايكلوفيناك صوديوم

تأثير الزمن في أكسدة المركبات الدوائية

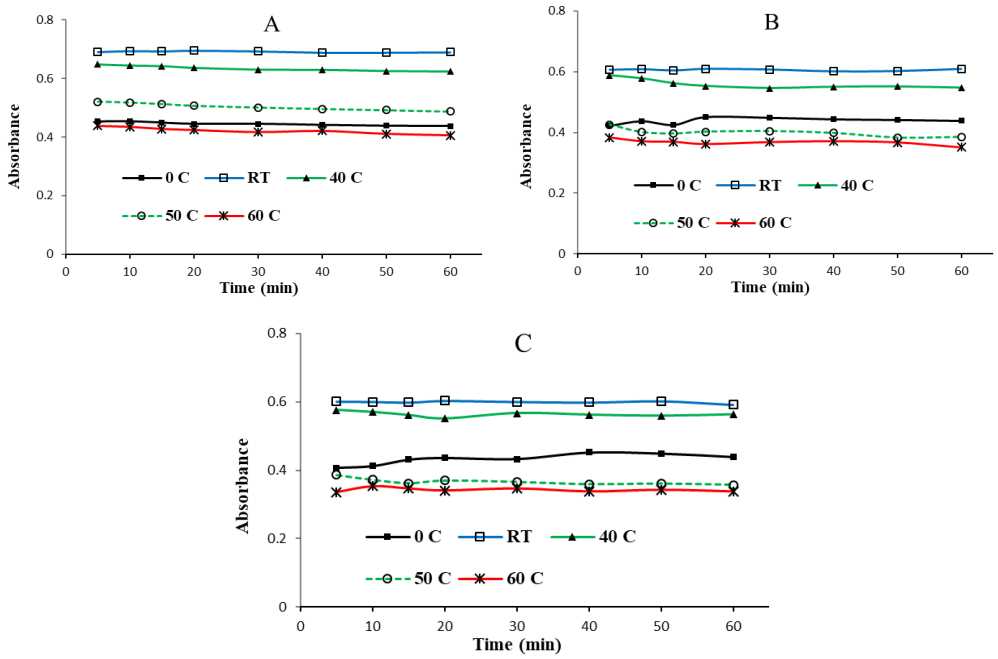
حُدد في هذه الدراسة الزمن اللازم لأكسدة المركبات الدوائية والصبغة عند درجات حرارة الغرفة، إذ يبين الجدول 3 أن 10 دقائق فترة زمنية كافية لأكسدة الميزالازين بوصفه أنموذجاً، و5 دقائق لأكسدة صبغة النيل الأزرق، وهذه الأزمنة مناسبة لأكسدة وتقدير الكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم.

جدول 3: تأثير الزمن في أكسدة الميزالازين (1.6 مايكروغرام/ مللتر) بوصفه أنموذجاً

Standing time before adding NB	Absorbance/ Standing time after adding NB & dilution (min)											
	5	10	15	20	30	40	50	60	90	120	240	Over night
After addition	0.644	0.649	0.652	0.644	0.643	0.641	0.637	0.632	0.631	0.633	0.631	-
5	0.663	0.662	0.660	0.658	0.661	0.656	0.652	0.655	0.653	0.652	0.654	-
10	0.689	0.688	0.686	0.682	0.683	0.680	0.677	0.672	0.679	0.677	0.671	0.673
15	0.685	0.687	0.685	0.687	0.683	0.679	0.682	0.680	0.682	0.673	0.667	-
20	0.688	0.685	0.684	0.687	0.685	0.683	0.685	0.684	0.683	0.682	0.684	-

تأثير درجة الحرارة في تفاعل الاكسدة واستقرارية صبغة النيل الأزرق

دُرس تأثير درجات حرارية مختلفة (0-60 ^{o}م) في تفاعل أكسدة المركبات الدوائية بفترة زمنية مقدارها 10 دقائق، ومن ثم في استقرارية الصبغة بقياسها عند 640 نانوميتر بعد 5 دقائق من التخفيف إلى حد العلامة (بعد 15 دقيقة من بدء التفاعل) وتحت الظروف المثلى المثبتة من التجارب السابقة، إذ يُلاحظ أن درجة حرارة الغرفة هي المثلى في تقدير المركبات الدوائية (شكل 6)، إذ تم الحصول على أقصى امتصاص للصبغة بعد 15 دقيقة من بدء التفاعل وبزمن استقرار لا يقل عن 24 ساعة وهي ذات النتائج المستحصلة للكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم.



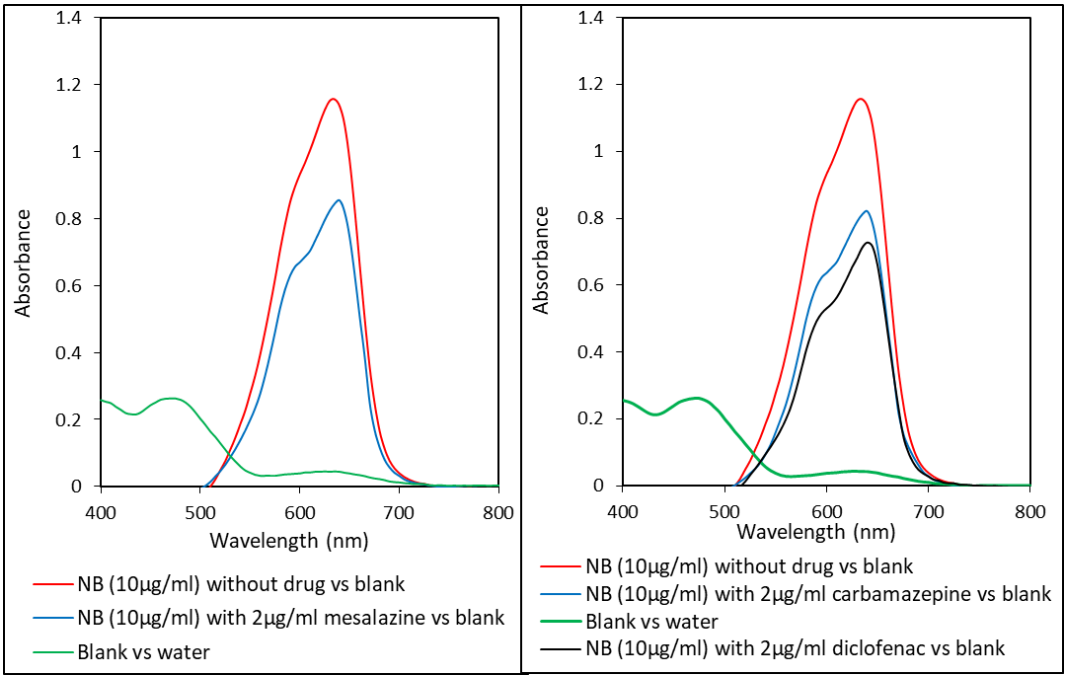
شكل 6: تأثير درجة الحرارة في استقرارية صبغة النيل الأزرق لتقدير المركبات الدوائية (RT=23±2 ^{o}C)

تأثير تسلسل الإضافة

تم اعتماد التسلسل المتبع في تثبيت الظروف المثلى لتقدير المركبات الدوائية وحسب التسلسل: المركب الدوائي (S)+الوسط الحامضي (A)+العامل المؤكسد (O)+ صبغة النيل الأزرق (NB)، وتبين عملياً أن حدوث أي تغيير في ترتيب الإضافة يؤثر سلباً على عملية التقدير.

طيف الامتصاص النهائي

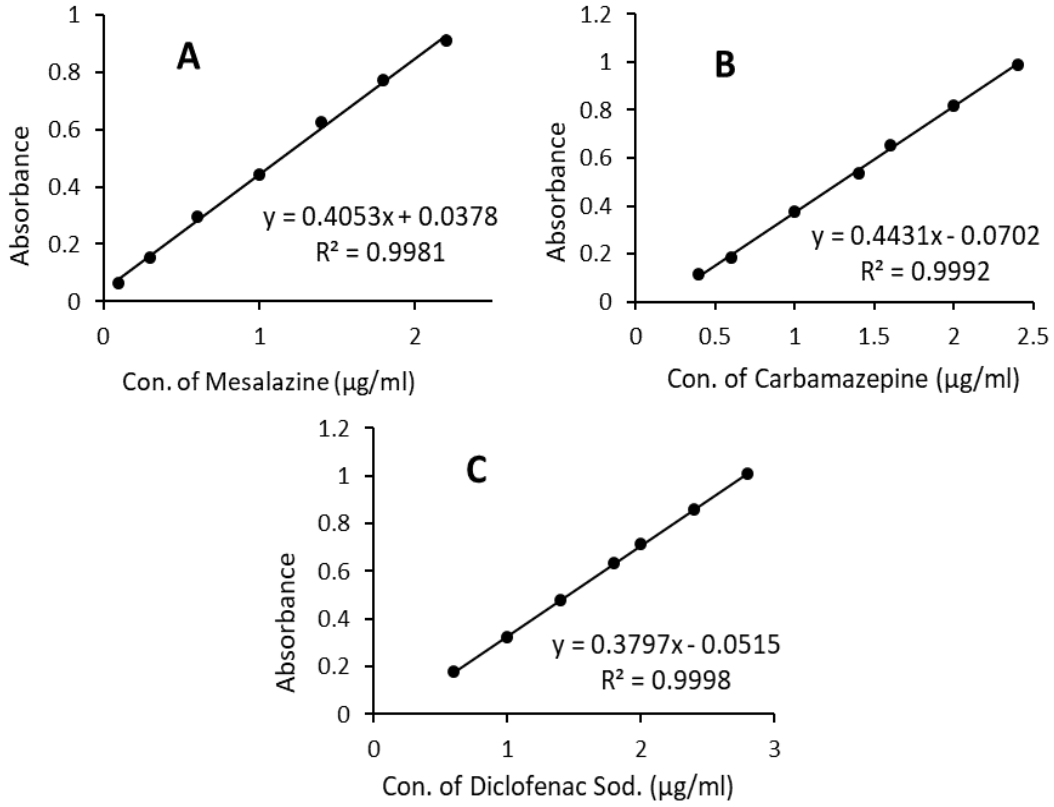
رُسمت اطياف الامتصاص النهائية لتقدير الأدوية قيد الدراسة بعد تثبيت الظروف المثلى للتفاعل وذلك بإضافة الكميات المثلى من محاليل العوامل المؤكسدة والحامض وصبغة النيل الأزرق في قناني حجمية 10 مللتر وقياس الامتصاصات عند 640 نانوميتر (الشكل 7).



شكل 7: أطياف الامتصاص لمحلول صبغة النيل الأزرق بدون وبوجود الأدوية المقدرة في وسط التفاعل

القيم الاحصائية وحساسية الطريقة المقترحة

من خلال رسم المنحنيات القياسية لتقدير المركبات الدوائية (شكل 8) تم الحصول على القيم التحليلية والاحصائية وكما موضح في الجدول 4 والذي يبين القيم التحليلية المستحصلة من المنحني القياسي والامتصاصية المولارية ودلالة ساندل، فضلاً عن قيم حدود الكشف والتقدير الكمي التي حسبت بأخذ مكررات للبلانك وقياس الامتصاص مقابل الماء المقطر وتطبيق المعادلة $LOD=3\sigma_B/S$ والمعادلة $LOD=10\sigma_B/S$، إذ أن σ الانحراف القياسي لامتصاص المحلول الصوري وS ميل المنحني القياسي [47].



شكل 8: المنحنيات القياسية لتقدير المركبات الدوائية

A: ميزالازين، B: كاربامازيبين، C: دايكلوفيناك صوديوم

جدول 4: القيم التحليلية الاحصائية للمنحنيات القياسية والامتصاصية المولارية وحدود الكشف والتقدير الكمي في تقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة

Parameter	Mesalazine	Carbamazepine	Diclofenac sodium
Linearity range (µg/ml)	0.1-2.2	0.4-2.4	0.6-2.8
Molar Absorptivity ($l.mol^{-1}.cm^{-1}$)	6.205×10^4	1.047×10^5	1.207×10^5
Slope	0.4053	0.4431	0.3797
Intercept	0.0378	-0.0702	-0.0515
R^2	0.9981	0.9992	0.9998
Standard deviation of slope	0.0078	0.0058	0.0022
Standard deviation of intercept	0.01	0.0087	0.0042
LOD* (µg/ml)	0.052	0.039	0.039
LOQ* (µg/ml)	0.175	0.128	0.128
Sandell's sensitivity ($\mu g/cm^2$)	0.00247	0.00226	0.00263

*Average of ten determinations of blank vs water.

دقة الطريقة وتوافقها

اختبرت دقة الطريقة وتوافقها بحساب نسب الاسترجاع والانحراف القياسي النسبي لأربعة تراكيز مختلفة لكل مركب دوائي ودونت النتائج في الجدول 5 التي تشير إلى دقة الطريقة وتوافقها.

جدول 5: دقة الطريقة وتوافقها لتقدير المركبات الدوائية

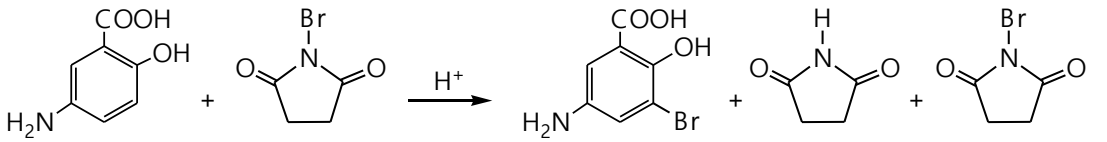
Drug	Amount taken (µg/ml)	Recovery* (%)	Average recovery (%)	RSD (%)
Mesalazine	0.4	100.05	99.57	2.92
	1	98.91		1.27
	1.4	101.05		1.04
	2	98.26		2.14
Carbamazepine	1	102.13	101.07	3.33
	1.4	100.25		1.58
	1.8	99.33		1.16
	2.2	102.59		0.91
Diclofenac sodium	1	98.15	99.70	1.52
	1.4	100.24		1.37
	1.8	101.57		3.19
	2.2	98.86		1.94

*Average of six determinations.

التفاعل الكيميائي المقترح

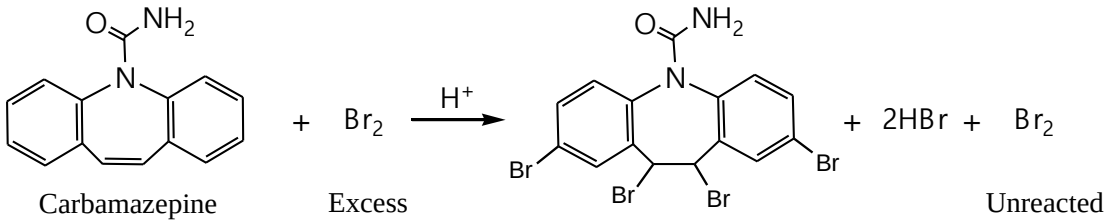
من متابعة الأدبيات والبحوث الحركية وميكانيكية التفاعلات نلاحظ أن المركب N–بروموسكسينميد يعد عاملاً مؤكسداً وعامل برومة في الوسط الحامضي للمركبات العضوية الأليفاتية والأروماتية [48]. لذا افترض التفاعل الكيميائي (مخطط 1) بين الميزالازين والكمية المحسوبة من N–بروموسكسينميد.

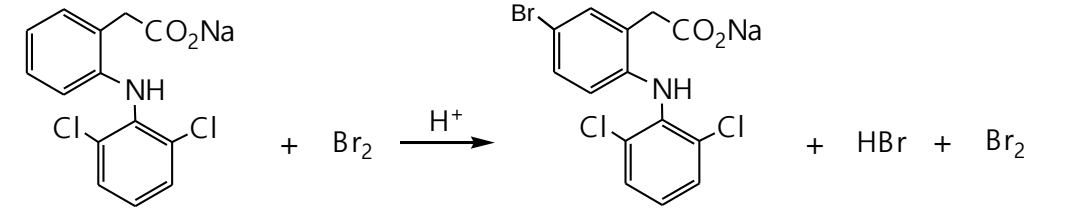
أما عند تقدير الكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم فقد استعمل البرومات–البروميد كعامل مؤكسد الذي يحرر البروم بالوسط الحامضي بما يكافئ تركيز برومات البوتاسيوم [49] والذي يقوم بدوره بأكسدة المركبين الدوائيين من خلال عملية برومة للأنظمة الأروماتية لهما (مخطط 2)، ليتبعها تقدير الكمية المتبقية من العامل المؤكسد N–بروموسكسينميد أو برومات–بروميد من خلال أكسدة كمية ثابتة من صبغة NB وقصر لونها وقياس المتبقي من الصبغة عند 640 نانوميتر (مخطط 3).



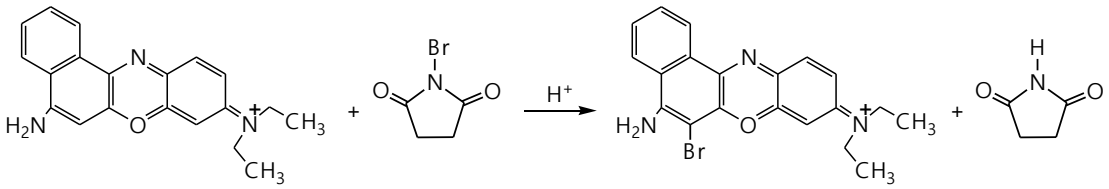
مخطط 1: أكسدة الميزالازين بـ NBS

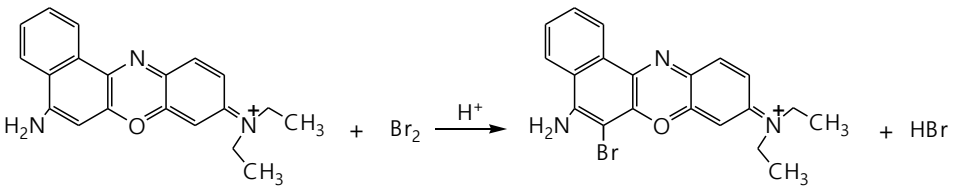
$$BrO_3^- + 5Br^- + 6H^+ \longrightarrow Br_2 + 3H_2O$$





مخطط 2: أكسدة الكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم بالبرومات–بروميد





مخطط 3: أكسدة صبغة NB بالعاملين المؤكسدين NBS وبرومات–بروميد

تأثير المتداخلات

دُرس تأثير وجود بعض المضافات الدوائية التي تضاف على المستحضرات الدوائية إلى وسط التقدير للميزالازين (16 مايكروغرام/ 10 مللتر) تحت الظروف المثلى للتقدير، وتبين من النتائج المستحصل عليها في الجدول 6 عدم حدوث تداخل ملحوظ يمكن أن تحدثه هذه المواد مما يشير إلى انتقائية الطريقة وملائمة تطبيقها على المستحضرات الصيدلانية للمركبات الدوائية المدروسة.

جدول 6: تأثير المتداخلات مع الميزالازين (1.6 مايكروغرام/ مللتر) بوصفه أنموذجاً

Foreign compound	Recovery (%) of 16 µg of Mesalazine per µg of foreign compound added				
	100	200	400	800	1000
Acacia	102.5	101.98	100.31	99.94	101.96
Fructose	101.05	100.38	100.15	102.83	101.73
Glucose	101.78	100.1	98.78	97.03	99.15
Lactose	101.83	100.03	99.75	98.45	102.5
Sucrose	100.1	102.5	98.75	100.23	99.21
Starch	100.69	100.4	102.21	101.98	103.42
Sodium chloride	101.22	99.25	100.02	98.65	100.4
Calcium carbonate	100.09	98.55	97.34	99.1	101.46

تطبيق الطريقة المقترحة في التقدير غير المباشر للمركبات الدوائية على المستحضرات الصيدلانية

طُبقت الطريقة المقترحة لتقدير المركبات الدوائية قيد الدراسة على مستحضراتها الصيدلانية ومن مناشئ مختلفة وتبين النتائج في الجدول 7 ان الطريقة المطورة ذات دقة عالية ومتفقة على نحو جيد مع المحتوى الأصيل لهذه الأدوية في المستحضرات الصيدلانية.

جدول 7: تقدير المركبات الدوائية في المستحضرات الصيدلانية بالطريقة المقترحة

Pharmaceutical preparation	Certified value	Amount taken (µg/ml)	Drug content found* (mg or g)	Recovery* (%)	Average recovery (%)
Mesalazine					
Mesacol tablets	400 mg	0.4	402.17	100.54	99.93
		1	399.31	99.83	
		1.4	403.65	100.91	
		2	393.68	98.42	
Pentasa tablets	500 mg	0.4	503.95	100.79	99.68
		1	493.46	98.69	
		1.4	498.22	99.64	
		2	497.90	99.58	
Pentasa enema	1 g	0.4	1.015 g	101.53	101.01
		1	1.021 g	102.10	
		1.4	0.991 g	99.12	
		2	1.013 g	101.31	
Carbamazepine					
Tegretol tablets	200 mg	1	199.76	99.88	99.15
		1.4	198.73	99.37	
		1.8	200.66	100.33	
		2.2	194.05	97.02	
Carbatol tablets	200 mg	1	201.78	100.89	99.76
		1.4	202.58	101.29	
		1.8	196.12	98.06	
		2.2	197.60	98.80	
Carbamazepine	200 mg	1	204.40	102.20	100.66

Pharmaceutical preparation	Certified value	Amount taken (µg/ml)	Drug content found* (mg or g)	Recovery* (%)	Average recovery (%)
tablets		1.4	204.56	102.28	
		1.8	197.66	98.83	
		2.2	198.65	99.33	
Diclofenac sodium					
Divon SR tablets	100 mg	1	99.20	99.20	99.91
		1.4	99.67	99.67	
		1.8	100.86	100.86	
		2.2	99.90	99.90	
Diclofenac SR tablets	100 mg	1	100.25	100.25	99.64
		1.4	98.48	98.48	
		1.8	99.91	99.91	
		2.2	99.92	99.92	
Refen retard tablets	100 mg	1	100.91	100.91	100.68
		1.4	99.83	99.83	
		1.8	100.98	100.98	
		2.2	101.00	101.00	
Diclobrawn ampule	75 mg	1	75.22	100.30	101.14
		1.4	74.80	99.73	
		1.8	76.80	102.40	
		2.2	76.59	102.11	

* Average of five determinations

تقييم نتائج الطريقة المقترحة

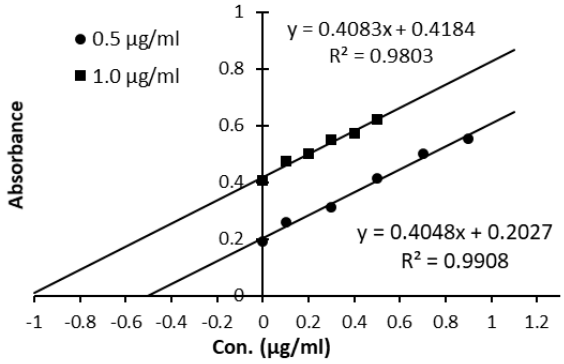
لإثبات كفاءة الطريقة المقترحة ونجاحها في تقدير المركبات الدوائية المدروسة والتأكد من خلوها من تداخلات المضافات في مستحضراتها الصيدلانية. فقد طبقت طريقة التسحيح المجهادي القياسية المعتمدة في دستور الأدوية البريطاني [3] على مستحضرات الأقراص للميزالازين والدايكلوفيناك صوديوم وأجريت مقارنة وتقييم إحصائي بين الطريقة الطيفية المقترحة لتقدير الدوائين أعلاه في مستحضرات الأقراص والطريقة القياسية باستعمال اختباري t و F عند مستوى ثقة 95% [47] وأدرجت النتائج في الجدول 8 والتي تشير الى أن قيمة t التجريبية اقل من قيمة t الجدولية البالغة 2.45 ولستة درجات حرية وهذا يؤكد أن الطريقة لا تختلف في المصداقية وصلاحية التطبيق على المستحضرات الصيدلانية. كما وجد أن قيمة F التجريبية اقل من قيمتها الجدولية 9.28 ولثلاث درجات حرية، لذا يمكن أن نحكم بأنه لا يوجد فرق واضح بين دقة الطريقتين وان الانحراف القياسي للطريقتين ناتج عن أخطاء عشوائية. وبهذا تكون الطريقة المقترحة ذات مصداقية جيدة.

جدول 8: مقارنة دقة الطريقة المقترحة لتقدير الميزالازين والدايكلوفيناك صوديوم في المستحضرات الصيدلانية مع الطريقة القياسية

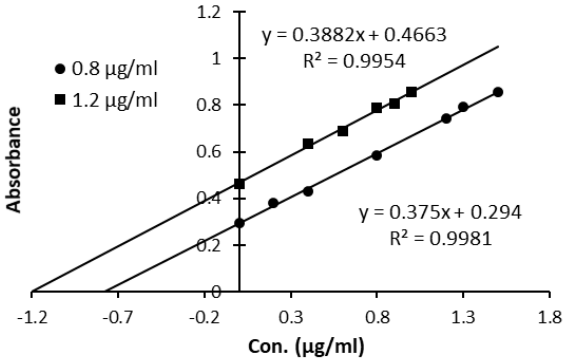
Drug	Pharmaceutical preparation	Recovery* (%)		t-test	F-test
		Present method	Standard method		
Mesalazine	Mesacol tablets	99.93	99.63	0.45	2.46
	Pentasa tablets	99.68	99.59	0.16	2.21
Diclofenac sodium	Divon SR tablets	99.91	98.93	2.07	0.83
	Diclofenac SR tablets	99.64	99.72	0.20	6.16
	Refen retard tablets	100.68	99.88	1.50	0.40

* Average of four determinations

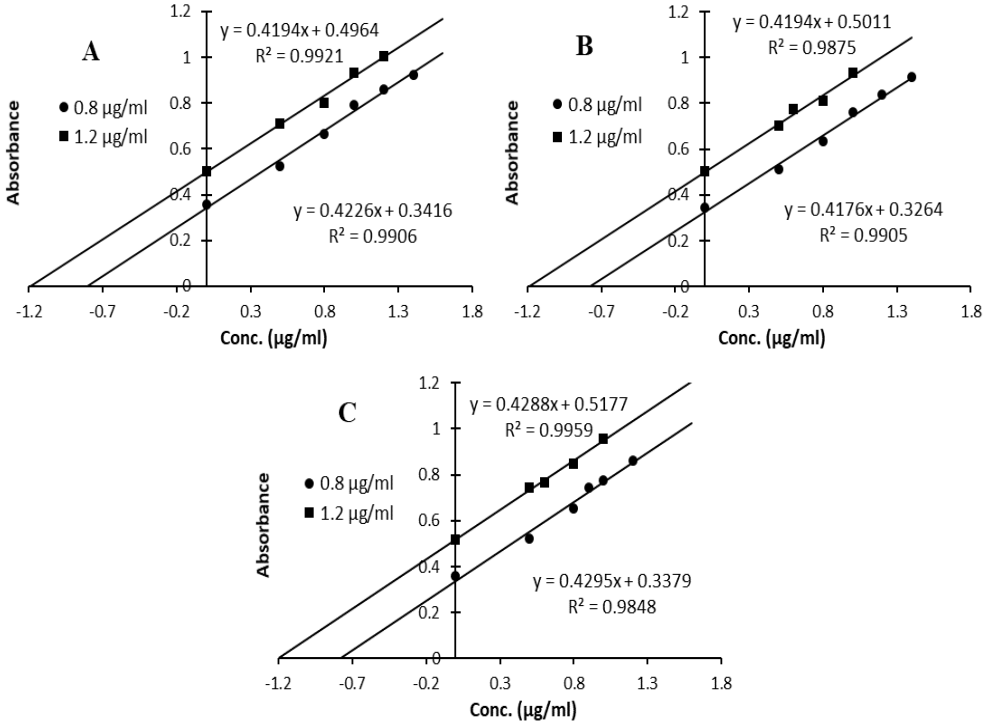
ولإثبات كفاءة الطريقة الطيفية المطورة ونجاحها في تقدير المركبات الدوائية المدروسة وخلوها من تداخلات المضافات في مستحضراتها الصيدلانية، ولعدم توفر متطلبات الطريقة القياسية لدستور الأدوية البريطاني، فقد تم تطبيق طريقة الاضافة القياسية بالطريقة المقترحة على المستحضرات الصيدلانية لمستحضر الحقنة الشرجية للميزالازين (الشكل 8)، ومستحضر الحقنة للدايكلوفيناك صوديوم (الشكل 9)، ومستحضرات الكاربامازيبين (الشكل 10)، وحسب النتائج لهذه للأشكال الثلاثة والمدونة في الجدول 9 يمكن القول أن طريقة الإضافة القياسية المطبقة متفقة على نحو جيد مع الطريقة المطورة ضمن المدى المقبول للخطأ وذلك يدل على أن الطريقة ذات انتقائية بشكلٍ مرضٍ.



شكل 8: منحنيات الإضافة القياسية لتقدير الميزالازين في مستحضر الحقنة الشرجية Pentasa



شكل 9: منحنيات الإضافة القياسية لتقدير الدايكلوفيناك صوديوم في مستحضر الحقنة Diclobrawn-India



شكل 10: منحنيات الإضافة القياسية لتقدير الكاربامازيبين في مستحضراته:
A: Tegretol-Egypt, B: Carbatol-Jordan, C: Carbamazepine-Germany

جدول 9: تقدير مستحضرات الكاربامازيبين وبعض مستحضرات الميزالازين والدايكلوفيناك صوديوم بطريقة الإضافة القياسية

Drug	Pharmaceutical prepration	Certified value	Amount present (µg/ml)	Drug content found (g or mg)	Recovery (%)
Mesalazine	Pentasa enema	1 g	0.5	1.0015 g	100.15
			1.0	1.025 g	102.50
Carbamazepine	Tegretol tablets	200 mg	0.8	202.08	101.04
			1.2	197.27	98.63
	Carbatol tablets	200 mg	0.8	195.40	97.70
			1.2	199.13	99.57
	Carbamazepine tablets	200 mg	0.8	196.68	98.34
			1.2	201.22	100.61
Diclofenac sodium	Diclobrawn ampule	75 mg/ml	0.8	73.52	98.03
			1.2	75.06	100.08

الاستنتاجات

تم اقتراح طريقة طيفية غير مباشرة باستعمال نظامي تفاعل N–بروموسكسينميد صبغة النيل الأزرق عند تقدير الميزالازين وبرومات–بروميد صبغة النيل الأزرق عند تقدير الكاربامازيبين والدايكلوفيناك صوديوم في وسط حامضي. إذ كانت الطريقة ذات انتقائية وحساسية عالية، كما تميزت بالبساطة كونها لا تحتاج الى تنظيم الدرجة الحرارية وخطوات الاستخلاص. وطبقت الطريقة بنجاح على المستحضرات الصيدلانية للمركبات المدروسة بدقة وتوافق جيدين، فضلاً عن كونها متفقة احصائياً مع الطرائق القياسية المعتمدة والاضافة القياسية.

المصادر

1. Cai Q., Zhu K., Chen D. and Gao L., Eur. J. Pharm. Biopharm., 55: 203-208 (2003).
2. Alfred G., Theodore W. and Alan S., "Goodman and gilman's, the pharmacological basis of therapeutics". 8th Ed. Pergamum Press. New York (1990), p. 311.
3. British Pharmacopoeia, CD-ROM. London, The Stationery Office Ltd., Norwich NR3 1GN (2013).
4. Whalen K., "Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology". 6th Ed. Wolters Kluwer. China (2015), p. 143, 450.
5. Ritter J.M., Lewis L.D., Mant T.G.K. and Ferro A., "A textbook of clinical pharmacology and therapeutics". 5th Ed. Hodder Arnold. London, Great Britain (2008), p. 422.
6. Salih E.S. and Al- Sharook M.M., J. Edu. Sci., 21: 103-115 (2008).
7. Al-Fakhry M.H.A., M.Sc. Thesis, College of Education for Pure Science, University of Mosul (2006). (In Arabic).
8. Al-Sabha T.N. and Al-Tae O.A., J. Edu. Sci., 21: 49-61 (2008).
9. Al-Enzy M.S., Al-Sabha T.N. and Al-Ghabsha T.S., Jordan J. Chem., 7: 87-102 (2012).
10. Al-Sabha T.N. and Habeeb N.N., Eur. Chem. Bull., 4(8): 384-388 (2015).
11. Al-Abdaly Z. Z., PhD.Sc. Thesis, College of Education for Pure Science, University of Mosul (2013). (In Arabic).
12. Llorent-Martinez E.J., Barrales P.O., Cordova M.L.F. and Ruiz-Medina A., Anal. Bioanal.Chem.,394: 845-853 (2009).
13. Stepankova M., Selesovska R., Janikova L. and Chylkova J., Chem. Pap., 71:1419-1427 (2017).
14. Zadeh A.H. and Kohansal S., J. Braz. Chem. Soc., 23: 473-781 (2012).
15. Rao K.H., Rao A.L., and Sekhar KB.C., Int. Res. Pharm. Chem., 3(2): 472-476 (2013).
16. Rafael J.A., Jobar J.R., Gasagrande R. and Geargetti S.R., Braz. J. Pharm. Sci., 43:97-103 (2007).
17. Fadhel S.R., Abdulla N.I. and Sulaiman I.D., Ibn Al-Haitham J. Pure Appl. Sci., 29(1): 226-238 (2016).
18. Dikran S.B. and Zankanah F.H., Iraqi J. Pharm. Sci., 26(1): 1-8 (2017).
19. Jayanna B. K., Devaraj T.D. and Gowda N., Indian J. Drugs, 2(3): 132-135 (2014)
20. Abdulrahman S.A.M., Basavaiah K., Revanasiddappa H. D. and Vinay K.B., Malaysian J. Pharm. Sci., 8(2): 11–24 (2010).
21. Walash M.I., El-Enany N. and Askar H., Luminescence, 30: 1119-1124 (2015).
22. Trišović N.P., Bozic B.D., Petrovic S.D., Tadic S.J. and Avramov Ivic M.L., Hem. Ind., 68(2): 207-212 (2014).
23. El Sheikh R., Gouda A.A., Hassan W.S., Hashem H., Ali M. and Kandiel N.F. Chem. Sci. Transactions 5(4): 1026-1034 (2016).
24. Aydoğmuş Z., Yılmaz E.M., Aslan S.S., Taş Z.E. and Üner M. Pharm. Chem. J., 3(4): 1-10 (2016).
25. Ranjani P.H., Reddy G.R., Goud D.R. and Prasad V.V.S.R., Int. J. Pharm. Res. Anal., 7(1): 1-4 (2017).

26. Dikran S.B. and Mahmood R.M., Ibn Al-Haitham J. Pure Appl. Sci., 28(3): 129-141 (2015).
27. Rashid Q.N., Bakir M.H. Baban S.O., Tikrit J. Pure Sci., 21(3): 76- 80 (2016).
28. Souza R.L. and Tubino M., J. Braz. Chem. Soc., 16(5): 1068-1073 (2005).
29. Freer J., Baeza C., Contreras D., Soto C., Corrales S. and Moreno N., J. Chil. Chem. Soc., 59(3): 2632-2635 (2014).
30. Ciltas U., Yilmaz B., Kaban S., Akcay B.K. and Nazik G., Iranian J Pharm. Res. 14(3): 715-722 (2015).
31. Chethana B.K., Basavanna S. and Naik Y.A. Ind. Eng. Chem. Res., 51(31): 10287-10295 (2012).
32. Shah I., Barker J., Naughton D.P., Barton S.J. and Ashraf S.S., Chemi. Central J., 10(52): 1-10 (2016).
33. Mahaparale S.P. and Gonjari I.D., J. Adv. Drug Deliv., 1(4); 173-183 (2014).
34. Nasir F., Iqbal Z., Khan A., Ahmad L., Shah Y., Khan AZ., Khan JA. and Khan S., J. Chromatogr. B., 879(30):3434-3443 (2011).
35. Sabnis R.W., "Handbook of Biological Dyes and Stains". John Wiley Sons Inc. Canada (2010), p. 333.
36. Gurr E., "Staining Practical and Theoretical". The Williams and Wilkins Co. Baltimore (1962), p. 61.
37. Conn H.J., "Biological Stains". 6th Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore (1953), p. 117-118.
38. Bonilla E. and Prelle A., J. Histochem. Cytochemistry, 35(5): 619-621 (1987).
39. Ostle A.G. and Holt J.G., Appl. Env. Microbio., 44(1): 238-241 (1982).
40. Kul D., Ghica M.E., Pauliukaite R. and Brett C.M.A., Talanta, 111: 76-84 (2013).
41. Chitravathi S. and Munichandraiah N., J. Electroanal. Chem., 764: 93-103 (2016).
42. Kul D. and Brett C.M.A., Int. J. Electrochem., 1-7 (2011)
43. El-Shahat M.F., Moawed E.A. and Zaid M.A.A., Talanta, 59(5): 851-866 (2003).
44. El-Hawary W.F., Issa Y.M. and Talat A., Int. j. Biomed. Sci., 3(1): 50-55 (2007).
45. Basavaiah K., Zenita O., Tharpa K., Rajendraprasad N., Anilkumar U. R., Hiriyana S. G. and Vinay K. B., Chem. Ind. Chem. Eng. Quarterly, 15(2): 95-102 (2009).
46. Lee S.H., Suh J.K. and Li M., Bull. Korean Chem. Soc., 24(1): 45-48 (2003).
47. Ravisankar P., Navya CN., Pravallika D. and Sri DN., IOSR J. Pharm., 5(10): 7-19 (2015).
48. Inam-ul-Haque, Hussain S.A. and Aslam N., Sci. Int. (Lahore),19(2): 111-123 (2007).
49. Nagegowda P. and Basavaiah K., J. Braz. Chem. Soc., 16(4) 821-826 (2005).